

عامل دار کردن نانو تیوب های اسیدی چند دیواره با ترکیبات دی آزو حاصل از آمین های آروماتیک و مطالعه اثرات ضد سرطانی آن ها بر رده سلولی SW742 در شرایط invitro

سعید حیدری کشل¹، مهدیه انتظاری^{2*}، ملک حکمتی²، احمد ناصر³، سمیه سلیمانی³

1) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

2) گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی تهران

3) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: 91/11/23

تاریخ پذیرش: 92/2/18

چکیده

مقدمه: یکی از علل عمده مرگ و میر در تمام جهان سرطان است. با وجود پیشرفت علم و تکنولوژی، بشر هنوز در درمان قطعی این بیماری ناکام مانده است. کشف خواص شگفت انگیز بیولوژیک نانو تیوب های کربنی باعث شد تا آن ها کاندیدای خوبی برای مطالعه بر روی سلول های سرطانی باشند و از آن جا که عامل دار کردن باعث بهبود خواص و اصلاح نانو تیوب ها می شود، عامل دار کردن آن ها با ترکیبات مختلف مورد توجه قرار گرفت. از آن جا که بسیاری از ترکیباتی که در شیمی دارویی مطرح می شوند از خانواده دی آزو هستند در این مقاله سعی کردیم تا نانو تیوب های چند دیواره دارای عامل اسیدی را با ترکیبات دارای گروه دی آزو عامل دار کنیم.

مواد و روش ها: همه محصولات به وسیله طیف سنجی Raman, FT-IR و SEM تایید شده اند. سپس محصولات به کمک روش MTT بر روی لاین سلولی SW742 مورد بررسی قرار گرفتند و توان زیستی سلول ها در غلظت های مختلف بررسی شد.

یافته های پژوهش: بررسی ها نشان داد که توان زیستی سلول های سرطانی در حضور نانو تیوب های عامل دار شده به مقدار قابل ملاحظه ای کاهش می یابد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج نشان داد که ترکیبات حاصل می توانند کاندیدای مناسبی برای ساخت داروهای موثر در درمان سرطان روده باشند.

واژه های کلیدی: کربن نانو تیوب، سرطان روده، عامل دار کردن

*نویسنده مسئول: گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی تهران

مقدمه

دومین سرطان شایع در تمام جهان سرطان روده است، (1-2). با این که سال هاست مطالعات فراوانی در مورد این بیماری انجام می شود اما هم چنان انسان های بسیاری در جهان از این بیماری رنج می برند. داروهای شیمی درمانی اغلب با مقاومت دارویی مواجه می شود و سمیت بالایی دارد. بنا بر این دانشمندان به دنبال تهیه داروهای اثر گذار هستند. از آن جا که نانو تیوب ها خواص شگفت انگیز و فوق العاده ای در زمینه های مختلف دارند، دانشمندان سعی کردند تا از آن ها در تهیه کاندیدهای داروهای ضد سرطان استفاده کنند. نانو تیوب های چند دیواره (MWNTs) ترکیبات کارآمدتری از نانو تیوب های تک دیواره در مطالعات سرطان بودند زیرا می توانستند رشد سلول های سرطانی را تخریب کنند.(3)

خواص نانو تیوب های چند دیواره با عامل دار شدن به وسیله ترکیبات شیمیایی اصلاح می شود و سمیت نانو تیوب ها کاهش می یابد. ترکیبات آلی که در آن ها گروه دی آزو وجود دارد خواص بیولوژیک گسترده ای دارند،(4). بنا بر این انتظار می رود تا خواص ضد سرطان نانو تیوب های چند دیواره به کمک آن ها اصلاح شود، بنا بر این نانو تیوب ها را به کمک آن ها عامل دار کردیم. در این مقاله آمین های آروماتیک به نمک دی آزونیوم تبدیل شدند و سپس با کوپل شدن به فنول ترکیبات دی آزو حاصل آمد که به

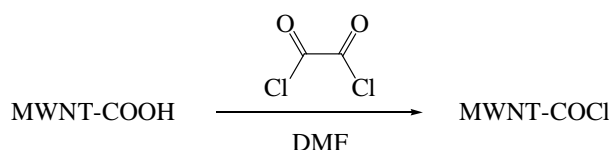
کمک آن ها نانو تیوب های چند دیواره اسیدی عامل دار شدند. این نانو تیوب های اصلاح شده بر روی سلولهای سرطان روده با لاین سلولی SW742 تست شدند. نتایج Viability مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

طیف های IR محصولات با استفاده از اسپکترومتر Nexus 870 FT-IR بر روی قرص KBr گزارش گردیده اند. طیف های Raman محصولات با استفاده از اسپکترومتر spectra 960 ES, (Thermo Nicolet) گزارش گردیده اند. از محصولات توسط میکروسکوپ الکترونی SEM مدل (XL30 Philips) عکسبرداری شد. مواد اولیه و حلال های مورد نیاز از شرکت های مرک و فلوکا و نوترینو تهیه شد و بدون خالص سازی بیشتر مصرف شد.

کلردار کردن نانو تیوب چند دیواره اسیدی به وسیله اگزالیل دی کلراید

حدود 40 میلی گرم از نانو لوله اسیدی با 50 سی سی DMF برای 45 دقیقه سونیکیت شد سپس 5 سی سی اگزالیل کلراید تحت گاز نیتروژن در دمای صفر درجه سانتی گراد قطره قطره به مخلوط اضافه شد و برای 2 ساعت بهم زده شد سپس دمای مخلوط به 70 درجه سانتی گراد رسید تا اگزالیل اضافی خارج شود سپس محصول در دمای اتاق فیلتر شد و با THF شستشو داده شد.(5)(شکل شماره 1)

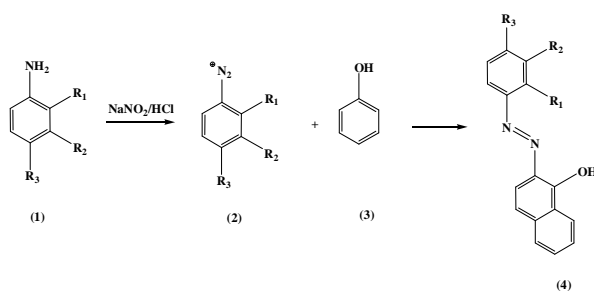


شکل شماره 1. روش کلردار کردن نانو تیوب اسیدی چند دیواره

ساعت در دمای اتاق هم زده شد سپس محصول فیلتر شد و پس از شستشو با آب در دمای اتاق به مدت 12 ساعت خشک شد.(6-8)(شکل شماره 2)

سنتر ترکیبات دی آزو

به مخلوطی از HCl/NaNO₂، 0/5 گرم از آمین آروماتیک در دمای صفر درجه سانتی گراد اضافه شد. نمک دیازونیوم تهیه شده به فنول کوپل شد و برای دو

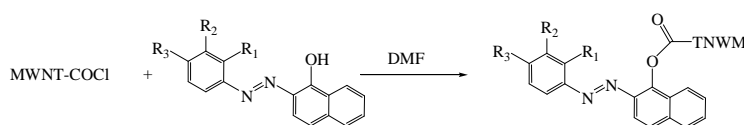


Name	R ₁	R ₂	R ₃
4a			H
4b	H	H	

شکل شماره 2. روش تهیه ترکیبات دی آزو از آمین های آروماتیک

دو ساعت در دمای صفر بهم زده شد و سپس برای 72 ساعت در دمای اتاق رفلکس شد. سپس مخلوط فیلتر شد و با THF و استون شستشو داده شد. یک مخلوط سیاه رنگ نتیجه واکنش بود که بعد از فیلتر خلاء برای دو روز در دمای اتاق خشک شد. (شکل شماره 3)

عامل دار کردن با ترکیبات دی آزو به روش استری 15 میلی گرم از نانو لوله کلره شده را در 30 سی سی DMF به مدت 30 دقیقه سونیکیت می کنیم تا یک مخلوط کاملا همگن به دست بیاید. 0/25 گرم از ترکیب دی آزو تهیه شده به سوسپانسیون فوق در دمای 0 درجه سانتی گراد اضافه شد. این مخلوط برای



شکل شماره 3. عامل دار کردن نانو لوله های چند دیواره کلره شده با ترکیبات دی آزو

نانو تیوب های چند دیواره وجود دارد که باند D در اطراف 1300 cm⁻¹ و باند G در اطراف 1500 cm⁻¹. پیک های D و G نانو تیوب مربوط به نقص ها، پیک های القاء شده نامنظم و مد مماسی نانو تیوب می باشد. در طیف رامان ماده اولیه پیک حدود 1300 در شدت کمتری نسبت به پیک حدود 1500 دیده می شود. اما در ماده نهایی پیک حدود 1500 شدت کمتری یافته است که نشان دهنده تغییر آروماتیسیتیه در نانو لوله است. هم چنین نسبت (ID/IG) مربوط به افزایش شدت باند D و G بوده و به عنوان دلیلی بر افزایش در شدت مد نقصی مربوط به هیبریداسیون SP³ کربن می باشد و تاییدی بر عامل دار شدن نانو تیوب توسط مولکول های متصل شده است. (12-17) (شکل شماره 4)

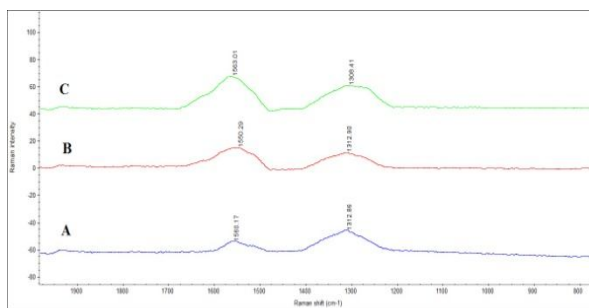
یافته های پژوهش

طیف FT-IR یکی از ابزار مهم برای تشخیص عامل دار شدن در نانو تیوب هاست، (9-11). بررسی جایگاه گروه کربونیل، و بررسی ایجاد عامل C-O محصولات تایید مناسبی برای عامل دار کردن نانو تیوب های اسیدی است.

MWNTCOOH (A): black solid, IR (KBr): v_{max} 3733 (CH), 2910(C-C), 1704(C=O) cm⁻¹.
MWNTCO-4a (B): black solid, IR (KBr): v_{max} 3318 (CH), 2867 (C-C), 1726(C=O), 1134 (C-O), 9865-896 (Aromatic C-H) cm⁻¹.
MWNTCO-4b (C): black solid, IR (KBr): v_{max} 3312 (CH), 2981 (C-C), 1734(C=O), 1139 (C-O), 820(Aromatic C-H) cm⁻¹.

بررسی طیف رامان

طیف سنجی رامان ابزار مهمی برای مشخص کردن ساختارهای نانو تیوبی است و اطلاعات ساختاری عملی درباره نانو تیوب های اسیدی چند دیواره قبل و بعد از عامل دار شدن می دهد. دو پیک مشخص برای

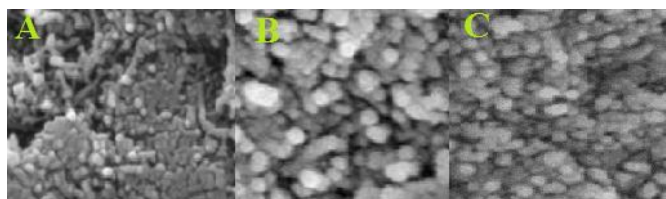


شکل شماره 4. طیف رامان نانو تیوب اسیدی چند دیواره (A) و نانو تیوب های چند دیواره عامل دار شده (B,C)

SEM است. در شکل شماره 5 تصاویر SEM مربوط به نانو لوله اسیدی و محصولات عامل دار شده نشان داده شده است. مطابق با شکل به نظر می رسد که محصولات از نظر مورفولوژی نسبت به نانو تیوب کربن اسیدی خشن تر شده اند و این موضوع عامل دار شدن را تایید می کند. (۱۸، ۱۹)

تصاویر SEM

در پژوهش های مربوط به خواص مواد نانوساختاری، میکروسکوپ الکترونی یکی از مهم ترین و پرکاربردترین دستگاه هایی است که مورد استفاده قرار می گیرد. مدرک دیگر برای عامل دار شدن نانو تیوب چند دیواره تصاویر میکروسکوپی الکترونی



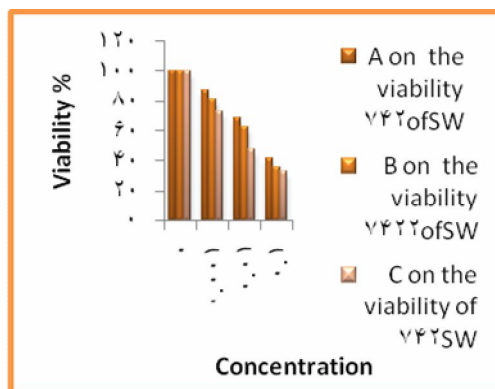
شکل شماره 5. تصاویر SEM نانو تیوب اسیدی چند دیواره (A) و نانو تیوب های چند دیواره عامل دار شده (B,C)

اندازه گیری می شود. بدین ترتیب مقدار سلول های سرطانی زنده مانده که متناسب با مقدار فرمازان تولید شده می باشد به وسیله OD اندازه گیری شده محاسبه می گردند و در نتیجه میزان تاثیر داروی ضد سرطانی بر فعالیت سلول های سرطانی مورد ارزیابی قرار می گیرد.

از مقایسه نتایج آزمون MTT بر سلول های سرطان روده که در مجاورت غلظت های مختلف از نانو تیوب های چند دیواره عامل دار که در DMSO حل شدند و در دمای 37 درجه سانتی گراد همراه با 5 درصد گاز دی اکسید کربن قرار گرفتند مشخص گردید که سلول های سرطانی به میزان قابل ملاحظه ای توان زیستی خود را از دست داده اند و می توانند کاندیدای مناسبی برای ساخت داروهای ضد سرطان روده باشند. (نمودار شماره 1)

آزمون توان حیاتی MTT

آزمایش MTT برای اولین بار توسط Mosmann ابداع شد. مطالعات نشان داده است که این آزمایش می تواند به عنوان معرفی برای تکثیر سلولی در پاسخ به عوامل مختلف از قبیل هورمون رشد، داروهای ضد سرطان و نظایر آن مورد استفاده قرار گیرد. با افزودن محلول MTT که حاوی نمک های زرد رنگ تترازولیوم هستند به مخلوط حاوی سلول های سرطانی و داروی ضد سرطان، سلول های سرطانی زنده مانده با انجام فعالیت های متابولیکی میتوکندریایی قادر به شکستن نمک تترازولیوم و تبدیل آن به ترکیب ارغوانی رنگ فرمازان می باشند. طول موج جذب فرمازان، در 570 نانومتر بوده که با انحلال آن در حلال های آلی مانند DMSO و با استفاده از تکنیک اسپکتروفوتومتری میزان فرمازان تولید شده،



نمودار شماره 1. اثر نانو تیوب اسیدی چند دیواره (A) و نانو تیوب های چند دیواره عامل دار شده (B,C) در چهار غلظت متفاوت بر توان زیستی سلول های SW742

بحث و نتیجه گیری

در این مقاله ما سعی کردیم تا با استفاده از خواص شگفت آور نانو تیوب های چند دیواره ترکیباتی را تهیه کنیم که بتوانند کاندید مناسبی برای تهیه داروهای ضد سرطان باشند. از آن جا که به کمک عامل دار کردن می توانیم خواص زیستی نانو تیوب های چند دیواره را افزایش دهیم، توانستیم تا آن ها را به کمک ترکیبات دی آزو عامل دار کنیم. نتایج بررسی توان زیستی این ترکیبات بر رده سلولی

SW742 رضایت بخش بود. امیدواریم که روزی بیماری وحشت انگیز سرطان در تمام دنیا ریشه کن شود و شاید تکنولوژی نانو و قدرت عجیبی که خداوند در ابعاد نانو نهادینه کرده است بتواند در این بین موثر واقع گردد.

سپاسگزاری

در پایان وظیفه خود می دانیم که از حمایت های مالی و پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران نهایت تشکر را داشته باشیم.

References

- 1-Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, et al. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:23-30.
- 2-Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
- 3-Zhang Z, Yang X, Zhang Y. Delivery of telomerase reverse transcriptase small interfering RNA in complex with positively charged single-walled nanotubes suppresses tumor growth. *Clin Cancer Res* 2006;12:4933-9.
- 4-Swarnkar P. Synthesis and antibacterial activity of some new phenothiazine derivatives. *J Chemi* 2007;4:14-20.
- 5-Azizian J, Tahermansouri H, Biazar E, Heidari S, Chobfrosh-Khoei D. Functionalization of carboxylated multiwall nanotubes with imidazole derivatives and their

toxicity investigations. *Int J Nanomed* 2010;5:907-14.

- 6-Fieser H, Blangey L. Fundamental processes of dye chemistry. Inter Science Publishers: New York; 1931. P.126-8.
- 7-Pandey VK, Negi HS. Synthesis and biological activity of some new. Benzophenothiazines. *Indian J Chem (B)* 2003;42:206-11.
- 8-Chaudhary M, Pareek D, Ojha K, Pareek G. Synthesis and antibacterial activity of 1-(2-Diazo-6-ethoxybenzothiazoly) substituted benzene derivatives. *Int J Curr Chem* 2010;1:175-9.
- 9-Kuan HC, Ma CM, Chang WP, Yuen SM, Wu HH, Lee TM. Synthesis, thermal, mechanical and rheological properties of multiwall carbon nanotube/waterborne polyurethane nanocomposite. *Compos Sci Technol* 2005;65:1703-10.
- 10-Stevens JL, Huang AY, Peng H, Chiang IW, Khabashesku VN, Margrave JL. Sidewall amino-functionalization of single-walled carbon nanotubes through fluori-

nation and subsequent reactions with terminal diamines. *Nano Lett* 2003;3:331-6.

11-Peng H, Alemany LB, Margrave JL, Khabashesku VN. Sidewall carboxylic acid functionalization of single-walled carbon nanotubes. *J Am Chem Soc* 2003;125:15174-82.

12-Dettlaff-Weglikowska U, Benoit JM, Chiu PW, Graupner R, Lebedkin S, Roth S. Chemical functionalization of single walled carbon nanotubes. *Appl Phys* 2002;2:497-501.

13-Hamon MA, Hu H, Bhowmik P. End-group and defect analysis of soluble single-walled carbon nanotubes. *Chem Phys Lett* 2001;1:347-8.

14-Jorio A, Saito R, Dresselhaus G, Dresselhaus MS. Determination of nanotubes properties by Raman spectroscopy. *Physic Engineer Sci* 2004;362:2311-36.

15-Rao AM, Richter E, Bandow S, Chase B, Eklund PC, Williams KA, et al. Diameter-selective Raman scattering from vibrational modes in carbon nanotubes. *Science* 1997;275:187-91.

16-Dresselhaus MS, Dresselhaus G, Saito R, Jorio A. Raman spectroscopy of carbon nanotubes. *Phys Lett* 2005;409:47-99.

17-Thomsen C, Reich S, Maultzsch J. The physical meaning of the conjugation length in polymers. *Mathemat Phys Engineer Sci* 2004;362:2337-59.

18-Zheng M, Jagota A, Strano MS, Santos AP, Barone P, Chou SG. Structure-based carbon nanotube sorting by sequence-dependent DNA assembly. *Science* 2003;302:1545-8.

19-Yang ST, Guo W, Lin Y, Deng X, Wang H, Sun H, et al. Biodistribution of pristine single-walled carbon nanotubes in vivo. *J Phys Chem* 2007;111:17761-4.

Functionalization of Carboxylated Multi Walled Nanotubes With Diazo Compounds of Aromatic Amins and anti Cancer Study on SW742 Cell Line By Invitro Conditions

Heydari Keshal S¹, Entezari M^{2*}, Hekmati M², Naser A³, Soleimani S³

(Received: 11 Feb. 2013 Accepted: 8 May. 2013)

Abstract

Introduction: One of the leading causes of death around the world is cancer. Despite the advances in science and technology, man has still failed to cure the disease. The discovery of amazing biological properties of carbon nano tubes caused that they would be good candidates for the research on cancer cells. Functionalization of carbon nanotubes is known to improve their properties. Many compounds that have applications in medicinal chemistry have diazo group. In this paper, we tried to functionalize MWNT-COOH with diazo compounds.

Materials & Methods: Modification was confirmed by FT-IR, Raman and SEM spectroscopy. The products were tested on

colon cancer cells (SW742) by MTT assay. Viability of the colon cancer cells was investigated in different concentrations of the functionalized products.

Findings: The results demonstrated that the viability of cancer cells was profoundly decreased in the presence of the functionalized nanotubes.

Discussion & Conclusion: Our results revealed that the functionalized nanotubes could be a suitable candidate for the synthesis of effective drugs on colon cancer.

Keywords: carbon nanotube, colon center, functionalization

1. Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Dept of Chemistry, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Dept of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam, University of Medical Sciences, Ilam, Iran

* (corresponding author)