

ORIGINAL ARTICLE

Investigation of different parameters of contact time, temperature, drug concentration and dose of carbon nanotubes on the absorption process of Anahil drug in carbon nanotubes in the presence of bromelain

Shahriar Saeidian^{1*}, Nabi Khalil Aqdam², Zahra Baghaeifar¹, Seyedeh Salehe Hashemi¹

¹Faculty of Science, Payame noor University, Tehran, Iran.

²Faculty of Agriculture, payame Noor University, Tehran, Iran.

Correspondence

Shahriar Saeidian

Email: saeedian@pnu.ac.ir

How to cite

Saeidian, Sh., Khalil Aqdam, N., Baghaeifar, Z., & Hashemi, S.S. (2023). Investigation of different parameters of contact time, temperature, drug concentration and dose of carbon nanotubes on the absorption process of Anahil drug in carbon nanotubes in the presence of bromelain. *Experimental Animal Biology*, 12(46), 77-89.

ABSTRACT

Bromelain is an aqueous extract of pineapple contains a mixture of thiol proteases and non-protease components. In this research, the method of implementing the research was applied and quantitative, and by conducting the MTT test, information was collected. The results showed by increasing the dose of carbon nanotubes from 1 mg/L to 5 mg/L, the absorption efficiency increases significantly and the absorption capacity decreases and by increasing the initial concentration of Anahil drug from 50 mg/L to 300 mg/L in the dose of carbon nanotubes. No g 1/L the absorption capacity increased from 41.6 mg/g to 162.2 mg/g and in contrast the absorption efficiency decreased from 83.2 percent to 54.067 percent. The parameters of the adsorption equilibrium isotherms showed that the adsorption behavior of Anahil on carbon nanotubes follows the Freundlich model more than the Langmuir model. Also, the values obtained for parameter n in the Freundlich model for both temperatures were higher than 2, indicating the favorable adsorption of Anahil on carbon nanotubes. The results obtained from the MTT test showed that the drug Anahil in high concentrations (100 micrograms per liter) has a very strong lethal effect. It was also shown that the lethal effect of Anahil drug was more at the beginning and decreases with the passage of time. But in the case of the new drug synthesized using the introduction of the Anahil drug to the surface of carbon nanotubes, the lethality rate becomes a constant value, which indicates the gradual release of the drug over time, which is desirable for effective cancer treatment.

KEYWORDS

Bromelain, enzyme, carbon nanotube, cancer cell.

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

بررسی پارامترهای مختلف زمان تماس، دما، غلظت دارو و دوز نانولوله‌های کربنی بر فرآیند جذب داروی آناهیل در نانولوله‌های کربنی در حضور بروملین

شهریار سعیدیان^{۱*}، نبی خلیلی اقدم^۱، زهرا بقایی فر^۱، سید صالحه هاشمی^۱

چکیده

بروملین یک عصاره آبی از آناناس است که حاوی مخلوط پیچیده‌ای از پروتئازهای تیول و اجزای غیرپروتئازی می‌باشد. در این تحقیق از روش اجرای تحقیق بصورت کاربردی و کمی و با انجام آزمون MTT به گردآوری اطلاعات پرداخته شد. نتایج نشان داد که با افزایش دوز نانولوله‌های کربنی از ۱mg/L به ۵mg/L به صورت قابل توجهی بازده جذب، افزایش و ظرفیت جذب، کاهش و با افزایش غلظت اولیه داروی آناهیل از ۵۰mg/L به ۳۰۰mg/L در دوز نانولوله‌های کربنی ۱g/L ظرفیت جذب از ۴۱/۶mg/g به ۱۶۲/۲mg/g افزایش و در مقابل راندمان جذب از ۸۳/۲ درصد به ۵۴/۰۶۷ درصد کاهش یافت. پارامترهای ایزوترم‌های تعادلی جذب نشان داد که رفتار جذب آناهیل بر روی نانولوله‌های کربن از مدل فرندلیچ بیشتر از مدل لانگمویر تبعیت می‌کند. همچنین که مقادیر به دست آمده برای پارامتر n در مدل فرندلیچ برای هر دو دما، بالاتر از ۲ نشان‌دهنده جذب مطلوب آناهیل بر روی نانولوله‌های کربن بود. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که داروی آناهیل در غلظت‌های بالا (۱۰۰ میکروگرم بر لیتر)، دارای اثر کشندگی بسیار شدیدی است. همچنین نشان داده شد که تأثیر کشندگی داروی آناهیل در ابتدا بیشتر بوده و با گذشت زمان کاهش می‌یابد. اما در مورد داروی جدید سنتز شده با استفاده از وارد کردن داروی آناهیل به سطح نانولوله‌های کربنی، میزان کشندگی به یک مقدار ثابت می‌گراید که این امر نشان‌دهنده رهایش تدریجی دارو با گذشت زمان بود که مطلوب درمان کارآمد سرطان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

بروملین، آنزیم، نانولوله کربنی، سلول سرطانی.

^۱دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
^۱گروه کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

نویسنده مسئول:

شهریار سعیدیان

رایانامه: saeedyan@pnu.ac.ir

استناد به این مقاله:

سعیدیان، شهریار، خلیلی اقدم، نبی، بقایی فر، زهرا و هاشمی، سید صالحه (۱۴۰۲). بررسی پارامترهای مختلف زمان تماس، دما، غلظت دارو و دوز نانولوله‌های کربنی بر فرآیند جذب داروی آناهیل در نانولوله‌های کربنی در حضور بروملین. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۲(۴۶)، ۷۷-۸۹.

مقدمه

(*et al.*, 2013). ذرات نانو به طور گسترده‌ای در دارورسانی استفاده می‌شوند. در سالهای اخیر، توجه فراوانی به تهیه نانوساختارها به عنوان حامل‌هایی برای دارورسانی شده است، چرا که این ساختارها به دلیل کنترل و آهسته نمودن رهایش دارو، حفاظت از مولکول دارویی، اندازه ذره‌های کوچکتر از سلول، قابلیت عبور از موانع زیستی جهت رسانش دارو به محل هدف، افزایش ماندگاری دارو در جریان خون، دارورسانی هدفمند و زیست سازگاری، می‌توانند به عنوان یک سیستم دارورسانی بسیار موثر در نظر گرفته شوند، که باعث افزایش کارایی درمانی دارو می‌گردند. بنابراین در این تحقیق سعی بر بررسی تاثیر پارامترهای مختلف اعم از زمان تماس، دما، غلظت دارو و دوز نانولوله‌های کربنی بر روی فرآیند جذب داروی آن‌هیل بر بستر نانولوله‌های کربنی بوده است (*Hassan et al.*, 2019). این تحقیق از نظر ابعاد و مولفه‌های مهمی همچون بعد عملی یا کاربردی نتایج و همچنین توجه به دانش، نظریات و ادبیات موجود، دلایل مهمی برای اهمیت و ضرورت خود را دارا می‌باشد. لذا ضرورت تحقق موضوع با توجه به آمار موجود و نتایج پیشنهادات پژوهش‌های انجام شده توسط دیگران به اثبات رسیده و قابل استدلال است. نتایج تحقیق حاضر می‌تواند گشایشی در مسیر دستیابی به داروهای موثر با کمترین اثرات جانبی برای درمان سرطان روده ایجاد نماید. همچنین با توجه به پتانسیل بالای نانولوله‌های کربنی، اهمیت این تحقیق در بررسی تاثیر پارامترهای مختلف اعم از زمان تماس، دما، غلظت دارو و دوز نانولوله‌های کربنی بر روی فرآیند جذب داروی آن‌هیل بر بستر نانولوله‌های کربنی است.

پیشینه پژوهش

فعالیت ضد توموری و ضد متاستازی بروملین بر روی سلول‌های سرطانی موش توسط *Baez et al.* (2007) نشان داده شده است. *Rathnavelu et al.* (2016) گزارش کردند که بروملین منجر به کاهش تشکیل تومورهای پوستی در موش شده و *Paroulek et al.* (2009) نشان دادند که بروملین اثر ضدسرطانی بر روی سلول‌های سرطانی سینه انسان رده GI101A دارد. *Bhui et al.* (2009) نیز نشان دادند که پیش درمان با آنزیم بروملین تعداد و حجم سلول‌های سرطانی پوست در موش‌ها را کاهش می‌دهد. همچنین اخیراً نشان داده شده است که بروملین اثر ضد تکثیر بر سلول‌های سرطانی پوستی رده A431 انسانی و رده A375 موشی دارد (*Bhui et al.*, 2012).

امروزه سرطان در بسیاری از کشورهای دنیا یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر به شمار می‌آید که سلامتی انسان‌ها را به شدت تهدید می‌کند و مشکلات زیادی را برای خانواده‌ها و جوامع ایجاد می‌کند. بروملین یک عصاره آبی از آناناس است که حاوی مخلوط پیچیده‌ای از پروتئازهای تیول و اجزای غیرپروتئازی می‌باشد. پروتئاز اصلی‌ترین جزء بروملین است که شامل بروملین ساقه (۸۰٪) و بروملین میوه (۱۰٪) می‌باشد. در میان اجزای غیرپروتئازی، فسفات‌ها، گلوکز، پراکسیدها، سلولز و کربوهیدرات‌ها به چشم می‌خورد (*Varilla et al.*, 2021). بروملین می‌تواند توسط دستگاه گوارش انسان بدون آنکه تخریب شود و یا فعالیت بیولوژیکی خودش را از دست دهد، جذب شود (*Castell et al.*, 1997) شواهد حاکی از خاصیت ضدسرطانی بروملین از مشاهدات تجربی سنتی، مطالعه بر روی مدل‌های بر پایه حیوانات، سلول‌ها و مطالعات کلینیکی نشات می‌گیرد (*Agrawal et al.*, 2022). خاصیت ضدسرطانی بروملین اساساً مربوط به اجزای پروتئازی آن است (Maurer, 2001). در سلول‌های معمولی، رشد سلولی به شدت تنظیم و کنترل می‌شود. در صورت عدم توازن در چرخه سلولی، رشد سلولی غیر طبیعی شده و سلول‌های عادی به سلول‌های سرطانی تبدیل می‌شوند. نشان داده شده است که بروملین از جابجایی فاکتور kB هسته‌ای، در اثر جلوگیری فاکتور M/G2 از مرگ طبیعی سلول‌ها رخ می‌دهد و منجر به ممانعت از پیدایش سلول‌های سرطانی می‌شود (*Baez et al.*, 2007). مختل شدن مکانیزم طبیعی مرگ سلولی منجر به تغییر شکل سلول‌ها شده و مزایای رشد را برای سلول‌های سرطانی فراهم می‌کند. بروملین به صورت انتخابی باعث مرگ سلولی در سلول‌های تومور از طریق بالا بردن تاثیر p53 و ممانعت از مسیر مرگ میتوکندریایی با افزایش بیان bax و رهاسازی سیتوکروم c می‌گردد. علاوه بر این، بروملین فعالیت تنظیم کننده‌های نجات سلولی از قبیل Akt را کاهش می‌دهد. بنابراین مرگ سلولی سلول‌های سرطانی را تسریع می‌بخشد. همچنین بروملین از متاستاز سرطانی جلوگیری می‌نماید. سرطان روده بزرگ به رشد سلول‌های سرطانی در کولون یا رکتوم گفته می‌شود. این بیماری به دلیل رشد غیرطبیعی سلول‌ها اتفاق می‌افتد که می‌تواند به بافت‌های دیگر بدن حمله کنند (متاستاز) یا در آن‌ها تکثیر یابند. نشانه‌ها و علائم این بیماری می‌تواند شامل مواردی همچون خون در مدفوع، تغییر در حرکات روده، کاهش وزن و خستگی همیشگی باشد (*Amini*

دسترسی مستقیم به آنزیم بروملین از داروی آناهیل ۵۰۰ ساخت شرکت دارویی Parmoon Amin استفاده گردید. هر کپسول از این دارو حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم آنزیم بروملین بود. در این پژوهش تجربی، رده سلولی HT-29 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت DMEM (حاوی ۱۰ درصد وزنی FBS) و U/ml ۱۰۰ پنی‌سیلین و ۱۰۰ μg/(ml) استرپتومایسین در فشار ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در فلاسک ۲۵ cm³ کشت داده شد. سپس به تعداد ۱۰^۵×۱/۵ سلول بر میلی‌لیتر در پلیت‌های کشت ۲۴ خانه کشت گردید. شمارش سلولی با استفاده از لام هموسایتومتری صورت گرفت. بدین صورت که سلول‌های چهارخانه‌ی بزرگ شمارش شده و میانگین اعداد به دست آمده در ۱۰^۴ ضرب شد و تعداد سلول‌ها در هر میلی‌متر بدست آمد.

جذب آنزیم بروملین بر بستر نانو

ابتدا به منظور تهیه محلول استوک، مقدار یک گرم از داروی آناهیل ۵۰۰ به یک لیتر متانول اضافه شد و با استفاده حمام التراسونیک به مدت یک ساعت همگن شد. سپس برای رسم منحنی کالیبراسیون دستگاه اسپکتروفوتومتری، محلول رقیق شده و محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۵ mg/L تا ۵۰ از داروی آناهیل تهیه گردید. این نمونه‌ها در دستگاه اسپکتروفوتومتری قرار داده شدند و مقدار پارامتر جذب برای هر کدام از محلول‌های استاندارد به دست آمد. با رسم نمودار غلظت محلول حاوی آناهیل بر حسب پارامتر جذب حاصل از دستگاه اسپکتروفوتومتری، نمودار کالیبراسیون جذب اسپکتروفوتومتری برای داروی آناهیل به دست آمد. از این نمودار برای بدست آوردن غلظت نمونه‌های حاصل از آزمایشات مختلف و میزان جذب دستگاه اسپکتروفوتومتری استفاده شد. کلیه آزمایش‌های جذب در محیط بسته و در داخل ارلن‌های با حجم ۲۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از غلظت‌های مشخصی از محلول حاوی داروی آناهیل و جاذب در دما و زمان‌های تماس مختلف انجام شد. نمونه‌های مورد آزمایش، پس از تثبیت شرایط مورد بررسی، در داخل همزن با دور 240 rpm به منظور اختلاط مناسب جاذب و ماده جذب شونده، قرار داده شدند و پس از طی زمان مشخصی، جاذب با استفاده از صافی نانومتری از محلول جدا و غلظت‌های باقی‌مانده دارو با استفاده از نمودار کالیبراسیون دستگاه اسپکتروفوتومتر در حداکثر طول موج جذب آناهیل مورد سنجش قرار گرفت. PH محلول‌ها با استفاده از اسید کلریدریک ۰/۱ مولار و هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار در حدود ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم گردید (Bhatnagar et al., 2015). هر مرحله

Amini et al. (2013)، تاثیر آنزیم بروملین را بر روی چهار رده سلول سرطانی روده انسان اعم از KATO-III، MKN45، HT29-5M21 و HT29-5F12 بررسی کردند. نتایج نشان داد که آنزیم بروملین در غلظت‌های ۲۹، ۳۴، ۹۴ و ۱۴۲ μg/mL از تکثیر سلول‌های سرطانی HT29-5F12، HT29-5M21، MKN45 و KATO-III به ترتیب جلوگیری می‌کند.

Bhatnagar et al. (2015) یک نانوذره حاوی آنزیم بروملین سنتز کردند و نشان دادند که نسبت به خود آنزیم بروملین خاصیت ضد سرطانی بالاتری دارد. فرمولاسیون نانوذره سنتز شده منجر به افزایش رهایش آنزیم بروملین شد. Bhatnagar et al. (2016)، یک کوپلیمر PLGA با توانایی هدف‌گیری سلول‌های سرطانی ایجاد کرده و آنزیم بروملین را در داخل این کوپلیمر کپسوله کردند. مطالعات بالینی نشان داد که استفاده از نانوذرات منجر به افزایش بلعیده شدن آن توسط سلول‌های سرطانی و بیان فاکتور CD44 می‌شود. He et al. (2020) محلولی از نانولوله‌های تک دیواره که با پلی‌اتیلن گلیکول پوشش داده شده، به همراه یک زنجیره تری‌پپتیدی آرژنین-گلايسین-آسپاراتات مربوط به سلول‌های سرطانی هدف که به انتهای زنجیره‌های پلی‌اتیلن گلیکول متصل شده بودند، آماده نمودند. پس از تزریق این محلول به موش‌های آزمایشگاهی سرطانی، نانولوله‌های تک دیواره در تومورها تجمع پیدا کردند. آن‌ها نشان دادند که داروی DOX به همراه نانولوله‌های تک دیواره اثر چشمگیری بر روی از بین بردن سلول‌های سرطانی U87 از خود نشان می‌دهد. Chen et al. (2012)، نانولوله تک دیواره با قطر ۰/۸ تا ۱/۲ نانومتر و طول ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر را با سامانه آمینوسی به نام DSPE-PEG2000-Amoni به وسیله روش مافوق صوت عامل‌دار کردند. این مجموعه با siRNA واکنش داده و اثر آن بر روی سلول‌های سرطان سینه مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج این آزمون نشان داد که عامل‌دار کردن نانولوله‌های کربنی تاثیر شگرفی بر کاهش روند رشد و پیشرفت بیماری سرطان دارد.

روش شناسی پژوهش

در این تحقیق از روش اجرای تحقیق، بصورت کاربردی و کمی با انجام آزمون انجام شد. روش گردآوری اطلاعات در این پژوهش بصورت کتابخانه‌ای و میدانی بود. در روش کتابخانه‌ای، جمع‌آوری اطلاعات مورد نیاز از طریق بررسی کتب، مجلات و اسناد علمی انجام گردید. در روش میدانی نیز با استفاده از آزمون MTT به گردآوری اطلاعات پرداخته شده است. به دلیل عدم

میلی گرم بر لیتر و غلظت‌های آن‌هایل ۵۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در نظر گرفته شد. در اینجا نیز روش تهیه نمونه‌ها مانند حالت‌های قبل بوده با این تفاوت که مقدار ۵۰ میلی‌گرم برای تهیه محلول با غلظت نانولوله در غلظت پنج گرم بر لیتر توزین شده و به ده میلی‌لیتر متانول افزوده شد. برای دستیابی به غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر داروی آن‌هایل ۵۰۰ نیز به ترتیب ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم از دارو توزین شده و به محلول حاوی نانولوله اضافه شد. سپس با افزودن محلول ۰/۱ مولار هیدروکسید سدیم و محلول ۰/۱ مولار اسید کلریدریک به محلول نمونه، pH نمونه برابر با ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم شد. سپس نمونه‌ها به مدت زمان تماس بهینه بدست آمده در همان pH در داخل حمام التراسونیک به منظور تماس دارو و نانولوله قرار داده شد. سپس نانو لوله‌ها با استفاده از مگنت از محلول‌ها جدا شده و باقی مانده درون دستگاه اسپکتروفوتومتری قرار گرفت تا میزان جذب و در نهایت غلظت داروی آن‌هایل ۵۰۰ در محلول باقی مانده بدست آمد. با استفاده از رسم نمودار درصد جذب داروی آن‌هایل بر حسب غلظت‌های مختلف دارو و دُوز نانو لوله‌ی کربنی، تاثیر این دو پارامتر بر روی جذب داروی آن‌هایل ۵۰۰ بر روی نانو لوله‌های کربنی مشخص شد.

بررسی اثر دما

در مرحله‌ی آخر برای تعیین دمای بهینه و همچنین مطالعه ترمودینامیکی، فرآیند جذب در دو دمای مختلف ۳۵ و ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نیز انجام گرفت. در هر دما از سه نمونه محلول حاوی آن‌هایل با مقدار جاذب، pH و زمان تماس بهینه استفاده شد. برای تنظیم دما و سرعت هم‌زدن از شیکر-انکوباتور استفاده شد. در کلیه مراحل آزمایش از نمونه‌های با غلظت مشابه از آن‌هایل بدون جاذب به عنوان شاهد استفاده شد. بدین منظور تاثیر دما بر روی درصد جذب داروی آن‌هایل از محلول آبی با غلظت‌های مختلف ۵۰ mg/L، ۱۵۰ mg/L و ۳۰۰ mg/L تحت شرایط بهینه pH، زمان تماس و غلظت جاذب یک g/L بررسی شد. لازم به ذکر است که در اینجا نیز شش نمونه آماده شد. برای تهیه دو نمونه اول مقدار ده میلی‌گرم نانولوله و ۰/۵ میلی‌گرم از داروی آن‌هایل، برای تهیه دو نمونه دوم مقدار ۱۰ میلی‌گرم نانولوله و ۱/۵ میلی‌گرم از داروی آن‌هایل و برای تهیه دو نمونه سوم مقدار ده میلی‌گرم نانولوله و سه میلی‌گرم از داروی آن‌هایل توزین شده و به ده میلی‌لیتر متانول افزوده شد. دمای حمام التراسونیک برای هر مجموعه از نمونه‌ها به ترتیب در دمای ۳۵ و ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم شد و نمونه‌ها به مدت زمان تماس

آزمایش سه بار تکرار شد و میانگین آنها به صورت نتایج نهایی ارائه گردید. مقدار آن‌هایل جذب شده روی جاذب و راندمان جذب آن با استفاده از رابطه ۱ به دست می‌آید.

$$Q_e = \frac{(C_0 - C_e)}{M} V \quad \text{رابطه ۱}$$

در رابطه ۱، q_e میلی‌گرم آن‌هایل جذب شده روی گرم جاذب، C_0 و C_e به ترتیب غلظت تعادلی و اولیه آن‌هایل بعد از جذب سطحی، M و V نیز به ترتیب جرم جاذب به گرم و حجم محلول به لیتر است.

بررسی اثر زمان تماس

با استفاده از pH بهینه و غلظت ۱۰۰ mg/L آن‌هایل و مقدار جاذب ۱ g/L، زمان تماس در یک دوره ۱۸۰ دقیقه‌ای، تحت دمای محیط مطالعه و زمان تعادل مشخص گردید. برای تهیه محلول‌های نمونه مقدار یک میلی‌گرم آن‌هایل و ده میلی‌گرم نانو لوله‌ی کربنی مغناطیسی، درون ۱۰ میلی‌لیتر متانول ریخته شده و به مدت یک ساعت درون حمام التراسونیک قرار گرفت تا همگن شود. سپس با افزودن محلول ۰/۱ مولار هیدروکسید سدیم و محلول ۰/۱ مولار اسید کلریدریک به محلول نمونه، pH نمونه برابر با ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم شد. سپس نمونه‌ها در زمان‌های تماس ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه در همان pH در داخل حمام التراسونیک به منظور تماس دارو و نانولوله قرار داده شد. سپس نانو لوله‌های کربنی با استفاده از مگنت از محلول‌ها جدا شده و درون دستگاه اسپکتروفوتومتری قرار گرفت تا میزان جذب و در نهایت غلظت داروی آن‌هایل در محلول باقی مانده بدست آمد. با استفاده از رسم نمودار، درصد جذب داروی آن‌هایل بر حسب زمان‌های تماس مختلف، زمان تماس بهینه که در آن ماکزیمم جذب دارو توسط نانو لوله‌ی کربنی مغناطیسی رخ داده بود، بدست می‌آید. لازم به ذکر است که از نتایج این مرحله، معادلات سینتیکی جذب حاصل شد.

بررسی اثر غلظت‌های مختلف دارو و دُوز نانولوله

در مرحله بعد در pH و زمان تماس بهینه و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، تاثیر غلظت‌های مختلف نانولوله‌های کربنی ۱ و ۵ گرم بر لیتر و محلول آن‌هایل ۵۰۰ با غلظت‌های ۵۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مطالعه و به دنبال آن ایزوترم‌های تعادلی فرآیند جذب بررسی گردید. لازم به ذکر است که در اینجا شش نمونه آماده شد که در سه نمونه اول دُوز نانولوله برابر یک گرم بر لیتر و غلظت‌های آن‌هایل ۵۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و در سه نمونه دوم دُوز نانولوله برابر پنج

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام شد و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از طرح کاملاً تصادفی بهره گرفته شد. مقایسات میانگین نیز بروش حداقل اختلافات معنی دار در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت. تمامی تیمارهای با سطوح کمی نیز با روش رگرسیون ساده و چند متغیره با استفاده از نرم افزار SAS به کمک رویه Proc nlin و Proc reg و همچنین نرم افزار GraphPad prism تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج

جذب داروی آناهیل بر روی نانولوله‌های کربنی (تأثیر زمان تماس)

تأثیر زمان تماس بر ظرفیت جذب آناهیل بر روی نانولوله‌های کربنی در pH بهینه برابر با ۷/۲ تا ۷/۴، با غلظت اولیه دارو برابر با ۵۰ mg/L و غلظت نانوذرات یک g/L در شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می‌گردد، ظرفیت جذب در زمان ۹۰ دقیقه با غلظت اولیه ۵۰ mg/L آناهیل، ۴۱/۶ mg/g بوده و در ادامه با افزایش زمان از ۹۰ تا ۱۸۰ دقیقه ظرفیت جذب تنها در حدود ۰/۲ mg/g افزایش پیدا کرده است. بنابراین برای ادامه بررسی‌ها، زمان ۹۰ دقیقه به عنوان زمان تعادلی در نظر گرفته شد. همچنین مقدار جذب آناهیل بر روی نانولوله‌های کربنی در ۳۰ دقیقه اول خیلی بیشتر و سریع‌تر از زمان‌های بعدی است (شکل ۱). بررسی کمی میزان جذب داروی آناهیل بر روی نانولوله‌های کربنی با استفاده از یک تابع رگرسیون غیر خطی نمائی، بیانگر بیان قابل قبول تغییرات این سطوح کمی با استفاده از این مدل است (ضریب تبیین برابر ۹۹ درصد). بدین ترتیب که بیشترین میزان جذب (Y_{max})، ۴۶/۴۵ میلی گرم بر گرم و نیمه عمر زمان برابر ۴۷/۱۲ دقیقه محاسبه شد. این پارامتر بیانگر زمانی است که در آن جذب داروی آناهیل به ۵۰ درصد حداکثر مقدار خود می‌رسد. ضمن اینکه شیب افزایش جذب داروی آناهیل با گذشت زمان ۰/۰۲۲۲ میلی گرم بر گرم بازای هر دقیقه بدست آمد (جدول ۱).

بهینه و با pH بهینه در داخل حمام التراسونیک قرار داده شدند تا همگن شوند. سپس نانو لوله‌ها با استفاده از مگنت از محلولها جدا شده و باقی‌مانده درون دستگاه اسپکتروفوتومتری قرار گرفت تا میزان جذب و در نهایت غلظت داروی آناهیل در محلول باقی‌مانده بدست آمد. با استفاده از رسم نمودار درصد جذب داروی آناهیل بر حسب غلظت‌های مختلف دارو در دماهای مختلف، تأثیر پارامتر دما بر روی جذب داروی آناهیل بر روی نانولوله‌های کربنی مشخص شد.

تست دارو بر سلول‌های سرطانی (تست دفع تریپان بلو)

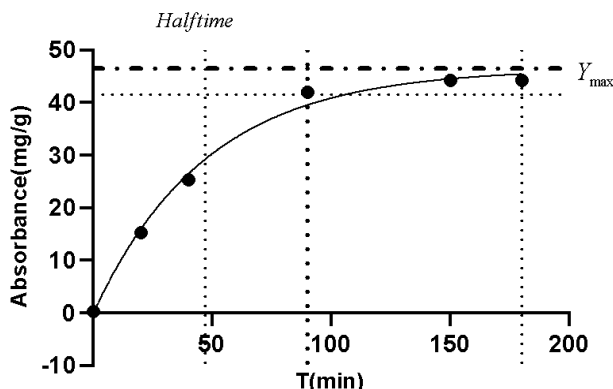
تست دفع تریپان بلو برای تعیین سلول‌های زنده در سوسپانسیون سلولی استفاده می‌شود. غشاهای سلولی سلول‌های زنده انتخاب پذیر بوده و به رنگ تریپان بلو اجازه نمی‌دهد تا وارد سلول شود. سوسپانسیون سلولی مخلوط شده با رنگ آبی درون یک سیتومتر قرار داده شد. سلول‌های زنده دارای سیتوپلاسم شفاف و سفید هستند و سلول‌های مرده دارای سیتوپلاسمی آبی رنگ می‌باشند. تعداد کل سلول‌ها در میلی‌متر در سوسپانسیون با استفاده از رابطه دو محاسبه گردید (Dhandayuthapani *et al.*, 2012).

$$\text{Viable cell (\%)} = \frac{\text{Total number of viable cell per ml}}{\text{Total number of cells}} \quad (\text{رابطه ۲})$$

در مرحله اول به منظور بررسی تأثیر آنزیم بروملین به تنهایی، سلول‌های سرطانی از فلاسک‌های جمعیتی بافت جدا شد و با استفاده از ۰۵/۰٪ trypsin-EDTA شسته شده و در محیط رشد مجدداً قرار داده شد. تعداد آن با استفاده از تست تریپان بلو شمرده شده و به مقدار ۱۰۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر رقیق گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول حاوی ۱۰۰۰۰ سلول در پلیت‌ها ریخته می‌شود و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. روز دوم، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول داروی آناهیل خالص و نانولوله‌های کربنی حاوی داروی آناهیل با غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر به پلیت‌ها اضافه شد. بعد از قرار گرفتن نمونه‌ها در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت، ۲۰ میکرولیتر از MTT به تمامی پلیت‌ها اضافه شده و مجدداً به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد و در ادامه میزان جذب در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

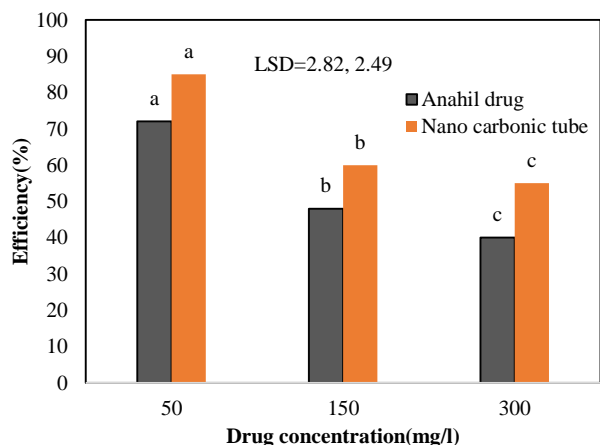
جدول ۱. نتایج برازش مدل یک فاز نمائی بر میزان جذب داروی آناهیل بر روی نانولوله‌های کربنی در طی زمان

Model	Y_{max}	Y_0	K	Halftime	R^2	SS
$Y = Y_{max} + (Y_{max} - Y_0) \times \exp(-k \times X)$	46.45	-0.0212	0.02122	47.12	0.99	31.09



شکل ۱. تاثیر زمان تماس بر میزان جذب آنهیل از محلول آبی. (غلظت دارو ۵۰ mg/L، غلظت نانولوله ۱ g/L، pH برابر با ۷/۲ تا ۷/۴ و دما ۳۵ درجه سانتی‌گراد)

۳۰۰ mg/L با افزایش دما از ۳۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد، راندمان جذب از ۵۴ درصد به ۳۹/۹۷ درصد کاهش یافت.



شکل ۲. بررسی تاثیر دما بر راندمان حذف داروی آنهیل از محلول‌های آبی حاوی غلظت‌های مختلف دارو. (غلظت نانولوله‌ها ۱ g/L و pH برابر با ۷/۲ تا ۷/۴)

ایزوترم‌های جذب

پارامتر C_e/q_e بر حسب C_e در دمای ۳۵ درجه و همین پارامترها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به منظور مشخص شدن پارامترهای مربوط به مدل لانگمویر رسم گردید. برای مشخص شدن پارامترهای مربوط به مدل جذب فرندلیچ $\ln q_e$ بر حسب $\ln C_e$ به ترتیب در دماهای ۳۵ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسم گردید. با توجه به رگرسیون خطی انجام شده، پارامترهای مربوط به مدل‌های جذب لانگمویر و فرندلیچ با توجه به روابط بیان شده، محاسبه و در جدول ۲ مقایسه شده‌اند.

تاثیر غلظت اولیه آنهیل و مقدار جاذب

پس از مشخص شدن زمان تماس و pH بهینه برای جذب داروی آنهیل بر روی نانولوله‌های کربنی، تاثیر غلظت اولیه محلول دارو و همچنین دوز جاذب اضافه شده در محلول مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، میزان جذب در غلظت‌های مختلف نانولوله‌های کربنی یک و پنج گرم بر لیتر و محلول آنهیل با غلظت‌های ۵۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، با افزایش دوز نانولوله‌ها از ۱ mg/L به ۵ mg/L به صورت معنی‌دار ($p < 0.001$) بازده جذب، افزایش و ظرفیت جذب، کاهش پیدا می‌کند. همچنین با افزایش غلظت اولیه داروی آنهیل از ۵۰ mg/L به ۳۰۰ mg/L در نانولوله‌ها ۱ g/L ظرفیت جذب از ۴۱/۶ mg/g به ۱۶۲/۲ mg/g افزایش و در مقابل راندمان جذب از ۸۲/۲ درصد به ۵۴/۰۶۷ درصد کاهش یافته است.

تاثیر دما

بررسی‌ها در دو دمای ۳۵ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفته است. در شکل ۲ تاثیر دما بر روی درصد حذف داروی آنهیل از محلول آبی با غلظت‌های مختلف ۵۰ mg/L، ۱۵۰ mg/L و ۳۰۰ تحت شرایط بهینه pH برابر ۷/۲ تا ۷/۴، زمان تماس برابر ۹۰ دقیقه و غلظت جاذب ۱ g/L نشان داده شده است.

بر اساس شکل ۲، با افزایش دما از ۳۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد در کلیه غلظت‌های اولیه محلول آبی حاوی آنهیل، راندمان جذب کاهش یافته است. به طور مثال در غلظت اولیه محلول آبی حاوی داروی برابر با ۱۵۰ mg/L با افزایش دما از ۳۵ تا ۵۰، راندمان جذب از ۷۲ درصد به ۴۷/۸ درصد و در غلظت اولیه برابر

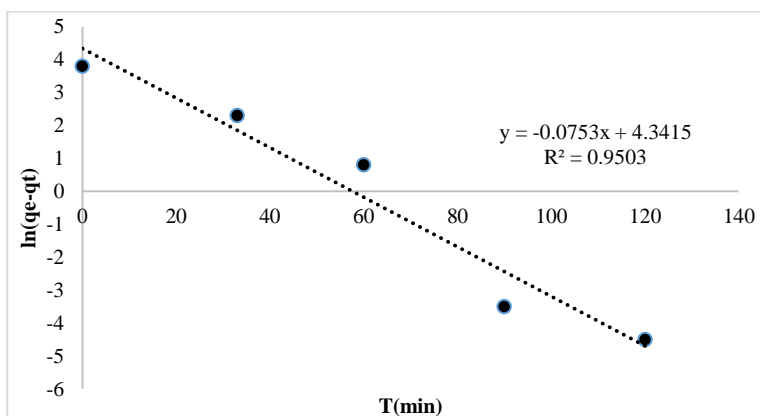
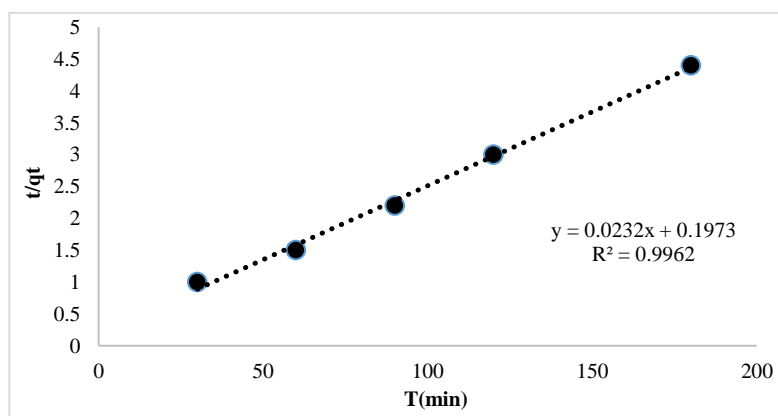
جدول ۲. پارامترهای ایزوترم‌های تعادلی جذب آناهیل بر روی نانولوله‌های کربنی (غلظت نانولوله‌ها ۱ g/L و pH برابر با ۷/۲ تا ۷/۴)

جذب مدل ایزوترم جذب						دمای محلول (C)
لانگمویر مدل فرندلیچ			لانگمویر مدل لانگمویر			
R ²	N	Kf	R ²	kL	q0	
۰/۹۸۸۹	۲/۱۰۵۱۰۵	۱۴/۷	۰/۹۱۳۵	۰/۰۲۲۲۰۲۱۰/۲۱۰۲۱۰	۲۰۸/۲۰۲۰۳۳	۳۵
۰/۹۵۸۸	۲/۲۲۲۱۰/۲۲۱۰	۱۰/۷۸۷۷۸۷۸۷۸۱۰۷۸	۰/۹۲۲۱	۰/۰۱۶۱	۱۵۲/۸۴۶	۵۰

سینتیک جذب

به منظور بررسی رفتار سینتیکی جذب آناهیل، داده‌های مربوط به میزان جذب دارو بر روی نانولوله‌های کربنی در زمان‌های تماس مختلف، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و pH برابر با ۷/۲ تا ۷/۴ استفاده شد و پارامترهای مربوط به مدل‌های شبه درجه‌ی اول و شبه درجه دوم محاسبه گردید. بدین منظور در شکل‌های ۳ و ۴ به ترتیب پارامتر $\ln(q_e - q_t)$ بر حسب t و t/q_t بر حسب t رسم شده و رگرسیون خطی بر روی آن‌ها انجام شده است. در جدول ۳، پارامترهای مربوط به مدل‌های سینتیکی شبه درجه‌ی اول و شبه درجه‌ی دوم با استفاده از رگرسیون خطی انجام شده در شکل‌های ۳ و ۴ محاسبه و گزارش شده است.

نتایج به دست آمده از پارامترهای ایزوترم‌های تعادلی جذب گزارش شده در جدول ۲ نشان می‌دهد که رفتار جذب آناهیل بر روی نانولوله‌های کربن از مدل فرندلیچ بیشتر از مدل لانگمویر تبعیت می‌کند. مشاهده می‌شود که مقادیر به دست آمده برای پارامتر n در مدل فرندلیچ برای هر دو دما، مقداری بالاتر از دو دارد. در این تحقیق، حداکثر ظرفیت جذب بر مبنای مدل لانگمویر در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و برابر با ۲۰۸/۳ mg/L به دست آمد. همچنین مقادیر ثابت فرندلیچ K_f در دمای ۳۵ و ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به ترتیب برابر با ۱۴/۷۳ و ۱۰/۸۱ به دست آمد که هر دوی این مقادیر نشان‌دهنده جذب مطلوب آناهیل بر روی نانولوله‌های کربن است.

**شکل ۳.** نمودار تغییرات $\ln(q_e - q_t)$ بر حسب زمان تماس (t) (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، غلظت نانولوله‌ها ۱ g/L و pH برابر با ۷/۲ تا ۷/۴)**شکل ۴.** نمودار تغییرات t/q_t بر حسب زمان تماس (t) (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، غلظت نانولوله‌ها ۱ g/L و pH برابر با ۷/۲ تا ۷/۴)

جدول ۳. مقادیر پارامترهای سینتیکی فرآیند جذب آناهیل بر روی نانو لوله‌های کربنی (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، غلظت نانولوله ۱ g/L و pH برابر با ۷/۲ تا ۷/۴)

مدل سینتیکی				q _e (experimental)		
شبه درجه دوم		شبه درجه اول				
r ²	K2	q _e	r ²	K1	q _{e cal} (mg/g)	
۰/۹۹۷۷	۰/۰۰۲۹	۴۴/۲۴۳	۰/۹۵۶۳	۰/۰۷۵	۷۱/۷۳۳	۴۱/۶۳۰

جدول ۵ به ترتیب تاثیر داروی آناهیل و نانولوله‌های کربنی حاوی آناهیل بر سلول‌های HT-29 نشان داده شده است.

نتایج حاصل از آزمون MTT نشان می‌دهد که داروی آناهیل در غلظت‌های بالا (۱۰۰ میکروگرم بر لیتر)، دارای اثر کشندگی بسیار شدیدی است. مشاهده می‌گردد که بعد از طی ۷۲ ساعت، سلول‌ها به شدت واکوئله شده و کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) در میزان سلول‌های زنده نسبت به نمونه‌ی کنترل رخ داده است.

برای بررسی تاثیر داروی آناهیل و نانولوله‌های کربنی حاوی آناهیل (غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر) با گذشت زمان بر روی سلول‌های سرطانی HT-29 با توجه به نحوه تغییرات داده‌ها در سطوح کمی زمان، از یک تابع رگرسیون غیرخطی فاز کاهشی نمائی بهره گرفته شد. برپایه این نتایج، زمانی که اثر کشندگی نانولوله‌های کربنی بر سلول‌های سرطانی به ۵۰ درصد حداکثر مقدار خود می‌رسد، بعد از ۲۰ ساعت و ۱۸ دقیقه اتفاق می‌افتد در حالیکه زمان اثر کشندگی داروی آناهیل روی سلول‌های سرطانی در این مدل بعد از گذشت ۵ ساعت و ۳۸ دقیقه بود (جدول ۲)، که این حاکی اثر کشندگی بیشتر داروی آناهیل روی سلول‌های سرطانی است.

مقادیر به دست آمده برای ضریب همبستگی مدل‌های سینتیکی در جدول ۳ بیان‌گر این است که فرآیند جذب آناهیل بر روی نانو لوله‌های کربنی از مدل سینتیکی شبه درجه دوم تبعیت می‌کند. همچنین منحنی‌های نشان داده شده در شکل‌های ۳ و ۴ نشان می‌دهند که داده‌های تجربی حاصل از آزمایشات جذب، با معادله سینتیکی شبه درجه دوم تطابق بالاتری دارد. مقدار داروی جذب شده در حالت تعادلی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در محلولی حاوی ۵۰ mg/L دارو و ۱ g/L نانولوله به دست آمده از انجام آزمایشات ۴۱/۶۲ است که این عدد به عدد پیش‌بینی شده توسط مدل سینتیکی شبه درجه‌ی دوم برابر با ۴۴/۲۴ بسیار نزدیک است.

تاثیر بر روی سلول‌های سرطانی HT-29

سلول‌ها در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف داروی آناهیل و نانوکربن‌های حاوی آناهیل برابر با ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت داده شدند. درصد بقای سلول‌ها توسط آزمون MTT سنجیده شد. در جدول ۴ و

جدول ۴. درصد سلول‌های زنده HT-29 در حضور غلظت‌های مختلف داروی آناهیل در مقایسه با نمونه کنترل در مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش MTT (P<۰/۰۰۱ سطح معنی‌داری)

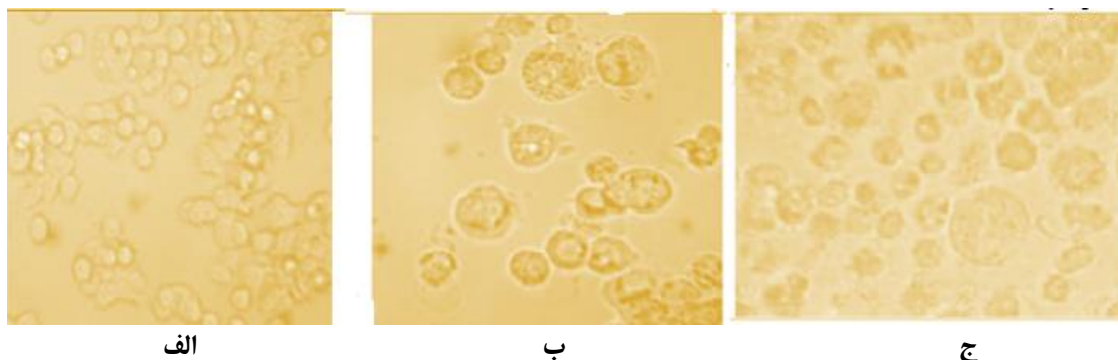
نمونه/غلظت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
کنترل	۰±۱۰۰ ^a	۰±۱۰۰ ^a	۰±۱۰۰ ^a
۰/۱ میکروگرم بر لیتر	۳۲/ ۱±۲۳/۹۷ ^a	۶۳/ ۲±۳۶/۹۶ ^a	۱۲/ ۴±۳۳۰/۹۴ ^b
۱ میکروگرم بر لیتر	۷۰/ ۷±۴۴/۹۱ ^a	۰۷/ ۵±۸۴ ^b	۱۸/ ۳±۶۹ ^c
۱۰ میکروگرم بر لیتر	۶۸/ ۵±۸۲/۷۱ ^a	۱۲/ ۴±۵۹ ^b	۲۹۰/ ۵±۴۳ ^c
۱۰۰ میکروگرم بر لیتر	۳۳۰/ ۲±۶۳/۲۵ ^a	۶۸/ ۲±۲۲ ^b	۲۶/ ۵±۳۳/۲۰ ^c

جدول ۵. درصد سلول‌های زنده HT-29 در حضور غلظت‌های مختلف نانو لوله‌های حاوی داروی آناهیل در مقایسه با نمونه‌ی کنترل در مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش MTT (P<۰/۰۰۱ سطح معنی‌داری)

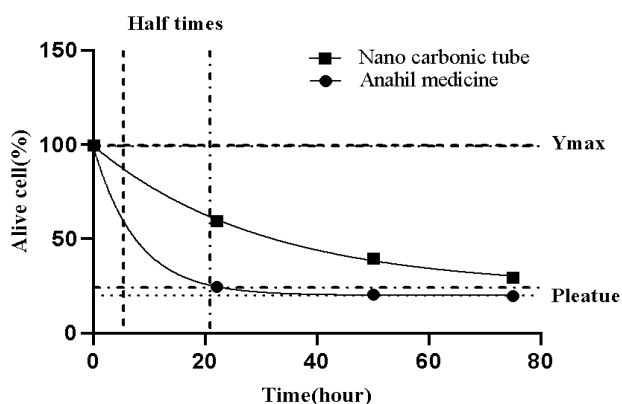
نمونه/غلظت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
کنترل	۰±۱۰۰ ^a	۰±۱۰۰ ^a	۰±۱۰۰ ^a
۰/۱ میکروگرم بر لیتر	۰۶/ ۰±۲/۹۹ ^a	۱±۸۰/۹۸	۰۴۲/ ۱±۲۷/۹۸ ^b
۱ میکروگرم بر لیتر	۲۰/ ۰±۴/۹۷ ^a	۱۱/ ۱±۲۳/۹۵ ^b	۸۰/ ۱±۲۳/۹۳ ^c
۱۰ میکروگرم بر لیتر	۸۵/ ۲±۷۵/۸۰ ^a	۱۷/ ۷±۶۴ ^b	۴۲/ ۱±۹/۴۹ ^c
۱۰۰ میکروگرم بر لیتر	۱۶/ ۸±۱/۶۰ ^a	۷۲/ ۱±۲/۳۸ ^b	۶۳/ ۴±۱۵/۳۱ ^c

مقدار span یک پارامتر مهم در مدل محسوب شده و موید درصد سلول‌های کشته شده سرطانی با استفاده از دو نوع دارو است که مقدار آن در داروی آناهیل بیشتر از داروی دیگر است. ضمن اینکه تاثیر کشندگی داروی آناهیل در ابتدا بیشتر بوده و با گذشت زمان کاهش می‌یابد. اما در مورد داروی جدید سنتز شده با استفاده از وارد کردن داروی آناهیل به سطح نانولوله‌های کربنی، میزان کشندگی با گذشت زمان با شیب کمتری نسبت به استفاده مستقیم از داروی آناهیل افزایش یافته که این امر نشان‌دهنده رهایش تدریجی دارو با گذشت زمان است.

شیب اثر کشندگی داروی آناهیل و نانولوله‌های کربنی روی سلول‌های سرطانی نیز به ترتیب $0/1294$ و $0/033$ بدست آمد که شیب بیشتر بیانگر اثر کشندگی روی سلول‌های سرطانی در داروی آناهیل است. درصد سلول‌های زنده سرطانی در محیط اثر داروی آناهیل نیز کمتر از درصد سلول‌های سرطانی بعد از تاثیر نانولوله‌های کربنی بود. مقدار تائو (Tau) نیز بیانگر درصد سلول‌های زنده در زمانی است که اثر کشندگی داروها به ۵۰ درصد حداکثر مقدار خود می‌رسد که مقدار تائو در محیط اثر داروی آناهیل به مرتب بیشتر از محیط اثر داروی نانولوله‌های کربنی روی سلول‌های سرطانی است.



شکل ۵. تغییر مورفولوژی سلول‌های سرطانی HT-29 در اثر القای آپوپتوز پس از گذشت زمان ۷۲ ساعت از تیمار، بزرگنمایی ۴۰۰ برابر نمونه‌ی حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر نانولوله‌ی کربنی حاوی آناهیل ($41/62$ میلی‌گرم آناهیل به ازای یک گرم نانولوله‌ی کربنی). الف) نمونه کنترل، ب) نمونه حاوی ۱۰۰ میکروگرم (بر لیتر داروی آناهیل)، ج) نمونه حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر نانولوله‌ی کربنی حاوی آناهیل ($41/62$ میلی‌گرم آناهیل به ازای یک گرم نانولوله کربنی)



شکل ۶. مقایسه‌ی عملکرد داروی آناهیل و نانولوله‌های کربنی حاوی آناهیل بر روی سلول‌های سرطانی HT-29 با گذشت زمان (غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر)

جدول ۶. نتایج برازش مدل فاز کاهشی نمائی بر میزان اثر داروی آناهیل و داروی مبتنی بر نانولوله‌های کربنی بر سلول‌های سرطانی در طی زمان

Model	Ymax	Plateau	K	Halftime	Tau	Span
$Y = Span \times \exp^{-K \times X} + Plateau$	99.51	24.18	0.0333	20.18	30.02	75.33
	99.33	20.09	0.1294	5.38	70.73	79.24

بحث

است. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، تیمار سلول‌های سرطانی روده HT-29 با داروی آناهیل منجر به تغییرات در شکل سلول‌ها می‌گردد. این تغییرات شامل سست شدن اتصال سلول‌ها با کف چاهک‌های پلیت و از دست دادن قدرت چسبندگی بود. همچنین قدرت سلول‌ها در تشکیل کلونی و باقی‌ماندن در کنار هم کم شده است. بنابراین با سست شدن اتصال سلولی به کف پلیت، شکل سلول از حالت چند وجهی به دایره‌ای شکل تغییر کرده است. نتایج حاصل از تاثیر داروی آناهیل و نانولوله‌های کربنی حاوی آناهیل با گذشت زمان بر روی سلول‌های سرطانی HT-29 نشان داد که تاثیر کشندگی داروی آناهیل در ابتدا بیشتر بوده و با گذشت زمان کاهش می‌یابد. اما در مورد داروی جدید سنتز شده با استفاده از وارد کردن داروی آناهیل به سطح نانولوله‌های کربنی، میزان کشندگی با گذشت زمان با شیب کمتری نسبت به استفاده مستقیم از داروی آناهیل افزایش یافته که این امر نشان‌دهنده رهایش تدریجی دارو با گذشت زمان است. تحقیقات تکمیلی نشان داده است که بروملین مانع از جابه‌جایی فاکتور kB هسته‌ای که در اثر جلوگیری فاکتور G2/M در مرگ طبیعی سلول‌ها رخ می‌دهد و منجر به پیدایش سلول‌های سرطانی می‌شود (Baez et al., 2007). مختل‌شدن مکانیسم طبیعی مرگ سلولی منجر به تغییر شکل سلول‌ها شده و مزایای رشد را برای سلول‌های سرطانی فراهم می‌کند (Zavadova et al., 1995). ویژگی‌های مکانیسم مرگ سلولی عبارتست از چروکیدگی سلول، میعان کروماتین، تکه تکه شدن DNA و فعال‌شدن پروتئازهای ویژه به نام کاسپازهاست (Eckert et al., 1999). نشان داده شده است که بروملین به صورت انتخابی باعث مرگ سلولی در سلول‌های تومور از طریق بالا بردن تاثیر p53 و ممانعت از مسیر مرگ میتوکندریایی با افزایش بیان bax و رهاسازی سیتوکروم c می‌شود (Tysnes et al., 2001). علاوه بر این، بروملین فعالیت تنظیم‌کننده‌های نجات سلولی از قبیل Akt را کاهش می‌دهد، بنابراین مرگ سلولی سلول‌های سرطانی را تسریع می‌بخشد (Juhász et al., 2008). در مطالعات آزمایشگاهی مشخص شده است که استفاده از بروملین از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری کرده و ظرفیت پخش سرطان را کاهش داده است (Pezzani et al., 2023). همچنین بروملین از متاستاز سرطانی جلوگیری می‌کند (Gerard, 1972). بروملین از چسبندگی پروتئین‌های سطحی که برای چسبندگی، مهاجرت و التهاب الزامی هستند، جلوگیری می‌کند (Nieper, 1974). Taussig et al. (2010) گزارش کردند که بروملین از رشد سه

در تحقیق حاضر علاوه بر مطالعه فرآیند جذب آنزیم بروملین بر روی نانولوله‌های کربنی، عملکرد این آنزیم گیاهی بر روی ممانعت از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی روده بررسی شد. ارزیابی کلینیکی تاثیر آنزیم گیاهی بروملین به عنوان یک عامل ضد سرطان به تنهایی و در ترکیب با دیگر عامل‌ها تنها منحصر به چندین آزمایش بالینی است (Chobotova et al., 2010). این امر احتمالاً ریشه در نقصان مطالعات پیش بالینی دارد. در جذب داروی آناهیل بر روی نانولوله‌های کربنی با تاثیر زمان تماس مشخص گردید که شیب منحنی تا ۳۰ دقیقه ابتدایی تند بوده و با افزایش زمان تماس، شیب منحنی کاهش یافته و بعد از زمان تماس ۹۰ دقیقه تقریباً به صفر می‌رسد. این امر می‌تواند ناشی از پر شدن محل‌های فعال جذب در نانولوله‌های کربنی و یا دسترسی مشکل مولکول‌های دارو به این محل‌های فعال باشد. جذب سریع داروی آناهیل در زمان‌های تماس ابتدایی می‌تواند به دلیل وجود سطح بالای نانولوله‌های کربنی باشد که توانسته است جایگاه‌های فعال زیادی در اختیار مولکول‌های دارو قرار دهد. در تاثیر غلظت اولیه آناهیل و مقدار جذب، افزایش مقدار جذب با افزایش کارایی حذف همراه می‌باشد. این امر ممکن است در اثر افزایش سطح جذب و با افزایش دسترسی مولکول‌های آناهیل به محل‌های فعال جذب سطحی و کاهش رقابت بوده باشد. اما از طرفی دیگر افزایش مقدار جذب تاثیر منفی بر روی ظرفیت جذب داشته است که احتمالاً به دلیل پر نشدن محل‌های فعال سطحی جذب در حین فرآیند جذب دارو بوده است. مقادیر به دست آمده برای پارامتر n در مدل فرندلیچ برای هر دو دما، مقداری بالاتر از دو را حاصل نمود که این عدد نشان دهنده جذب مطلوب آناهیل بر روی نانولوله‌های کربن فعال است. ضریب همبستگی برای مدل فرندلیچ بزرگ‌تر از ۰/۹۸ است که این نیز خود بیانگر تبعیت جذب آناهیل از مدل فرندلیچ می‌باشد. Putra et al. (2009) در مطالعه جذب آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی بستر کربن فعال، هر دو مدل لانگمویر و فرندلیچ را مناسب دانستند. بر اساس مقادیر به دست آمده برای ضریب همبستگی مدل‌های سینتیکی در جدول ۲ می‌توان نتیجه گرفت که مکانیسم غالب در فرآیند جذب آناهیل بر روی نانولوله‌های کربنی از نوع جذب شیمیایی است. مدل سینتیکی شبه درجه دوم بیان می‌کند که دو واکنش که اولی به سرعت به تعادل می‌رسد و دومی تا زمان طولانی‌تری ادامه می‌یابد و به صورت موازی در فرآیند جذب آناهیل بر روی نانولوله‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر موثر بوده

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج با افزایش دوز نانولوله‌های کربنی، بازدهی جذب، افزایش و ظرفیت جذب، کاهش یافت و با افزایش غلظت اولیه داروی آناهیل، افزایش و در مقابل راندمان جذب، کاهش یافت. با افزایش دما، راندمان جذب کاهش یافت. مدل فرندلیچ، حاکی از جذب مطلوب آناهیل بر روی نانولوله‌های کربن بود. بر اساس نتایج حاصل از آزمون MTT، آناهیل در غلظت‌های بالا، اثر کشندگی شدیدی دارد. تاثیر کشندگی آناهیل در ابتدا بیشتر بوده و با گذشت زمان کاهش یافت. در مورد داروی جدید سنتزی میزان کشندگی به یک مقدار ثابت می‌گراید که نشان‌دهنده رهایش تدریجی دارو با گذشت زمان بود که مطلوب درمان کارآمد سرطان می‌باشد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافی توسط نویسندگان وجود ندارد.

رده سلول سرطانی در موش جلوگیری می‌کند. Tysnes *et al.* (2001) نشان دادند که آنزیم بروملین در مهار بدون برگشت تهاجم سلول‌های گلوما نقش دارد. در تحقیق انجام شده توسط Beuth *et al.* نشان داده شد که تیمار با آنزیم بروملین منجر به کاهش قابل توجهی در رشد سلول‌های سرطانی تلقیح شده با سلول‌های سارکوم موش رده L-1 می‌شود (Dave *et al.*, 2012). در تحقیق حاضر پس از مطالعه نحوه جذب آنزیم بروملین بر روی نانولوله‌های کربنی، خواص ضد سرطانی آن به صورت غیر بالینی بررسی شد. نتایج نشان داد که با ادغام آنزیم بروملین و نانولوله‌های کربنی، تاثیر آن در دراز مدت بهبود می‌یابد. به عبارت دیگر نانولوله‌های کربنی باعث رهایش کندتر دارو شده و اثربخشی آن را افزایش می‌دهند. البته لازم به ذکر است که رهایش دارو مستقیماً اندازه‌گیری نشده و از تغییرات کشندگی دارو با گذشت زمان استنباط شده است. اما لازم به ذکر است که برای نتیجه‌گیری بهتر می‌بایست آزمایش‌های بیشتری به‌ویژه به صورت بالینی و بر روی موش انجام گیرد.

References

- Agrawal, P., Nikhade, P., Patel, A., Mankar, N., & Sedani, S. (2022). Bromelain: A Potent Phytomedicine. *Cureus*. 2022 Aug 11;14(8):e27876. doi: 10.7759/cureus.27876.
- Amini, A., Ehteda, A., Moghaddam, S. M., Akhter, J., Pillai, K., & Morris, D. L. (2013). Cytotoxic effects of bromelain in human gastrointestinal carcinoma cell lines (MKN45, KATO-III, HT29-5F12, and HT29-5M21). *Oncotargets and therapy*, 6, 403.
- Báez, R., Lopes, M. T., Salas, C. E., & Hernández, M. (2007). In vivo antitumoral activity of stem pineapple (*Ananas comosus*) bromelain. *Planta medica*, 73(13), 1377-1383.
- Bhatnagar, P., Pant, AB., Shukla, Y., Chaudhari, B., Kumar, P., & Gupta, KC. (2015) Bromelain nanoparticles protect against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced skin carcinogenesis in mouse model. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015 Apr;91:35-46. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.01.015. Epub 2015 Jan 22. PMID: 25619920.
- Bhatnagar, P., Pant, A. B., Shukla, Y., Panda, A., & Gupta, K. C. (2016). Hyaluronic Acid Grafted PLGA Copolymer Nanoparticles Enhance the Targeted Delivery of Bromelain in Ehrlich's Ascites Carcinoma. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 105, 176-192. 10.1016/j.ejpb.2016.06.002
- Bhui, K., Prasad, S., George, J., & Shukla, Y. (2009). Bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-kappa B against skin tumor-initiation triggering mitochondrial death pathway. *Cancer Lett*. 2009 Sep 18; 282(2), 167-76. doi: 10.1016/j.canlet.2009.03.003.
- Bhui, K., Tyagi, S., Srivastava, AK., Singh, M., Roy, P., Singh, R., & Shukla, Y. (2012). Bromelain inhibits nuclear factor kappa-B translocation, driving human epidermoid carcinoma A431 and melanoma A375 cells through G(2)/M arrest to apoptosis. *Mol Carcinog*. 2012 Mar; 51(3), 231-43. doi: 10.1002/mc.20769.
- Castell, J. V., Friedrich, G. E. R. H. A. R. D., Kuhn, C. S., & Poppe, G. E. (1997). Intestinal absorption of undegraded proteins in men: presence of bromelain in plasma after oral intake. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 273(1), G139-G146.
- Chen, D., Love, KT., Chen, Y., Eltoukhy, AA., Kastrup, C., Sahay, G., Jeon, A., Dong, Y., & Whitehead, KA. (2012). Anderson, DG. Rapid discovery of potent siRNA-containing lipid nanoparticles enabled by controlled microfluidic formulation. *J Am Chem Soc*. 2012 Apr 25;134(16):6948-51. doi: 10.1021/ja301621z.
- Chobotova, K., Vernallis, AB., & Majid, FA. (2010). Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. *Cancer Lett*. 2010 Apr 28; 290(2), 148-56. doi: 10.1016/j.canlet.2009.08.001.

- Dave, S., Kaur, N.J., Nanduri, R., Dkhar, H.K., Kumar, A., & Gupta, P. (2012). Inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis and lipolysis by stem bromelain in 3T3-L1 adipocytes. *PLoS One*. 2012; 7(1), e30831. doi: 10.1371/journal.pone.0030831.
- Dhandayuthapani, B., Varghese, S.H., Aswathy, R.G., Yoshida, Y., Maekawa, T., & Sakthikumar, D. (2012). Evaluation of antithrombogenicity and hydrophilicity on zein swcnt electrospun fibrous nanocomposite scaffolds. *Int J Biomater* 2012, 2012, 1-12.
- Eckert, K., Grabowska, E., Stange, R. A. I. N. E. R., Schneider, U., Eschmann, K. L. A. U. S., & Maurer, H. R. (1999). Effects of oral bromelain administration on the impaired immunocytotoxicity of mononuclear cells from mammary tumor patients. *Oncology reports*, 6(6), 1191-1200.
- Gerard G: Anti-cancer therapy with bromelain. *Agress*, 3(1972), 261-274
- Hassan, H. A., Diebold, S. S., Smyth, L. A., Walters, A. A., Lombardi, G., & Al-Jamal, K. T. (2019). Application of carbon nanotubes in cancer vaccines: Achievements, challenges and chances. *Journal of controlled release*, 297, 79-90.
- He, H., Zhang, Y., Gao, C., & Wu, J. (2009). "Clicked" magnetic nanohybrids with a soft polymer interlayer. *Chem. Commun*, 13, 1655-1657.
- He, H., Wang, L., Qiao, Y., Zhou, Q., Li, H., Chen, S., Yin, D., Huang, Q., & He, M. (2020). Doxorubicin Induces Endotheliotoxicity and Mitochondrial Dysfunction via ROS/eNOS/NO Pathway. *Front Pharmacol*. 2020 Jan 10;10:1531. doi: 10.3389/fphar.2019.01531.
- Juhasz, B., Thirunavukkarasu, M., Pant, R., Zhan, L., Penumathsa, S. V., Secor Jr, E. R., ... & Maulik, N. (2008). Bromelain induces cardioprotection against ischemia-reperfusion injury through Akt/FOXO pathway in rat myocardium. *American journal of physiology-Heart and circulatory physiology*, 294(3), H1365-H1370.
- Maurer, H. R. (20010). Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 9, 1234-1245.
- Nieper, H.A. (1974). A program for the treatment of cancer. *Krebs*, 6, 124-127.
- Paroulek, A.F., Jaffe, M., & Rathinavelu, A. (2009). The effects of the herbal enzyme bromelain against breast cancer cell line GI101A. *FASEB J.*, 23, LB18.
- Pezzani, R., Jiménez-García, M., Capó, X., Sönmez, G.E., Sharopov, F., Rachel, T., Yamthe, L., Ntieche, W., David, R.A., Peddio, S., Zucca, P., Tsouh, F., Patrick, V., Martorell, M., Gulsunoglu-Konuskan, Z., Ydyrys, A., Bekzat, T., Gulmira, T., Hano, C., Sharifi-Rad, J., Calina, D. (2023). Anticancer properties of bromelain: State-of-the-art and recent trends. *Frontiers in Oncology*, 12. 10.3389/fonc.2022.1068778.
- Rathinavelu, V., Alitheen, N.B., Sohila, S., Kanagesan, S., Ramesh, R. Potential role of bromelain in clinical and therapeutic applications. *Biomed Rep*. 2016 Sep;5(3):283-288. doi: 10.3892/br.2016.720.
- Taussig, D.C., Vargaftig, J., Miraki-Moud, F., Griessinger, E., Sharrock, K., Luke, T., Lillington, D., Oakervee, H., Cavenagh, J., & Agrawal, S.G. (2010). Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. *Blood*, 115, 1976-1984.
- Tysnes, B.B., Maurer, H.R., Porwol, T., Probst, B., Bjerkvig, R., & Hoover, F. (2001). Bromelain reversibly inhibits invasive properties of glioma cells. *Neoplasia*, 3, 469-479.
- Varilla, C., Marcone, M., Paiva, L., & Baptista, J. (2021). Bromelain, a Group of Pineapple Proteolytic Complex Enzymes (*Ananas comosus*) and Their Possible Therapeutic and Clinical Effects. A Summary. *Foods*. 2021 Sep 23; 10(10), 2249. doi: 10.3390/foods10102249.
- Yiheng, H., Jie, X., Huan, L., Shoukun, H., Jianqing, J., & Jingping, R. (2020). Ethylene response factors regulate ethylene biosynthesis and cell wall modification in persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit during ripening, *Postharvest Biology and Technology*, Vol. 168, 111255, ISSN 0925-5214, <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111255>.
- Zavadova, E., Desser, L., & Mohr, T. (1995). Stimulation of reactive oxygen species production and cytotoxicity in human neutrophils in vitro and after oral administration of a polyenzyme preparation. *Cancer Biother*, 10 9, 147-152.