

بررسی میان کنش نانومیله طلا با آنزیم کندروآتیناز با رویکرد طراحی سامانه هدفمند انتقال دارو برای ترمیم ضایعات نخاعی

خلاصه

هدف: مطالعه میان کنش نانومیله طلا با غلظت‌های گوناگون آنزیم کندروآتیناز به منظور بهینه کردن نانومیله طلا با رویکرد سامانه هدفمند حامل دارویی برای بهبود روند بازسازی اکسون‌ها و ترمیم ضایعات نخاعی.

روش بررسی: نانومیله طلا با روش رشد دانه سنتز شد و مطالعات ساختاری و مورفولوژی نانومیله طلا و بررسی رزونانس پلاسمون سطحی با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی و میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات پلاسمونیک رزونانس سطحی نانومیله طلا در اثر میان کنش با غلظت‌های مختلف آنزیم توسط تکنیک‌های طیف‌سنجی، فلورسانس و دورنگ‌نمایی دورانی بررسی شد. همچنین فعالیت آنزیمی در حضور غلظت‌های مختلف نانومیله طلا، برای طراحی سامانه هدفمند انتقال دارو انجام شد.

یافته‌ها: تغییرات پلاسمونیک نانومیله طلا برای بهبود در نقش حامل دارویی نشان داد که اضافه کردن آنزیم و میان کنش آنزیم با نانومیله طلا نه تنها منجر به ازدست رفتن ساختار نانومیله طلا نمی‌شود بلکه مطالعات فلورسانس نشان داد که می‌تواند سبب تقویت شدت سیگنال فلورسانس نیز شود. از طرف دیگر مطالعات فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف نانومیله طلا، نشان داد که دو غلظت ۱۲/۵ و ۲۵ نانو مولار نانومیله طلا بهترین نتیجه را در زمینه فعالیت آنزیم و حفظ ساختار نانومیله طلا دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: از کاربردهای نانومیله طلا استفاده از آن در عرصه‌های پزشکی و درمانی به عنوان سامانه انتقال دارو است و یکی از آنزیم‌های کلیدی که برای درمان ضایعات نخاعی استفاده می‌شود، آنزیم کندروآتیناز است. مطالعات نانومیله طلا در حضور غلظت‌های مختلف آنزیم نشان داد که علاوه بر عدم از بین رفتن ساختار، افزایش سیگنال فلورسانس برای کاربردهای حسگری نیز مشاهده شد. همچنین با توجه به مطالعات فعالیت آنزیم، غلظت ۱۲/۵ نانومولار نانومیله طلا برای طراحی سامانه هدفمند انتقال دارو برای این آنزیم مفید به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: نانومیله طلا، آنزیم کندروآتیناز، سامانه انتقال دارو

مینا سادات نادری^۱
ظاهره توحیدی مقدم^۲
خسرو خواجه^۳
بیژن رنجبر^۴

۱. گروه پژوهشی ترمیم نوری، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، دانشجوی دکتری بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴. استادیار، گروه بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

نویسنده مسئول: بیژن رنجبر تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۳۴۱۸
پست الکترونیک: ranjbarb@modares.ac.ir

مقدمه

حوزه نانوتکنولوژی در زمینه انتقال دارو در مان‌های ضدسرطان در دهه‌های اخیر به موفقیت چشمگیری دست یافته است. نانو ساختار طلا نسبت به سایر نانو ساختارها کاربرد بیشتری پیدا کرده است و این امر می‌تواند به علت خاصیت پلاسمونیک قوی‌تر و همچنین قابلیت سازگاری زیستی بالای آن‌ها باشد [۱]. از ویژگی‌های منحصر به فرد نانوذرات طلا جذب و پراکندگی قوی در ناحیه مرئی - فرابنفش از طیف الکترومغناطیسی است، به طوری که در طول موج ۷۰۰ تا ۱۲۰۰ نانومتر می‌تواند جذب داشته باشد و این به دلیل خاصیت پلاسمونیک قوی نانوذرات طلا است [۲]. از دیگر ویژگی‌های منحصر به فرد نانومیله‌های طلا حساسیت نسبت به تغییرات ثابت دی الکتریک مواد اطراف نانوذره است به طوری که از نانوذرات می‌توان برای سنسور ها و حسگرهای شیمیایی در محیط آزمایشگاهی استفاده کرد [۳]. اندازه و شکل ذرات با توجه به پروتکل‌های سنتزی متفاوت خواهد بود به طوری که اندازه آن‌ها می‌تواند بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر تغییر کند. سطح زیاد این نانوذرات از ویژگی‌های دیگر می‌باشد که برای بارگذاری داروها مفید است بنابراین انحلال پذیری، پایداری و همچنین پارامترهای کینتیکی داروها را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲]. با توجه به این که نانومیله‌های طلا مورفولوژی آنیزوتروپیک و غیریکنواخت دارند، برای کاربردهای زیست پزشکی و کاربردهای زیست‌حسگری مفید هستند [۴].

کندروآتین سولفات گلیکان‌ها، کلاس اصلی از مهار کننده‌های رشد آکسون‌ها هستند که مقدار آن هنگام جراحات ستون فقرات و نخاع افزایش می‌یابد و تأثیر منفی در بهبودی و بازیابی آکسون‌ها خواهند داشت. آنزیم کندروآتیناز اثر مهاری گلیکوزآمینو گلیکان‌ها را با هضم آن‌ها از بین می‌برد و به این ترتیب سبب ترمیم و بهبودی جراحات نخاعی می‌شود [۵]. در واقع آنزیم کندروآتیناز، زنجیره‌های گلیکوزآمینو گلیکان را در پروتوگلیکان‌ها هضم می‌کند و بدین ترتیب بازیابی آکسون و بهبودی عملکردی را افزایش می‌دهد [۶]. با وجود اهمیت فراوان این آنزیم، عدم پایداری از جمله محدودیت‌های آن در کاربردهای پزشکی است. بنابراین، پایداری سازی این آنزیم به شدت مورد توجه محققان قرار گرفته است [۷]. در زمینه میان‌کنش نانومیله طلا با پروتئین‌ها مطالعاتی صورت گرفته است. از جمله این مطالعات، بررسی میان‌کنش آنزیم لیزوزیم با نانومیله طلا است که براساس آن پایداری سینتیکی آنزیم افزایش می‌یابد [۸]. البته میان‌کنش و جذب سطحی ممکن است باعث برخی تغییرات کنفورماسیونی نامطلوب در ساختار بیومولکول‌ها شود که به تغییر در فعالیت منجر می‌گردد. بررسی ساختاری و عملکردی آنزیم لیزوزیم در طی اتصال با نانو ساختار اکسید روی نشان می‌دهد که آنزیم در طی اتصال با نانو ساختار اکسید روی دستخوش تغییرات اندکی در کنفورماسیون می‌شود در حالی که فعالیت آنزیم تغییر چندانی نمی‌کند [۹]. پاسخ پروتئین بستگی به طبیعت پروتئین و سطح شیمیایی نانو ساختار دارد. از تحقیقات دیگر

انجام شده در زمینه میان‌کنش با نانومیله طلا، پروتئین آلبومین است که نتایج حاصل نشان دهنده تغییرات نامحسوس در کنفورماسیون آنزیم است [۱۰].

مطالعه میان‌کنش آنزیم کندروآتیناز با نانومیله‌های طلا می‌تواند راه کار جدیدی برای انتقال این آنزیم باشد، به طوری که در حضور کمپلکس آنزیم - نانومیله‌های طلا (نسبت به استفاده از آنزیم به تنهایی) غلظت کمتری از آنزیم جهت درمان نیاز خواهد بود و بنابراین این سامانه (در صورت تحقیقات بیشتر در سطح حیوانی و انسانی) می‌تواند مراجعه بیمار را برای دریافت آنزیم کاهش دهد [۳]. در این مطالعه تغییرات ساختاری و نوسانات پلاسمون سطحی نانومیله‌های طلا در اثر میان‌کنش با غلظت‌های مختلف آنزیم جهت بهینه‌سازی سامانه انتقال دارو در ترمیم ضایعات نخاعی در جهت بازسازی رشد آکسون‌ها بررسی شد.

روش کار

۱. ساخت نانومیله طلا

نانومیله‌های طلا با روش تکنیک رشد روی ذرات دانه^۱ طی دو مرحله ساخت دانه^۲ و مرحله رشد سنتز^۳ شدند. در مرحله اول ۲۵۰ میکرولیتر نمک طلا HAuCl₄ با غلظت ۰/۰۱ مولار را به ۷/۵ میلی‌لیتر از CTAB با غلظت ۰/۰۹۵ مولار اضافه گردید و بلافاصله ۶۰۰ میکرولیتر محلول سرد (Ice-cold) اضافه شد. پس از گذشت زمان حداقل ۲ ساعت در دمای اتاق، دانه‌ها تشکیل شدند.

در مرحله رشد ابتدا ۹/۵ میلی‌لیتر محلول CTAB (۰/۰۹۵ مولار) تهیه و سپس ۴۰۰ میکرولیتر محلول نمک طلا HAuCl₄ با غلظت ۰/۰۱ مولار و ۶۰ میکرولیتر محلول AgNO₃ با غلظت ۰/۰۱ به آرامی اضافه گردید و در نهایت با افزودن اسید آسکوربیک و ۴۰ میکرولیتر از محلول دانه از مرحله قبل، در بازه زمانی سه ساعت در شرایط آزمایشگاه نانومیله‌های طلا سنتز شدند [۱۱ و ۱۲].

۲. تخلیص نانومیله‌های طلا و پایش نوسانات پلاسمون سطحی با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی مرئی فرابنفش

برای تخلیص نانومیله‌های طلا دوبار سانتریفیوژ و به مدت ۵ دقیقه و با $g \times 12500$ انجام شد. پس از هر بار سانتریفیوژ، محلول رویی خارج گردید و نانوذرات ته‌نشین شده با آب دیونیزه به غلظت مورد نظر رسانده شد. پس از سونیکاسیون به مدت ۱ دقیقه، جهت تأیید ساخت نانوذرات طلا با مورفولوژی میله‌ای از طیف‌سنجی فرابنفش - مرئی در گستره طول موج ۴۰۰ تا ۹۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر Carry-۱۰۰ استفاده شد [۱۳].

۱. Seed mediated growth protocol

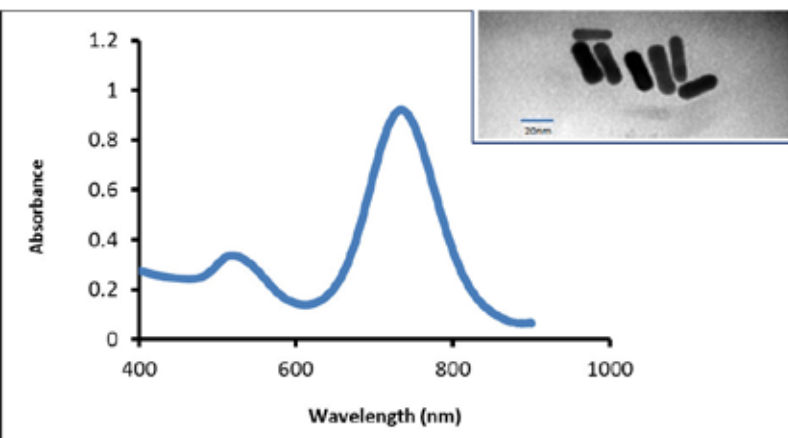
۲. Seed

۳. Growth

یافته‌ها

۱. بررسی ساخت نانومیلۀ طلا و نوسانات پلاسمون سطحی آن

ساده‌ترین راه برای تأیید ساخت نانومیله‌های طلا، بررسی طیف جذبی آن‌ها با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش است. نانومیله‌های طلا در اثر میان‌کنش با پرتوهای الکترومغناطیس به علت داشتن دو سطح متفاوت طولی و عرضی به صورت‌های مختلفی نوسان می‌کنند. همان‌گونه که در شکل ۱ دیده می‌شود دو پیک جذبی مشاهده می‌شود که پیک اول در طول موج ۵۳۰ نانومتر مربوط به سطح عرضی آن و پیک جذبی دوم در طول موج ۷۵۰ نانومتر مربوط به سطح طولی نانو ساختار است که بیانگر سنتز نانوذرات به شکل میله‌ای می‌باشد. همچنین تأیید نهایی مورفولوژی نانومیله طلا با استفاده از میکروسکوپ الکترونی انجام شد. نتایج نشان می‌دهد که اندازه طولی آن 2 ± 30 نانومتر و اندازه عرضی آن 2 ± 8 نانومتر است (شکل ۱).



شکل ۱: طیف جذبی نانومیلۀ طلا علیه طول موج در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، $\text{pH}=6.8$ و تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانومیلۀ سنتز شده

شکل ۲ نوسانات پلاسمون سطحی نانومیله طلا را در حضور و عدم حضور غلظت‌های متفاوت آنزیم نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، کاهش طیف نانومیله طلا در اثر میان‌کنش با غلظت‌های مختلف پروتئین رخ داده است به گونه‌ای که با افزایش غلظت پروتئین میزان شدت نوسانات پلاسمونیک سطحی نانومیله طلا نیز کاهش می‌یابد [۱۷ و ۱۸].

برای بررسی تفاوت بار نانومیله طلا در اثر میان‌کنش با آنزیم کندروآتیناز پتانسیل زتا مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. بعد از سنتز نانومیله طلا و تخلیص آن، پتانسیل زتای بدست‌آمده برای نانومیله طلا 40 میلی‌ولت بود و با اضافه کردن آنزیم، این مقدار به $16/5$ میلی‌ولت کاهش پیدا کرد. شکل ۳ نشان‌دهنده پتانسیل زتا و تفاوت بار نانومیله طلا در اثر میان‌کنش با غلظت‌های مختلف آنزیم است. هرچه غلظت آنزیم افزایش می‌یابد پتانسیل زتا نانومیله طلا نیز کاهش می‌یابد. این کاهش بار با نتایج

۳. تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری نانومیلۀ طلا

برای تأیید نهایی مورفولوژی و همچنین ارزیابی اندازه دقیق، نانوذرات روی شبکه مسی (گرید) پوشیده از کربن قرار گرفتند و بعد از خشک شدن در شرایط محیط با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری مدل LEO ۹۰۶ آلمان (دانشگاه خواجه نصیر) تصویربرداری انجام شد.

۴. میان‌کنش آنزیم- نانومیلۀ طلا

برای بررسی میان‌کنش آنزیم- نانومیله طلا، نسبت ۱:۱ از آنزیم (غلظت ۱۰-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و نانومیله طلا (غلظت ۱۲/۵ نانومولار) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. برای تأیید و بررسی میان‌کنش آنزیم-نانومیله طلا از تکنیک‌های زیر استفاده شد:

۱-۴. پتانسیل زتا

برای بررسی تفاوت بار بین نانومیله طلا و نانومیله طلا- آنزیم (۱۰-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از پتانسیل زتا استفاده گردید. به این ترتیب که پس از تخلیص نانومیله طلا، تفاوت بار آنزیم- نانومیله طلا و نانومیله طلا به تنهایی (به عنوان کنترل) با دستگاه MALVERN Nano-ZS اندازه‌گیری شد.

۲-۴. مطالعات فلورسانس

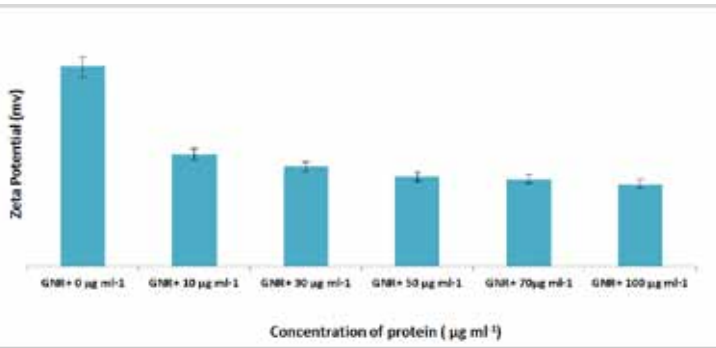
تغییرات شدت فلورسانس آنزیم- نانومیله طلا و نانومیله طلا به تنهایی (به عنوان کنترل) با دستگاه Perkin Elmer LS۵۵ (آمریکا) و در محدوده طول موج ۴۰۰ تا ۹۰۰ نانومتر انجام گردید.

۳-۴. سنجش فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم کندروآتیناز در حضور و عدم حضور نانومیله طلا توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر Carry-۱۰۰ بر اساس افزایش جذب در طول موج ۲۳۲ nm و با در نظر گرفتن ضریب جذب مولی (ϵ) $3800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ اندازه‌گیری شد. طبق تعریف، واحد فعالیت آنزیمی مقداری از آنزیم است که بتواند در طی یک دقیقه، یک میکرو مول محصول را در حجم واکنش تولید کند [۱۶ و ۱۷].

۴-۴. مطالعات دورنگ‌نمایی دورانی (CD) Circular Dichroism

طیف دورنگ‌نمایی دورانی نانومیله‌های طلا در حضور و عدم حضور آنزیم و در بافر فسفات ۵۰ mM با $\text{pH} 6.8$ و در محدوده ۲۵۰-۲۰۰ نانومتر ثبت گردید. تجزیه و تحلیل کمی طیف‌ها توسط نرم‌افزار J-715 شرکت جاسکو ژاپن انجام شد.



شکل ۳: پتانسیل زتا و بار نانومیله طلا و میان کنش نانومیله طلا با آنزیم در غلظت‌های مختلف در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، pH=۶/۸

محلی با جفت شدگی همراه خواهد بود و میدان‌های ورودی و خروجی می‌توانند باعث تشدید این جفت شدگی با پلاسمونیک رزونانس محلی شوند. ویژگی‌های نوری و الکتریکی نانوذرات طلا توسط شکل، اندازه، ویژگی‌های سطحی و محیط اطراف آن‌ها تعیین می‌شود [۲۰].

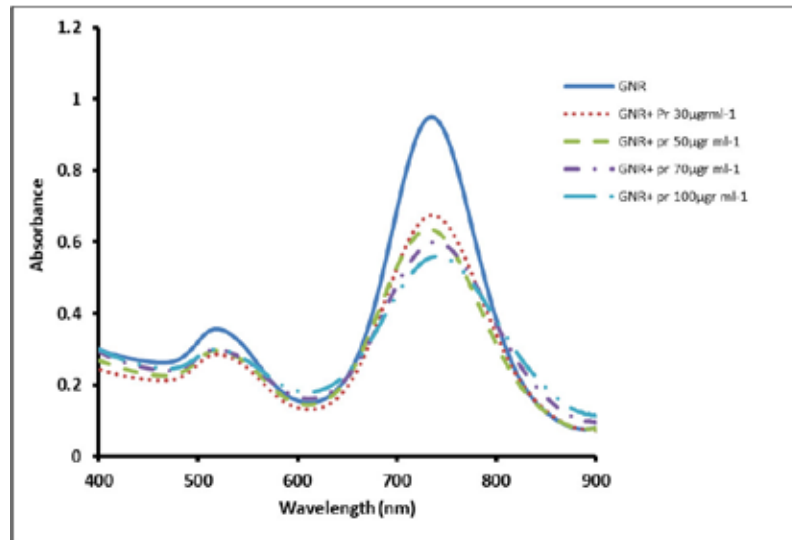
شکل ۴ نانومیله‌ها را با دو سیگنال فلورسانس نشان می‌دهد و آنیزوتروپی حاصل از آن‌ها باعث ایجاد دو سیگنال فلورسانس شده که مربوط به رزونانس پلاسمون طولی و عرضی است. حضور پروتئین سبب تغییر در ضریب شکست و دی‌الکتریک سطح نانومیله طلا شده که می‌تواند در شدت فلورسانس تأثیرگذار باشد. همچنین یافته‌ها حاکی از آن است که با افزایش غلظت پروتئین، ضریب شکست نانومیله افزایش یافته و منجر به تقویت ویژگی‌های پلاسمونیک و افزایش سیگنال فلورسانس شده است. در نتیجه این ویژگی‌ها می‌توانند در کاربرد حسگرهای زیستی نانومیله طلا مفید باشند.

۳. مطالعه فعالیت آنزیم کندروآتیناز

فعالیت آنزیم در حضور و عدم حضور نانومیله طلا مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن در شکل ۵ ارائه شده است. با افزایش غلظت نانومیله طلا، فعالیت آنزیم نیز کاسته شده و در این بین دو غلظت ۱۲/۵ و ۲۵ نانو مولار نانومیله طلا دارای بیشترین فعالیت در مقایسه با سایرین را دارد. به نظر می‌رسد که در صورت استفاده این سیستم در In-vivo و کاربرد آن در انتقال دارو، غلظت‌های ۱۲/۵ و ۲۵ نانومولار را می‌توان استفاده کرد.

۴. مطالعات دورنگ‌نمایی دورانی (CD)

طیف پلاسمونیک دورنگ‌نمایی دورانی در شرایطی ایجاد می‌شود که موج رزونانس نانوذرات با یکدیگر انباشته شود [۲۱]. بنابراین با یک نانوذره جداگانه که چیدمان منظمی ندارد نمی‌توان در ناحیه مرئی شاهد طیف پلاسمونیک دورنگ‌نمایی دورانی بود زیرا هر کدام از نانوذرات اثر یکدیگر را خنثی می‌کنند و دلیل دیگر برای مشاهده نکردن پلاسمونیک دورنگ‌نمایی دورانی، دقت کم دستگاه است. با توجه به مشاهده نشدن پلاسمونیک دورنگ‌نمایی دورانی در مورد نانومیله طلا می‌توان نتیجه گرفت



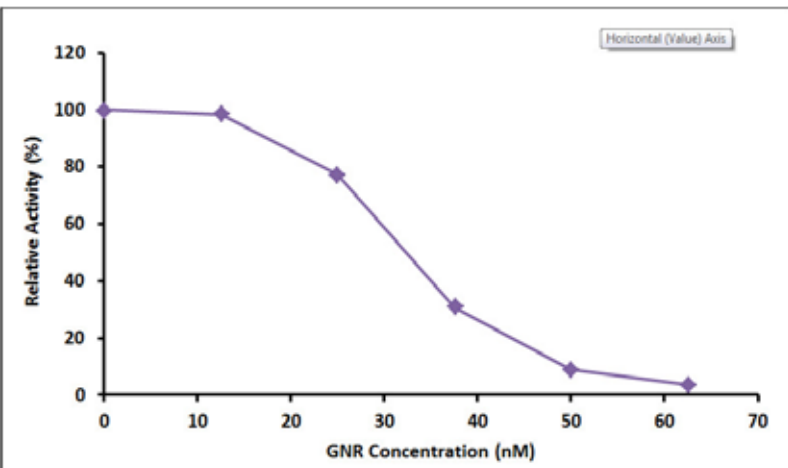
شکل ۴: طیف جذبی نانومیله طلا در حضور و عدم حضور آنزیم در غلظت‌های مختلف (۱۰۰-۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، pH=۶/۸

حاصل از طیف‌سنجی قابل توجه بوده به طوری که با افزایش غلظت آنزیم کاهش در مقدار نوسانات پلاسمون سطحی نانومیله طلا مشاهده شد.

۲. مطالعات فلورسانس نانومیله طلا در حضور آنزیم کندروآتیناز

به منظور بررسی ارزیابی نانومیله طلا پس از میان کنش آن‌ها با پروتئین، طیف پلاسمونیک فلورسانس بررسی شد. همان‌گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود نانومیله‌های طلا دارای دو باند نشری فلورسانس هستند که مربوط به پلاسمون رزونانس سطحی طولی و عرضی نانومیله‌های طلا می‌باشند [۱۹]. نسبت اندازه طولی به عرضی نانومیله‌های طلا در فلورسانس تأثیرگذار است به طوری که هرچه این مقدار افزایش یابد به همان نسبت نشر فلورسانس افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد تشدید فلورسانس به دلیل تشدید میدان محلی^۴ است که تابعی از سطح طولی پلاسمون سطحی نانومیله‌های طلا می‌باشد به طوری که اگر نسبت سطح طولی به سطح عرضی برابر ۱ باشد در این صورت پیک نشری یک عدد خواهد بود ولی با اضافه شدن این نسبت پیک پلاسمون رزونانس به دو پیک عرضی و طولی شکافته می‌شود. علاوه بر این پیک طول موج بلندتر، کاهش یافته و جابه‌جایی قرمز خواهد داشت در حالی که پیک طول موج کوتاهتر کمی جابه‌جایی آبی خواهد داشت. شدت و موقعیت طول موج نشری بلندتر به خاطر شکل آنیزوتروپی آن بسیار حساس است. به دلیل اندازه ذره و داشتن دو سطح طولی و عرضی تهییج در دو سطح طولی و عرضی رخ می‌دهد و بنابراین دو پیک نشری متفاوت ایجاد خواهد شد. از طرف دیگر سطوح انرژی شکافته شده نانومیله‌های طلا باعث فراوانی الکترون‌های جابه‌جا شده می‌شود. بنابراین فوتون‌های نشری می‌توانند همزمان فرکانس‌های متفاوتی را داشته باشند (هرچند که تشدید میدان

۴. Local field

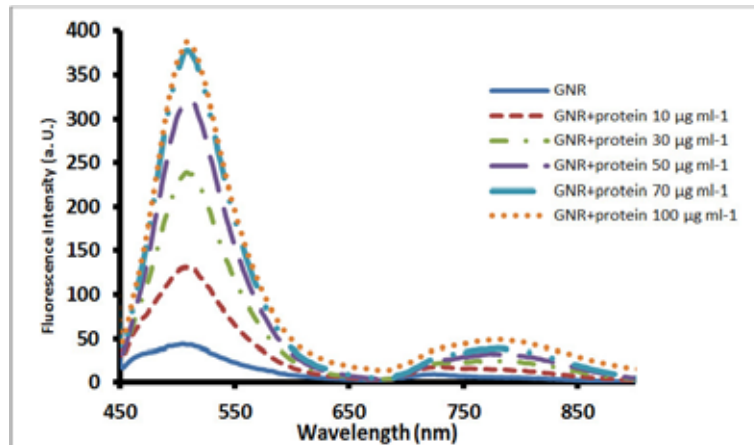


شکل ۵: فعالیت آنزیم کندروائیناز در حضور غلظت‌های مختلف نانومیله طلا در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، pH=۶/۸

دیگر از ویژگی‌های منحصر به فرد نانوذرات توانایی آن‌ها در بیوسنسورهای نوری است به طوری که نانومیله‌های طلا می‌توانند به پروتئین‌های نشاندار متصل شده و برای شناسایی اهداف بیولوژیکی با تشدید و افزایش حساسیت استفاده گردند. برای بهینه کردن فعالیت آنزیم از غلظت‌های مختلف نانومیله طلا برای میان‌کنش استفاده گردید که از این بین، غلظت ۱۲/۵ نانومولار بیشترین فعالیت را در مقایسه با سایر آنزیم‌های میان‌کنش یافته نشان می‌داد.

کلاس‌های مختلفی از نانوذرات به‌عنوان حامل‌های دارویی شناخته شده است که شامل لیپوزوم‌ها، میسل‌ها، وزیکل‌ها، دندیرها و نانوذرات فلزی است. از این میان نانومیله طلا به‌عنوان سامانه انتقالی برای حمل و رهایش بیومولکول‌ها و داروهای مختلف در سلول‌های مختلف توسعه پیدا کرده است که می‌تواند به دلیل ویژگی‌هایی از قبیل خنثی بودن هسته فلزی طلا و سازگاری زیستی آن اشاره کرد. از ویژگی‌های دیگر می‌توان به اندازه قابل کنترل آن اشاره کرد که سطح مناسبی را برای بارگذاری دارو فراهم می‌کند. نانومیله‌های طلا می‌توانند اثرات نور گرمایی را پشتیبانی کنند. پراکنده شدن انرژی نوری جذب شده به‌عنوان حرارت می‌تواند برای رهایش فعال داروها به کار گرفته شود. کنترل رهایش دارو از سطح نانوذرات برای نگهداری غلظت دارویی در بحث‌های درمان بسیار ضروری است و باید محل رهایش کنترل شده باشد. محرک‌های مختلفی از قبیل: تغییرات در pH، گلوکاتیون، آنزیم و نور برای رهایش دارو وجود دارد، از آنجایی که نانومیله طلا در طول موج‌های مختلف، جذب مشخص و معینی دارد بنابراین تابش نور در یک طول موج خاص به ترکیب نمونه باعث رهایش داروی متصل شده می‌شود [۲۳].

مطالعه‌ای مبنی بر استفاده از داربست‌های هیدروژلی میکروتوبول‌های لیپیدی برای انتقال و تحویل دارو توسط Lee در سال ۲۰۰۹ انجام گردید، نتایج حاکی از رهایش آرام دارو توسط داربست بود، به عبارت دیگر



شکل ۴: تغییرات شدت فلورسانس حاصل از میان‌کنش نانومیله طلا با غلظت‌های مختلف آنزیم در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، pH=۶/۸

که هر کدام از نانومیله‌ها به صورت جداگانه قرار گرفتند و جفت‌شدگی و تقویت موج رزونانسی صورت نگرفته است (داده‌ها نشان داده نشده است).

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از نانو تکنولوژی در دهه‌های اخیر توجه بسیاری را به خود جلب کرده که از این بین نانومیله‌های طلا با ویژگی‌های منحصر به فرد خود کاربردهای بسیاری را پیدا کرده است. از کاربردهای آن در عرصه پزشکی و درمانی استفاده از آن به‌عنوان حامل دارویی است. یکی از آنزیم‌هایی که برای درمان ضایعات نخاعی استفاده می‌شود، آنزیم کندروائیناز است که استفاده از آن برای چندین بار برای بیماران لازم و ضروری است. لذا استفاده از نانوذرات به‌عنوان بستری برای انتقال آسان آنزیم، مفید و سودمند می‌باشد. در این مقاله مطالعه ساختاری و تغییرات پلاسمونیک رزونانس نانومیله طلا در اثر میان‌کنش با آنزیم توسط تکنیک‌های طیف‌سنجی، فلورسانس، دورنگ‌نمایی دورانی و همچنین مطالعه فعالیت آنزیم میان‌کنش یافته با نانومیله طلا در غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

اتصال نانومیله طلا به آنزیم کندروائیناز باعث تغییر در شدت جذب باند پلاسمون رزونانسی نانومیله طلا می‌شود. به طوری که سطح با بار مثبت نانومیله طلا با بار منفی سطح پروتئین میان‌کنش داده و باعث کاهش بار مثبت نانومیله طلا خواهد شد [۱۷ و ۱۸]. بنابراین می‌توان از نانومیله طلا به‌عنوان نانوحامل دارویی، در غلظتی از آنزیم که ساختار نانومیله دستخوش تغییر زیادی نشده باشد استفاده نمود. پلاسمون رزونانس می‌تواند منجر به القای تشدید میدان الکترومغناطیسی شود و ویژگی‌های نوری کروموفورهای اطراف را تحت تأثیر قرار دهد. قابل توجه است که نانوذرات به‌تنهایی و در عدم حضور آنزیم، فلورسانس ذاتی کمی دارند ولی در اثر میان‌کنش با پروتئین، افزایش فلورسانس مشاهده می‌شود به طوری که با افزایش غلظت آنزیم مقدار نشر فلورسانس نیز افزایش می‌یابد [۲۲]. یکی

References:

1. Alkilany AM, Thompson LB, Boulos SP, Sisco PN, Murphy CJ. Gold nanorods: their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions. *Advanced drug delivery reviews*. 2012; 64(2): 190-9.
2. Vigderman L, Khanal BP, Zubarev ER. Functional gold nanorods: synthesis, self-assembly, and sensing applications. *Advanced Materials*. 2012; 24(36): 4811-41.
3. Chen PC, Mwakwari SC, Oyelere AK. Gold nanoparticles: from nanomedicine to nanosensing. *Nanotechnology, science and applications*. 2008; 1: 45.
4. Huang X, Neretina S, El-Sayed MA. Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications. *Advanced Materials*. 2009; 21(48): 4880-910.
5. Prabhakar V, Capila I, Carlos J, Pojasek K, Sasisekharan R. Chondroitinase ABC I from *Proteus vulgaris*: cloning, recombinant expression and active site identification. *Biochemical Journal*. 2005; 386(1): 103-12.
6. Yamagata T, Saito H, Habuchi O, Suzuki S. Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *Journal of Biological Chemistry*. 1968; 243(7): 1523-35.
7. Nazari-Robati M, Khajeh K, Aminian M, Fathi-Roudsari M, Golestani A. Co-solvent mediated thermal stabilization of chondroitinase ABC I form *Proteus vulgaris*. *International journal of biological macromolecules*. 2012; 50(3): 487-92.
8. Moghadam TT, Ranjbar B, Khajeh K. Conformation and activity of lysozyme on binding to two types of gold nanorods: A comparative study. *International journal of biological macromolecules*. 2012; 51(1): 91-6.
9. Chatterjee T, Chakraborti S, Joshi P, Singh SP, Gupta V, Chakrabarti P. The effect of zinc oxide nanoparticles on the structure of the periplasmic domain of the *Vibrio cholerae* ToxR protein. *The FEBS journal*. 2010; 277(20): 4184-94.
10. Chakraborty S, Joshi P, Shanker V, Ansari ZA, Singh SP, Chakrabarti P. Contrasting effect of gold nanoparticles and nanorods with different surface modifications on the

داربست استفاده شده باعث بهبود در فعالیت آنزیمی شده و رهایش آن به جای یک ساعت، دو هفته به طول می‌انجامد و به این صورت باعث ترمیم در جراحات ستون فقرات می‌شود [۲۴].

مطالعه رهایش کنترل شده از دوکسوروبیسین که توسط نانومیله‌های طلا میانجی‌گری می‌شود در سال ۲۰۱۳ توسط Pandey انجام گردید. در این روش از سوزن‌های طلا برای انتقال داروی هوشمند و کارا برای استفاده گسترده از داروهای ضدسرطانی استفاده شد [۲۵]. انتقال و رهایش برنامه‌ریزی شده مواد دارویی با هدف فیزیولوژیک خاص یک چالش مهم برای درمان‌های مولکولی به‌شمار می‌آید که در این بین نانوذرات طلا با توجه به موارد ذکر شده، می‌تواند به‌عنوان هم برای سیستم انتقال مؤثر و کارا وهم برای رهایش مواد دارویی به سلول‌های مختلف استفاده شود.

در این مطالعه به بررسی تغییرات ساختاری نانومیله طلا و تغییرات فعالیت آنزیم میان‌کنش‌یافته با نانومیله طلا پرداخته شد و نتایج نشان داد که حضور پروتئین نه تنها منجر به ازدست‌دادن ساختار نانومیله طلا به‌عنوان حامل دارویی نمی‌شود بلکه در افزایش سیگنال نیز مؤثر است. از نتایج دیگر بدست آمده در زمینه کاربردهای حامل دارویی نانومیله طلا این است که غلظت ۱۲/۵ نانومولار نانومیله طلا بهترین فعالیت را برای آنزیم دارا بود. بنابراین، این مطالعه می‌تواند چشم‌اندازی در جهت ترمیم بهتر ضایعات نخاعی با توجه به عملکرد آنزیم و نقش نانوحاملی نانومیله طلا باشد که البته نیاز به تحقیقات بیشتر در سطح حیوانی و انسانی دارد.

structure and activity of bovine serum albumin. *Langmuir*. 2011; 27(12): 7722-31.

11. Moghadam TT, Ranjbar B, Khajeh K, Etehad SM, Khalifeh K, Ganjalikhany MR. Interaction of lysozyme with gold nanorods: conformation and activity investigations. *International journal of biological macromolecules*. 2011; 49(4): 629-36.

12. Sau TK, Murphy CJ. Seeded high yield synthesis of short Au nanorods in aqueous solution. *Langmuir*. 2004; 20(15): 6414-20.

13. Nikoobakht B, El-Sayed MA. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chem. Mater*. 2003; 15(10): 1957-62.

14. Protasevich I, Ranjbar B, Lobachov V, Makarov A, Gilli R, Briand C, Lafitte D, Haiech J. Conformation and thermal denaturation of apocalmodulin: role of electrostatic mutations. *Biochemistry*. 1997; 36(8): 2017-24.

15. Ranjbar B, Gill P. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses-A Review. *Chemical biology & drug design*. 2009; 74(2): 101-20.

16. Nazari-Robati M, Khajeh K, Aminian M, Mollania N, Golestani A. Enhancement of thermal stability of chondroitinase ABC i by site-directed mutagenesis: an insight from Ramachandran plot. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2013; 1834(2): 479-86.

17. Gole A, Murphy CJ. Seed-mediated synthesis of gold nanorods: role of the size and nature of the seed. *Chemistry of Materials*. 2004; 16(19): 3633-40.

18. Gole A, Murphy CJ. Seed-mediated synthesis of gold nanorods: role of the size and nature of the seed. *Chemistry of Materials*. 2004; 16(19): 3633-40.

19. John HT. Fluorescence properties of gold nanorods and their application for DNA biosensing. *Chemical communications*. 2005; 31:3924-6.

20. Jian Z, Yong-Chang W, Shi-Nong Y. Fluorescence spectrum characteristics of gold nanorods. *Chinese Physics Letters*. 2004; 21(3): 559.

21. Eustis S, El-Sayed M. Aspect ratio dependence of the enhanced fluorescence intensity of gold nanorods: experimental and simulation study. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2005; 109(34): 16350-6.

22. Azizi A, Ranjbar B, Moghadam TT, Bagheri Z, Baglou SR. Surface plasmon resonance coupled circular dichroism of DNA-gold nanorods assembly. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2014; 47(31): 315401.