تحقیقی

ساخت و ارزیابی خواص ضد مس درون سلولی نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین – دندریمر در سلول‌های مدل ویلسون (HepG2)

نازیله فانی[۱]، دکتر مهدی شفیعی اردستانی*[۲]، دکتر پریچهر یغمائی[۳]، آرتین اسدی[۱]، امیر برزگر بهروز[٤]

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، واحد علوم وتحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استادیار، گروه رادیوفارماسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم وتحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

٤- کارشناس ارشد فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *بیماری ویلسون یک بیماری ارثی متابولیسم مس است و با رسوب بیش از حد مس در کبد و مغز مشخص می‌شود. D- پنی سیل آمین یکی از معروف‌ترین شلاتورهای مورد استفاده در درمان بیماری ویلسون است؛ اما نقص اصلی این دارو ناتوانی آن در ورود به فضای درون سلولی است. این مطالعه به منظور ساخت و ارزیابی خواص ضد مس درون سلولی نانوکونژوگه D- پنی سیل آمین – دندریمر در سلول‌های مدل ویلسون (HepG2) انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی تحلیلی دوزهای مختلفی از داروهای دندریمر، D- پنی سیل آمین و نانوکونژوگه D- پنی سیل آمین-دندریمر به سلول‌های مدل ویلسون تزریق شد. سپس میزان غلظت مس درون سلولی هر یک از گروه‌های سلولی دریافت کننده دارو به‌طور جداگانه با دستگاه جذب اتمی بررسی و به روش مقایسه‌ای ارزیابی گردید. غلظت مس درون سلولی با استفاده از نرم‌افزار Pharm و براساس معادله خطی محاسبه شد. سمیت نانوکونژوگه D- پنی سیل آمین-دندریمر با روش MTT Assay سنجیده شد.*

یافته ها : *گروه‌های سلولی دریافت کننده داروی نانوکونژوگه D- پنی سیل آمین-دندریمر بیشترین کاهش غلظت مس درون سلولی (18 ppm) را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند (P<۰/۰۵). غلظت مس درون سلولی ٤٦/٦١ تعیین شد. دوز به‌کار رفته برای داروی نانوکونژوگه D- پنی سیل آمین-دندریمر سمیتی از خود نشان نداد و اثری بر سلول‌های زنده نداشت.*

نتیجه‌گیری : *نانوکونژوگه کردن D- پنی سیل آمین به‌وسیله دندریمر می‌تواند سبب کاهش مس درون سلولی گردد.*

کلید واژه‌ها : *بیماری ویلسون ، نانوکونژوگه D- پنی سیل آمین – دندریمر*

* نویسنده مسؤول : دکتر مهدی شفیعی اردستانی ، پست الکترونیکی shafieeardestani@sina.tums.ac.ir

نشانی : تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، تلفن ٦٤١٢٠-٠٢١ ، نمابر ٦٦٤٦١١٧٨

وصول مقاله : ۹۳/۵/۲۸ ، اصلاح نهایی : ۹۳/۱۰/۸ ، پذیرش مقاله : ۹۳/۱۰/۲۱

مقدمه

بیماری ویلسون یک بیماری ارثی متابولیسم مس است. این وضعیت برای اولین بار توسط Kinnier Wilson در سال ۱۹۱۲ تعریف شد. از آن زمان به بعد مطالعات مرتبط با اختلالات بیوشیمیایی و اختلالات ژنتیکی بسیاری انجام شده است (۱). بیماری ویلسون یک بیماری مادرزادی متابولیسم مس به‌وسیله جهش در ژن انتقال دهنده مس (ATP7B) رخ داده و با رسوب بیش از حد مس در کبد و مغز مشخص می‌شود (۱).

داروهایی که برای خروج مس اضافی از بدن استفاده می‌شوند؛ شلاتور نام دارند. این داروها با مس کمپلکس تشکیل داده و از طریق ادرار دفع می‌شوند. مهم‌ترین داروهای شلاتور شامل پنی‌سیل آمین، تری‌انتین، زینک استات وتترا تیومولیبدات است (۲). پنی‌سیل‌آمین در واقع یک سیستئین است که در دو ناحیه با گروه‌های متیل جایگزینی صورت می‌گیرد. بیش از ۸۰ درصد پنی‌سیل‌آمینی که در ادرار ترشح می‌شود به صورت کمپلکس با مس دیده می‌شود. همچنین این ماده می‌تواند باعث القای سنتز متالوتیونین شود. متالوتیونین پروتئینی غنی از سیستئین است که به عنوان شلاتور طبیعی در بدن برای فلزات ایفای نقش می‌کند (۳و۴). به‌دلیل مکانیسم خارج سلولی و عمل غیراختصاصی D-پنی سیل آمین با سایر یون‌های بدن مانند سدیم، پتاسیم و آهن کمپلکس‌های غیرضروری ایجاد می‌کند و باعث بروز عوارض مفصلی، بیماری‌های اتوایمیون و نفروپاتیو طی ۳-۱ هفته اول درمان در

بیماران می‌شود (۵).

دارویی که در حال حاضر برای درمان بیماری ویلسون به‌کار می‌رود D–پنی سیل آمین با برند معروف Cuprimine یا Depen است. این دارو به واسطه دارا بودن گروه تیولی می‌تواند با کاتیون‌های دوظرفیتی از قبیل مس کمپلکس تشکیل داده و آنها را از بدن دفع کند. این کمپلکس محلول در آب بوده و از طریق ادرار از بدن دفع می‌شود (۶)؛ اما بزرگترین ایراد وارده آن است که سندرم‌های نورولوژیک در حدود ۵۰ درصد افراد درمان شده با D–پنی سیل آمین؛ بسیار شدید بروز می‌کند. از سوی دیگر حدود ۳۰ درصد بیماران در ماه اول واکنش‌های حساسیتی از قبیل تب، راش و لنفادنوپاتی بروز می‌دهند که البته معمولاً گذرا هستند (۷و۸). همچنین با توجه به اثر خارج سلولی این ترکیب در تشکیل کمپلکس با مس و ناتوانی آن در ورود به سلول به نظر می‌رسد بخش اعظم عوارضی که در بالا ذکر شد به این علت رخ می‌دهند.

با توجه به این که یکی از کاربردهای نانوپزشکی افزایش رسانش دارویی است؛ در آن با استفاده از موادنانو مقیاس یا مولکول‌ها سعی می شود تا میزان فراهمی زیستی داروها افزایش یابد (۹). ودندریمرها یکی از نانوساختارهایی هستندکه امروزه در بسیاری از زمینه‌های زیست پزشکی مورد توجه قرارگرفته‌اند (۱۰). این مطالعه به منظور ساخت و ارزیابی خواص ضدمس درون سلولی نانوکونژوگه D–پنی سیل آمین –دندریمر در سلول‌های مدل ویلسون (HepG2) انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی تحلیلی پلی‌اتیلن گلیکول با نام تجاری Methoxy PEG Maleimide، با وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون از شرکت BOC Sciences خریداری شد. از دستگاه اسپکتروفتومتر FT-IR مدل Nicolet ساخت آمریکا و دستگاه Zeta sizer مدل Nano ZS ساخت شرکت مال ورن انگلستان و دستگاه جذب اتمی مدل Spectr AA 220 ساخت شرکت Varian استرالیا استفاده شد.

بر روی ۵µl پلی‌اتیلن گلیکول (۰/۰۱میلی‌مول PEG)، ۲۸۴ µl (۴میلی‌مول) از محلول DMSO (خشک شده با کلرید کلسیم) ریخته شد. سپس بر روی آن ۰/۰۵gr دی سیکلوهگزیل کربوامید (۰/۰۲۵میلی‌مولDCC) به عنوان فعال‌کننده گروه‌های کربوکسیل اسیدسیتریک اضافه گردید. به‌مدت ۱۰دقیقه روی دستگاه بهم‌زن مغناطیسی گذاشته شد. بعد از گذشت ۱۰دقیقه به مقدار gr ۰/۰۰۳اسیدسیتریک (۰/۰۱۸میلی‌مول اسیدسیتریک) وزن کرده و بر روی محلول موردنظر اضافه شد. سپس به مدت نیم‌ساعت روی دستگاه بهم‌زن مغناطیسی گذاشته شد. بعد از گذشت نیم‌ساعت بر روی آن مقداری آب مقطر اضافه گردید و از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول زیری حاوی دندریمر به کیسه دیالیز منتقل شد و کیسه به فلاسک حاوی ۱۰۰میلی‌لیتر آب در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد منتقل شد. به‌مدت دو روز مداوم به‌هم زده شد و آب خارجی آن بعد از ۲۴ ساعت حذف و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب تازه به آن اضافه شد. در نهایت محلول از کیسه دیالیز خارج و تحت شرایط خلأ در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد لیوفیلیزه شد و محصول دندریمر به صورت پودر خمیری سفید رنگ به‌دست آمد.

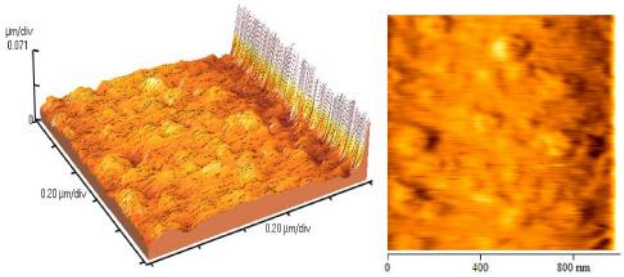
بر روی ۱۰ mg دندریمر یک میلی‌لیتر حلال PBS (فسفات بافر سالین) اضافه شد. سپس ۵ میلی گرم EDC (اتیل دی متیل آمینو پروپیل کاردی امید) اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه به‌هم زده شد. سپس ۳/۳ میلی گرم D–پنی سیل آمین اضافه و در ویال محکم بسته شد. به‌مدت ۱۵– ۱۰ دقیقه برای افزایش سطح تماس به منظور انجام واکنش شیمیایی سریع‌تر به کمک دستگاه سونیکاتور تکان شدیدی به محلول داده شد. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه محلول کدری حاصل گردید.

اندازه و بار سطحی دندریمر و نانوکونژوگه D–پنی سیل آمین–دندریمر توسط دستگاه DLS تعیین شد. در دندریمر اندازه ذرات در حدود ۹۱ نانومتر به‌دست آمد. اندازه ذرات برای کانژوگه D–پنی سیل آمین –دندریمر نیز در حدود ۱۱۰ نانومتر به‌دست آمد. بار سطحی دندریمر و نانوکونژوگه D–پنی سیل آمین–دندریمر نیز به ترتیب ۳/۳– و ۵/۲+ به‌دست آمد. بنابراین بار سطحی دندریمرها منفی بود؛ ولی هنگامی که D–پنی سیل آمین به آنها متصل شد؛ دارای بار سطحی مثبت شدند.

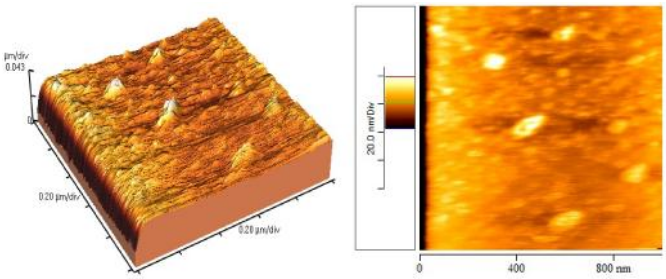
در تصویربرداری از نمونه کانژوگه D–پنی سیل آمین –دندریمر پس ازآماده سازی نمونه، ذرات به‌صورت جداگانه و یکنواخت روی لامل پخش شدند و تصاویر مناسبی از آنها گرفته شد. در حالی که اندازه حاصله با دستگاه Z-Sizer (مدل Nano ZS ساخت شرکت Mal vern انگلستان) در همخوانی کامل بود (شکل‌های ۱و۲).

برای مطالعات سلولی از کشت سلول‌های رده HEPG2 (کارسینومای هپاتوسلولار انسان) استفاده شد. محیط کشت مورد استفاده DMEM بود. محیط کشت شامل ۵ میلی‌لیتر FBS۱۰درصد، ۰/۵ میلی‌لیتر مخلوطی از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین و ۵ میلی‌لیتر آمینواسید گلوتامین بود (۱۱). تمام این مواد اولیه از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. مخلوط پنی‌سیلین و استرپتومایسین با مخلوط کردن ۰/۱ گرم استرپتومایسین و ۰/۰۰۶ میلی‌گرم پودر پنی‌سیلین به‌دست آمد. از نانوکونژوگه D–پنی سیل آمین –دندریمر برای تعیین اثر دوزهای مختلف داروی تازه سنتز شده بر روی میزان مس درون سلولی و انجام تست‌های MTT و FTIR نمونه‌برداری شد. به منظور انجام تست FTIR حدود ۲–۱ mg از مواد شامل دندریمر و D–پنی سیل آمین و نانوکونژوگه

D-پنی سیل آمین –دندریمر با میزان ۱۰-۵ میلی گرم پتاسیم بروماید (KBr) مخلوط شد و سپس به‌صورت قرص درآمد. پتاسیم بروماید در محدوده cm^{-1} ۴۰۰۰-۵۰۰ طیف ندارد (۱۲).



شکل ۱ : تصاویر AFM مربوط به دندریمر



شکل ۲ : تصاویر AFM مربوط به کانژوگه D- پنی سیل آمین – دندریمر

دوزهای مختلفی از داروهای دندریمر (با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) D- پنی سیل آمین (با غلظت‌های ۱و۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر)، نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر (با غلظت‌های ۵،۱۰، ۲۰ ، ۸۰ و ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به سلول‌های مدل ویلسون تزریق شد. سپس میزان غلظت مس درون سلولی هر یک از گروه‌های سلولی دریافت کننده دارو به‌طور جداگانه با دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری گردید.

سمیت دوزهای مختلف از داروهای D –پنی سیل آمین و نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر با روش MTT Assay سنجیده شد.

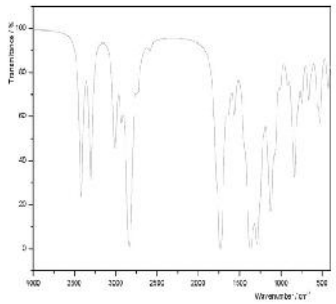
EC50 تعیین کننده دوز دارویی، حداکثر تا ۵۰ درصد در کاهش رسوب مس موثر است که با استفاده از نرم افزار Pharm و بر اساس معادله خطی $y = -۰/۱۴۲۲ x+۳۴/۴۴۵$ محاسبه شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 و آزمون‌های آماری One way ANOVA و t-student تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

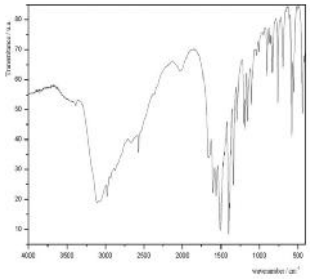
یافته‌ها

با مقایسه طیف مادون قرمز دندریمر، D-پنی سیل آمین و نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین –دندریمر به ساخته شدن نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین –دندریمر از دندریمر و D –پنی‌سیل آمین پی برده شد. در منحنی FTIR مربوط به ماده دندریمر دو پیک باریک دیده شده در دامنه طول موجی cm^{-1} ۳۵۰۰-۳۲۵۰ نشان‌دهنده حضور دو گروه OH موجود در دندریمر بود. پیک موجود در دامنه طول موجی cm^{-1} ۳۱۰۰-۲۸۰۰ مربوط به عامل CH2 و پیک موجود در دامنه طول موجی cm^{-1} ۱۸۰۰-۱۶۰۰ مربوط به گروه COOH دندریمر بود (نمودار یک).

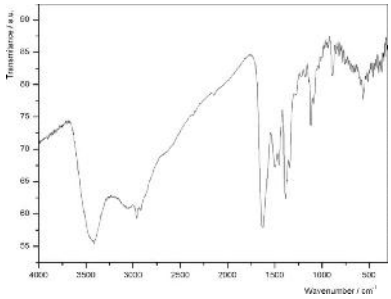
در منحنی FTIR مربوط به ماده D-پنی سیل آمین پیک‌های دیده شده در دامنه طول موجی cm^{-1} ۳۶۰۰-۲۹۵۰ نشان‌دهنده حضور گروه‌های NH2 و OH موجود در D-پنی سیل آمین بود. پیک دیده شده در دامنه طول موجی cm^{-1} ۳۱۰۰-۲۸۰۰ مربوط به حضور گروه‌های آلیفاتیک (CH2-CH3) و پیک دیده شده در دامنه طول موجی cm^{-1} ۱۷۲۰-۱۷۱۰ مربوط به حضور گروه کربونیل C=O موجود در D-پنی سیل آمین بود (شکل ۲).



نمودار ۱ : گراف FTIR از ماده دندریمر



نمودار ۲ : گراف FTIR از ماده D- پنی سیل آمین



نمودار ۳ : گراف FTIR از نانوکونژوگه D- پنی سیل آمین-دندریمر

گروه های سلولی دریافت کننده داروی نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر بیشترین کاهش غلظت مس درون سلولی (18 ppm) را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند (P<۰/۰۵) (نمودار ۴).

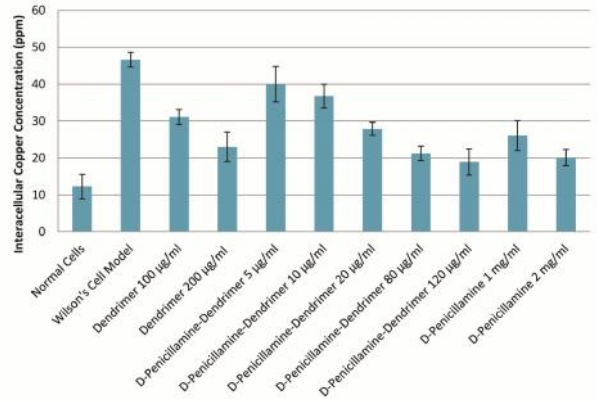
دوزهای به‌کار رفته برای داروهای D-پنی سیل آمین و نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر سمیتی از خود نشان ندادند و اثری بر سلول‌های زنده نداشتند (نمودار ۵). غلظت مس درون سلولی ۴۶/۶۱ تعیین شد (نمودار ۶).

بحث

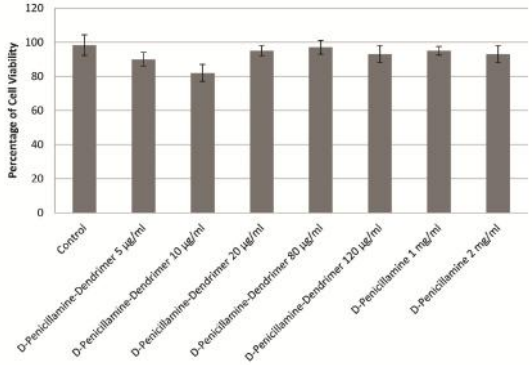
با توجه به نتایج این مطالعه گروه‌های سلولی دریافت کننده داروی نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین-دندریمر بیشترین کاهش غلظت مس درون سلولی (18 ppm) را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند.

در دهه اخیر تحقیقات مختلفی در زمینه نانوپزشکی انجام شده و در حال تبدیل شدن به محصولات تجاری درسراسر دنیا است. در مطالعه Cui و همکاران D-پنی سیل آمین که محصول تخریب پنی‌سیلین است؛ به عنوان داروی مورد تایید FDA برای شلاته کردن مس در بیماری ویلسون به عنوان شلاتور فلزی در AD آزمایش شد (۱۳).کونژوگه کردن D-پنی سیل آمین با نانو ذرات حاوی 1,2 Dioleoyl-snglycero-3-phosphoethanolamine-N-[4-(p-maleimidophenyl)butyramide] معروف به MPB-PE و pyridyldithio-propionylhosphoethanolamine معروف به PDP-PE ، D پنی سیل آمین را قادر می‌سازد با خاصیت هیدروفیلی بالا از سد خونی – مغزی عبور کند (۱۴).

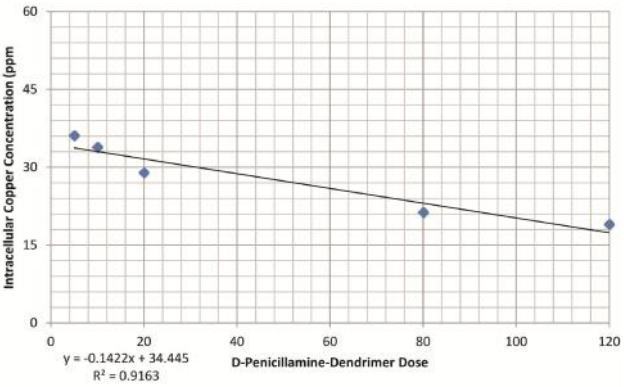
دندریمر مورد استفاده در این تحقیق کوپلیمر ۳ بلو از نوع CA-PEG-CA است. این دندریمر از یک هسته مرکزی PEG و دو اسید سیتریک در اطراف تشکیل شده است. خصوصیات منحصر به فردی در مقایسه با سایر دندریمرها دارد. دندریمرها پلی‌مرهای تطبیق‌پذیر و منعطفی هستند که امروزه به عنوان حامل‌های مناسبی در سیستم‌های بیولوژیکی مطرح هستند. در واقع آنها حامل‌های مناسبی برای انتقال داروهای ضدسرطان، ضدویروس و ضدباکتری با قابلیت افزایش حلالیت داروها هستند. اما این پلی‌مرها با محدودیت بزرگ سمی بودن در موجودات زنده رو به رو هستند. این سمیت‌ها به برهم‌کنش بارهای مثبت دندریمر با بار منفی غشای سلولی در نتیجه تخریب غشا، تشکیل حفره در آن و لیز شدن سلول نسبت داده می‌شود. سمیت‌ها شامل سمیت سلولی، خونی، همولیتیک و in vivo است (۱۵و۱۶). به دلیل اندازه نانودندریمرها ممکن است با اجزای سلولی در دامنه اندازه نانو مانند غشاهای پلاسمایی و اندامک‌های سلولی (اندوزوم، میتوکندری و هسته) برهم‌کنش داشته باشند (۱۷). به عنوان مثال دندریمرهایی مثل PPI،



نمودار ٤ : مقایسه اثر دوزهای مختلف از داروهای دندریمر،D-پنی سیل آمین، نانوکونژوگه D- پنی سیل آمین-دندریمر بر غلظت مس درون سلولی



نمودار ٥ : نمودارسنجش سمیت داروهای D-پنی سیل آمین و نانوکونژوگه D- پنی سیل آمین –دندریمر



نمودار ٦ : منحنی EC50

در منحنی FTIR مربوط به نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین – دندریمردر دامنه طول موجی cm^{-1} ۱۷۰۰ پیکی دیده نشدکه مبنی بر ترکیب گروه‌های NH2 و COOH و ایجاد پیوند آمیدی موجود در نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین –دندریمر بود. پیکی که در دامنه طول موجی cm^{-1} ۱۶۰۰ دیده شد؛ مربوط به حضور پیوند آمیدی موجود در نانوکونژوگه D-پنی سیل آمین –دندریمر بود (شکل ۳).

PAMAM و PLL به دلیل وجود بارهای مثبت بر روی خود دارای سمیت in vitro هستند (۱۸). علاوه بر این دندریمرهای ساده، کوپلی‌مرهای سنتزی بلوکه مانند Pluronics زیست تخریب‌ناپذیر بوده و در بدن ایجاد سمیت می‌کنند (۱۹). دو استراتژی کلی برای کاهش سمیت دندریمرها وجود دارد. استراتژی اول طراحی و سنتز دندریمرهای زیست تخریب‌پذیر با استفاده از هسته زیست تخریب‌پذیر و واحدهای شاخه‌دار یا استفاده از حدواسط‌های مسیرهای متابولیک است. استراتژی دوم مهندسی سطح مولکولی است که با استیله‌دارکردن کردن مولکول، PEG دار کردن، کربوهیدرات‌دار انجام می‌شود (۱۶). در سنتز دندریمر مورد استفاده در این تحقیق از هر دو استراتژی بالا کمک گرفته شد. در هسته مرکزی این دندریمر از PEG استفاده شده (مهندسی سطح مولکولی) و واحدهای اطراف آن اسیدسیتریک (حدواسط‌های چرخه کربس) هستند (استراتژی اول). به این ترتیب دندریمر حاصل یک دندریمر زیست تخریب‌پذیر است و سمیت قابل ملاحظه‌ای ندارد. این دندریمر بار منفی دارد. بنابراین با بار منفی سطح سلول برهم کنش ندارد و غشای سلولی را تخریب نمی‌کند (۱۸).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوکونژوگه کردن D-پنی سیل آمین به‌وسیله دندریمر می‌تواند سبب کاهش مس درون سلولی گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم نازیله فانی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی –بیوشیمی از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران بود. بدین‌وسیله از حمایت مالی انستیتو پاستور ایران و دانشگاه علوم پزشکی تهران و همه یاری کنندگان این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

1. Das SK, Ray K. Wilson's Disease: An Update. Nat Clin Pract Neurol. 2006; 2(9):482-93.

2. Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease. Lancet. 2007 Feb; 369(9559):397-408.

3. Iorio R, D'Ambrosi M, Marcellini M, Barbera C, Maggiore G, Zancan L, et al. Serum transaminases in children with Wilson's disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2004 Oct;39(4):331-6.

4. Sternlieb I. Wilson's Disease and pregnancy. Hepatology. 2000 Feb; 31(2): 531-32.

5. Albert C, Aynard B, Terbe V. D-Penicillamine induced rapidly progressive glomerulonephritis with membranous nephropathy in a patient with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol. 1994; 12(Suppl 11): 108.

6. Kowalsky RJ, Falen SW. Radiopharmaceuticals in nuclear pharmacy and nuclear medicine. 1st. Washington D.C: Nature. 2004; pp: 710-50.

7. Reux B, Weber V, Galmier MJ, Borel M, Madesclaire M, Madelmont JC, et al. Synthesis and cytotoxic properties of new fluorodeoxyglucose-coupled chlorambucil derivatives. Bioorg Med Chem. 2008 May; 16(9):5004-20. doi: 10.1016/j.bmc.2008.03.038

8. McCarthy TD, Karellas P, Henderson SA, Giannis M, O'Keefe DF, Heery G, et al. Dendrimers as drugs: discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention. Mol Pharm. 2005 Jul-Aug;2(4):312-8.

9. Kim BY, Rutka JT, Chan WC. Nanomedicine. N Engl J Med. 2010 Dec; 363(25):2434-43. doi: 10.1056/NEJMra0912273

10. Klajnert B, Bryszewska M. Dendrimers: properties and applications. Acta Biochim Pol. 2001;48(1):199-208.

11. Mashayekhi M, Amanlou M, Sadeghi K, Mosayebniya M, Ardestani M, Shafiee Mehravi B. Diethylentriaminepentaacetic Acid-deoxyglucoseamine (DTPA-DG): Novel Nanosized Anti-Wilson's Disease Cell Model. Am J Biomed Sci. 2013 Jan; 5(1):34-46.

12. Granqvist CG, Buhrman RA,Wyns J, Sievers AJ. Far-Infrared absorption in ultrarine al particles. Phys Rev Leet. 1976; 37(10): 625. http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevLett.37.625

13. Cui Z, Lockman PR, Atwood CS, Hsu CH, Gupte A, Allen DD, et al. Novel D-penicillamine carrying nanoparticles for metal chelation therapy in Alzheimer's and other CNS diseases. Eur J Pharm Biopharm. 2005 Feb;59(2):263-72.

14. Adelman HM, Winters PR, Mahan CS, Wallach PM. D-penicillamine-induced myasthenia gravis: diagnosis obscured by coexisting chronic obstructive pulmonary disease. Am J Med Sci. 1995 Apr;309(4):191-3.

15. Sperling RA, Gil PR, Zhang F, Zanella M, Parak WJ. Biological applications of gold nanoparticles. Chem Soc Rev. 2008; 37(9): 1896-908. doi: 10.1039/B712170A

16. Jain K, Kesharwani P, Gupta U, Jain NK. Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. Int J Pharm. 2010 Jul; 394(1-2):122-42. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.04.027

17. Kolhatkar RB, Kitchens KM, Swaan PW, Ghandehari H. Surface acetylation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers decreases cytotoxicity while maintaining membrane permeability. Bioconjug Chem. 2007 Nov-Dec;18(6):2054-60.

18. Namazi H, Adeli M. Novel linear-globular thermoreversble hydrogel ABA type copolymer from dendritic citric acide as the A blocks and poly (ethyleneglygol) as the B block. European Polymer Journal. 2003; 39(7): 1491-1500. doi: 10.1016/S0014-3057(02)00385-3

19. D'Emanuele A, Attwood D. Dendrimer-drug interactions. Adv Drug Deliv Rev. 2005 Dec;57(15):2147-62.

Original Paper

Synthesis and anti-intracellular Copper overload evaluation of Nanoconjugated D-penicillamine –Dendrimer in Wilson's model cells

Fani N (M.Sc)[1], Shafiee Ardestani M (Ph.D)*[2], Yaghmaei P (Ph.D)[3]
Assadi A (M.Sc)[1], Barzegar Behrouz A (M.Sc)[4]

[1]Department of Biochemistry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Radiopharmacy, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [3]Associate Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [4]M.Sc in Physiology, Department of Physiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Wilson's disease (WD) is caused by mutation to the cooer-transporting gene ATP7B. Chelation therapy is the main protochol of treatment for patients with Wilson's disease. D-penicillamine is one of the well-known chelator agants which is used in WD treatment but it can not enter into the intracellular space.This study was done to evaluate the synthesis and anti-intracellular Copper overload evaluation of Nanoconjugated D-penicillamine –Dendrimer in Wilson's model cells.

Methods: In this descriptive-analytic study, initially 0.01 mm polyethylene glycol (PEG) and 0.0018 mm citric acid, Dendrimer was synthesized. After purification by dialysis bag and lyophilization, 10mg dendrimer was conjugated to 3.3mg D-penicillamine. Nanoconjugated D-penicillamine-dendrimer was injected on Wilson's model cells. After incubation and centrifugation intracellular measurement of copper concentration and FTIR test were done.

Results: Copper accumulation significantly reduced in the HepG2 WD cell by Nanoconjugated D-penicillamine - Dendrimer in compared to D-penicillamine ($P<0.05$). Copper accumulation was determined to be 46.61. MTT assay showed no toxicological damage in HepG2 WD cell.

Conclusion: Nanoconjugated D-penicillamine –Dendrimer can reduces intracellular concentration of Copper.

Keywords: Wilson's Disease, Nanoconjugated D-penicillamine-dendrimer

*** Corresponding Author: Shafiee Ardestani M (Ph.D), E-mail: shafieeardestani@sina.tums.ac.ir**

Received 19 Aug 2014 **Revised** 29 Dec 2014 **Accepted** 11 Jan 2015

Cite this article as: Fani N, Shafiee Ardestani M, Yaghmaei P, Assadi A, Barzegar Behrouz A. [Synthesis and anti-intracellular Copper overload evaluation of Nanoconjugated D-penicillamine –Dendrimer in Wilson's model cells]. J Gorgan Uni Med Sci. 2016; 18(1): 114-119. [Article in Persian]