بررسی اثر pH و دما بر فعالیت نانوسامانه حاوی آنزیم کندروئیتیناز ABCI بر پایه هیدروکسی‌آپاتیت

فاطمه افرایی[۱]، سارا دانشجو[۲*]، بهاره دبیرمنش[۳]

۱-دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد نانوبیوتکنولوژی، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

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

۳-دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۱۱-۱٤۱۱۵، تهرن، ایران

s.daneshjou@modares.ac.ir

دریافت: ۱٤۰۱/۱۱/۱۰ پذیرش: ۱٤۰۲/۰۱/۲۱

چکیده

آنزیم کندروئیتیناز ABCI نوترکیب، یک لیاز باکتریایی است که گلیکوزآمینوگلیکان‌ها را تجزیه می‌کند و موجب رشد آکسون‌ها و بهبود عملکرد می‌شود.اما نگهداری این آنزیم به‌دلیل ناپایداری آن بسیار محدود شده است. یکی از راهبردهای غلبه بر این محدودیت تثبیت آنزیم می‌باشد. در این پژوهش، آنزیم کندروئیتیناز ABCI جدا سازی شده از باکتری *پروتئوس ولگاریس* بر نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت، تثبیت شد. هیدروکسی‌آپاتیت یک زیست مواد سرامیکی فاقد سمیت بوده و دارای مساحت سطح بالایی می‌باشد، که برای بارگذاری مقدار زیادی از آنزیم سودمند است. بنابراین برای افزایش پایداری آنزیم کندروئیتیناز ABCI، تثبیت بر روی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به مدت ٤ ساعت از طریق جذب فیزیکی در بافر فسفات در سه pH ۵، ٦/۸و ۸ در دمای ٤ درجه سانتی گراد انجام شد. در ادامه تثبیت آنزیم بر روی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت از طریق تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی- نشر میدانی و طیف سنجی فرابنفش، قبل و بعد از تثبیت مورد تایید قرار گرفت. سپس جهت بدست آوردن pH و دمای بهینه، میزان فعالیت نانوسیستم (نانوهیدروکسی آپانیت حاوی آنزیم) درسه pH و دما (٤°C، ۲۵°C و۳۷°C) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج فعالیت بالاتری را در pH ۵ و دمای ٤ °C نسبت به سایر pH و دماها برای نانوسیستم نشان داد. بر اساس نتایج بدست آمده که نشان دهنده پایداری سامانه حاوی آنزیم در هر سه دما نسبت به آنزیم آزاد می باشد، این نانوسیستم می تواند یک گزینه مناسب برای کاربردهای بالینی در آینده باشد.

کلید واژگان: آنزیم کندروئیتیناز، پایداری، نانوسامانه، هیدروکسی‌آپاتیت

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

۱-مقدمه

بیماران دچار آسیب ضایعه نخاعی، معمولاً، تا پایان عمر ناتوان می مانند. پس از وقوع ضایعه نخاعی، چالش بازگرداندن عملکرد سیستم عصبی مرکزی، در چند زمینه، با مشکلاتی روبرو است. تحقیقات در سه دهه گذشته، چندین راه بالقوه را برای پرداختن به جنبه‌های مختلف مشکل، ارائه کرده است. راهکارهای توسعه یافته شامل کاشت سلول، مکمل سازی نوروتروفین و درمان‌هایی برای افزایش عملکرد سیستم عصبی مرکزی، است. با این‌حال، به‌دلیل پیچیدگی نخاع آسیب‌دیده، رویکرد تک-درمانی، احتمالاً برای بازگرداندن عملکرد کامل، کافی نخواهد بود[۱]. پروتئوگلیکان‌های کندروئیتین سولفات، جزء اصلی ماتریس خارج سلولی سیستم عصبی مرکزی طبیعی، با نقش‌های عملکردی متنوع هستند. پس از وقوع ضایعات، پروتئوگلیکان‌های کندروئیتین سولفات، چندین برابر تولید می‌شوند و بین ۱۰ تا ۱٤ روز، پس از ضایعه، به اوج خود می‌رسند. همراه با سلول‌های گلیال فعال، پروتئوگلیکان‌های کندروئیتین سولفات، یک لایه از اسکار گلیال را تشکیل می‌دهند که مانع رشد آکسون، می‌شود و بیشتر این مهار، به‌دلیل وجود زنجیره های گلیکوزآمینوگلیکان، است[۱]. آنزیم کندروئیتیناز ABCI، یک آنزیم باکتریایی جداسازی شده از باکتری *پروتئوس ولگاریس*، می‌باشد که قادر به تجزیه‌ی زنجیره‌های گلوکز آمینوگلیکان موجود در پروتئوگلیکان‌ها بوده و در تسهیل باز سازی آکسون‌ها، نقش حیاتی داشته و در ترمیم بافت عصبی آسیب دیده بسیار کارآمد[۱]. این آنزیم، یک داروی بالقوه برای درمان ضایعه نخاعی است، اما هنوز تحویل پایدار آن، یک چالش باقی مانده است[۲]. در مطالعات قبلی از ژل‌های فیبرین، آگارز، کیتوزان برای تحویل موضعی آنزیم کندروئیتیناز ABCI، در محل آسیب ضایعه نخاعی استفاده کرده‌اند، اما این ژل‌ها باید با جراحی کاشته شوند و در مورد آگارز، نیاز به خنک‌سازی موضعی دارد[۲]. علاوه براین، نخاع به نیروی فشاری حساس است، بنابراین هر عامل دارو-رسانی نباید متورم شود یا به طناب برخورد کند. همچنین آزادسازی پایدار، اغلب با کپسوله کردن پروتئین‌ها، در ذرات PLGA، حاصل می‌شود که در طی فرایند تهیه این نانوسامانه ها، احتمال تغییر در ساختار و درنتیجه از دست رفتن یا کاهش فعالیت پروتئین وجود دارد[۲]. آنزیم کندروئیتیناز ABCI یک آنزیم ناپایدار است که رهایش آن در طولانی مدت را دچار مشکل می‌کند. مطالعاتی برای بهبود پایداری آنزیم کندروئیتیناز ABCI، با استفاده از مواد کمکی یا جهش‌زایی انجام شده است[۲]. آنزیم کندروئیتیناز ABCI، همچنین از میکروتوبول‌های لیپیدی، حاوی ترهالوز به‌عنوان پایدارکننده رها شده است[۲]. تنها یک گزارش از کپسوله کردن موفقیت‌آمیز آنزیم کندروئیتیناز ABCI در میکروسفرهای پلی_اسیدلاکتیک وجود دارد، با این‌حال، میکروسفرهای حاصل بزرگ هستند و احتمالا از طریق سوزن ظریف قابل تزریق نیستند[۲]. یک سامانه ایده‌آل، برای تحویل آنزیم کندروئیتیناز ABC I به نخاع آسیب‌دیده باید زیست‌سازگار، حداقل تهاجمی و با حداقل تورم در محل آسیب موضعی باقی بماند. آنزیم کندروئیتیناز ABCI بازه زمانی تنظیم پروتئوگلیکان‌های کندروئیتین سولفات افزایش می‌دهد و در طول زمان مقدار سامانه کاهش می‌یابد تا نیاز به برداشتن جراحی برطرف شود. علاوه براین، باید در شرایط ملایم ساخته شود تا فعالیت آنزیم کندروئیتیناز، حفظ شود. هیچ یک از سیستم‌های نام‌برده شده در بالا، همه‌ی این ویژگی‌ها را تامین نمی‌کند[۲]. یک ماده‌ی معدنی امیدوارکننده برای تثبیت آنزیم‌ها، هیدروکسی‌آپاتیت (HA)، می‌باشد که فاقد سمیت بوده و می‌تواند در ابعاد نانومتری، ساخته شود. جذب پروتئین‌ها روی هیدروکسی‌آپاتیت، برای کاربردهای مختلفی

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

بررسی اثر pH و دما بر ... ـــ
در این مطالعه، با هدف دستیابی به بهبود فعالیت دارویی، آنزیم کندروئیتیناز نوترکیب بر نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت تثبیت شد. این فرایند در سه pH برابر ۵، ٦/٨ و ٨ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انجام شد و پایداری نانو سامانه حاوی آنزیم در دماهای مختلف بررسی شد. شایان ذکر است، نانو هیدروکسی‌آپاتیت، ماده ای معدنی است، که دسترسی مطلوب آنزیم به سوبسترا را ممکن می سازد و امکان جذب آن توسط بدن وجود دارد. علاوه بر این وجود یون های (Ca^{2+}) در ساختار آن‌ها، برهمکنش هیدروکسی‌آپاتیت با زنجیره‌های جانبی آنزیم را امکانپذیر می‌کند. به این صورت که با شلاته کردن گروه‌های کربوکسیلیک اسید موجود در اسیدآمینه‌های آنزیم‌ها، منجر به تشکیل پیوند کوئوردیناسی می‌شود. هیدروکسی‌آپاتیت دارای مساحت سطح بالایی می‌باشد، که برای بارگذاری مقدار زیادی از آنزیم سودمند است. این نانوحامل نیاز به هیچگونه اصلاح شیمیایی اضافه‌ای ندارد، از این‌رو، استفاده از آن، مقرون به صرفه و با کاهش بکارگیری تکنیک‌ها همراه است[۳].

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد شیمیایی

مواد شیمیایی شامل کندروئیتین ٤-سولفات، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)، و کانامایسین از سیگماآلدریچ؛ (ایالات متحده آمریکا) و نیکل NTA آگاروز از کیاژن (ایالت متحده آمریکا) خریداری شدند. ایزوپروپیل β-D-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) از تاکارا (ژاپن) و پودر نانوهیدروکسی‌آپاتیت از فاین نانو (ایران) تهیه شدند. محلول‌ها با استفاده از آب دیونیزه و همچنین بافر فسفات، تهیه شدند.سویه‌ی باکتری مورد استفاده در این مطالعه *E.coli BL21* می‌باشد که به‌عنوان میزبان بیان آنزیم cABC I استفاده شد.

۲-۲- بیان و تخلیص آنزیم

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

باکتری مورد نظر، به صورت شبانه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی (LB مایع) به همراه ۰،۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کانامایسین، کشت داده شده و اجازه داده شد سلول ها به OD_{600}=0.5 برسند. پس از آن، IPTG، با غلظت نهایی ۰،۷ میکرو مولار، افزوده شد تا بیان پروتئین را القا کند. محیط کشت در ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦ ساعت، انکوبه شد. پس از سانتریفیوژ (٤ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه و ٤۰۰۰ g) سلول‌ها، برداشت شدند. رسوب سلولی در بافر لیز، شامل پتاسیم فسفات ۵۰ میکرو مولار، کلرید سدیم ۳۰۰ میکرو مولار، ایمیدازول ۵ میکرو مولار با pH=6.8، حل شده و دیواره‌ی سلولی سلول‌ها، توسط سونیکاسیون، لیز شدند. آنزیم کندروئیتیناز ABCI نوترکیب، با N-ترمینال His Tag × 6 به سرعت از طریق ستون نیکل-سفارز تخلیص شد. آنزیم تخلیص شده، با SDS-PAGE چک شد[۱۹و۸و۷].

۳-۲- فرایند تثبیت

برای بررسی برهم‌کنش آنزیم کندروئیتیناز ABCI و نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت، ۰،۲ میلی‌لیتر از

آنزیم کندروئیتیناز ABCI (در بافر فسفات pH برابر ٦/۸)، با غلظت ۰،۲ mg/ml میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به ۰،۱ میلی‌گرم از پودر نانوهیدروکسی‌آپاتیت افزوده شد. سپس، مخلوط با هدف توزیع کامل نانوذرات در محلول آنزیم، در حمام التراسونیک (شرکت JAMES، مدل SONIC600M توان ۲۰۰ وات)، در ۵ سیکل ۱۵ دقیقه‌ای سونیکیت شد. پس از آن، مخلوط‌های حاوی آنزیم و پودر نانوهیدروکسی‌آپاتیت، بر روی استیرر، به مدت ٤ ساعت در دمای ٤ °C ، داخل یخچال نگه‌داری شدند. پس از گذشت زمان مربوط به هر یک از نمونه ها، هر کدام به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۲۰۰۰۰g سانترفیوژ شده و در نهایت رسوب‌های باقی‌مانده (آنزیم تثبیت شده) در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۵، ٦/۸ و ۸ حل شدند.شایان ذکر است جهت جداسازی آنزیم های آزاد، سامانه حاوی آنزیم سه مرتبه با بافر شستشو داده شد. همچنین، جهت بررسی و تفسیر نحوه تثبیت آنزیم بر روی نانوهیدروکسی آپاتیت از ابزار بیوانفورماتیکی YASARA (Version 20.12.24) استفاده شد.

٤-۲- بررسی فعالیت نانوسامانه (آنزیم کندروئیتیناز ABCI تثبیت شده بر نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت)

در اثر تجزیه گلیکوزآمینوگلیکان توسط آنزیم کندروئیتیناز ABCI، الیگو ساکاریدهای غیر اشباع تولید می‌شود. این ترکیبات به‌دلیل داشتن پیوند دوگانه بین C4 و C5 اسید اورونیک، طول موج ۲۳۲ نانومتر را جذب می‌کنند. برای سنجش میزان فعالیت آنزیمی از سوبسترای کندروئیتین ٤-سولفات با وزن مولکولی حدود ۵۰ کیلودالتون استفاده شد. فعالیت آنزیم کندروئیتیناز ABCI بر اساس افزایش جذب در طول موج ۲۳۲ نانومتر، اندازه‌گیری شد. برای این کار، ٤۰ میکرولیتر از نمونه آنزیمی به ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار به ترتیب با pH ۵، ٦،۸ و ۸ دارای کندروئیتین ٤-سولفات، با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. سپس، میزان افزایش جذب در طول موج ۲۳۲ نانومتر طی یک دقیقه اندازه‌گیری شد. با در نظر گرفتن ضریب جذب مولی (ε) محصول تولید شده که ۳۸۰۰ M^{-1} cm^{-1} است، واحد فعالیت آنزیمی به‌صورت مقداری از آنزیم که بتواند در طی یک دقیقه، یک میکرو مول محصول در حجم واکنش تولید کند، تعریف شد[۹و۷].

با نگهداری آنزیم کندروئیتیناز ABCI تثبیت شده در ٤ درجه سانتی‌گراد، در فواصل زمانی مختلف، به روش ذکر شده در بالا، باقی‌مانده‌ی فعالیت آنزیم‌ها، مورد سنجش قرار گرفتند. این مرحله سه بار تکرار شد[۷].

۵-۲- روش تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی-نشر میدانی (FEG-SEM)، (شرکت ZEISS آلمان-مدل Sigma VP)ریخت شناسی نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت قبل و بعد از تثبیت آنزیم، بررسی شد.

٦-٢- اثر pH روی فعالیت نانوسامانه

درصد فعالیت آنزیم تثبیت شده در سه pH اسیدی، خنثی و قلیایی، در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، تعیین شد، بافر فسفات ٥٠ میلی مولار با سه pH برابر ٥، ٦/٨ و ٨، تهیه شد. سپس، فعالیت آنزیم تثبیت شده در بافر با pHهای مختلف، سنجش شد.

٧-٢- بررسی پایداری نانوسامانه در دماهای مختلف

در این قسمت، pH بهینه ثابت اما دمای محیط سنجش متغیر بود. در سه دمای ٤، ٢٥ و ٣٧ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیمی سنجیده شد و با آنزیم آزاد مقایسه شد..

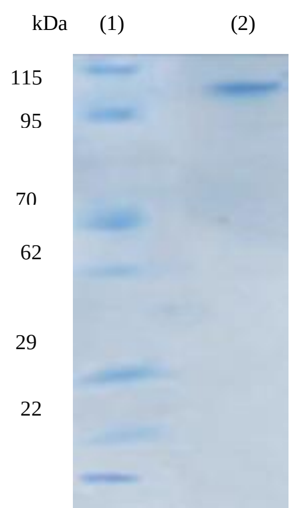
٣- نتایج و بحث

١-٣- بیان و تخلیص آنزیم کندروئیتیناز ABCI

خروجی های ستون تخلیص به کمک ژل SDS-PAGE بررسی شد و تک باندهایی با وزن مولکولی حدود ١١٢ کیلو دالتون را نشان داد (شکل١).

٢-٣- تثبیت آنزیم کندروئیتیناز ABCI بر روی هیدروکسی‌آپاتیت

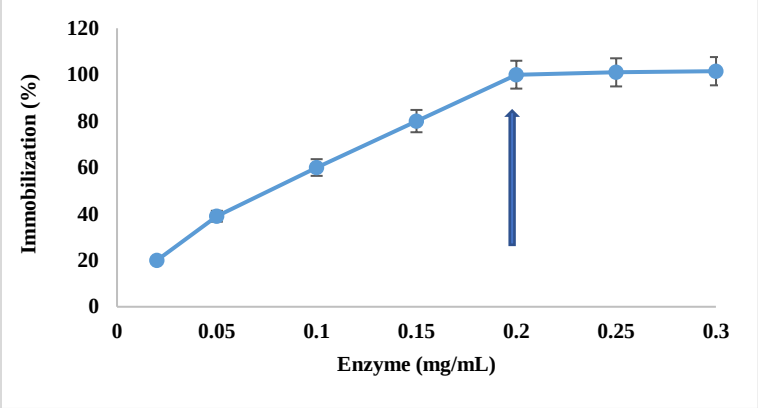
پودرنانوهیدروکسی‌آپاتیت، به‌عنوان بستر نانویی برای تثبیت آنزیم، بکار رفت. در ابتدا، با استفاده از ابزار بیوانفورماتیکی YASARA (Version 20.12.24) ساختار سه‌بعدی آنزیم مطالعه شد و باتوجه‌به فراوانی وجود آسپارتات و گلوتامات در ساختار آنزیم، پیش‌بینی شد که شلاته کردن گروه‌های کربوکسیلیک اسید از باقی‌مانده‌های آسپارتات (Asp) و گلوتامات (Glu) در زنجیره‌های جانبی آمینواسیدها، توسط یون های Ca^{2+} موجود در نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت، صورت می‌پذیرد. در نتیجه، با استفاده از روش برهم‌کنش مستقیم آنزیم کندروئیتیناز با نانوذره، فرایند تثبیت انجام شد. همچنین، برای به‌دست‌آوردن مقدار مناسب آنزیم جهت بارگذاری بر روی نانوهیدروکسی‌آپاتیت، فعالیت غلظت‌های مختلف آنزیم بارگذاری شده بر روی هیدروکسی‌آپاتیت بررسی شد. در ابتدا میزان فعالیت با افزایش غلظت آنزیم، افزایش یافت، و در غلظت ٠,٢ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بیشترین میزان فعالیت برای آنزیم تثبیت شده، مشاهده شد که در این غلظت حدود ٤٨ میکروگرم آنزیم، در هر ٠,١ میلی‌گرم نانوذره هیدروکسی‌آپاتیت بارگذاری شده است (بازده به دام افتادن آنزیم، حدود ٦٠ درصد است). برای غلظت‌های بالاتر از ٠,٢ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تغییرات قابل توجهی در میزان فعالیت آنزیم مشاهده نشد (شکل٢).



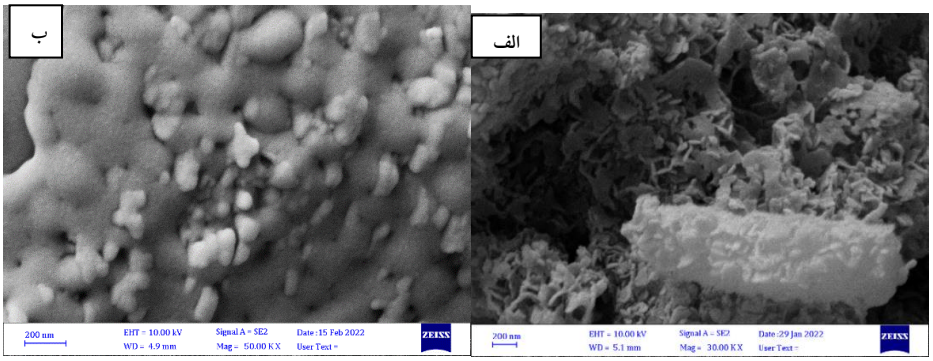
شکل١ برر سی SDS-PAGE آنزیم cABC. ١: ا ستاندارد جرم مولکولی؛ ٢: باند مربوط به تخلیص پروتئین. استاندارد جرم مولکولی بر حسب کیلو دالتون (kDa) مشخص شده است.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــ



شکل۲ اثر غلظت‌های مختلف آنزیم روی تثبیت آنزیم (با بررسی فعالیت در pH 6.8). در غلظت‌های بالاتر از ۰,۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تغییر قابل‌توجهی یافت نشد.



شکل۳ **الف)** تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی-نشر میدانی از نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت قبل از تثبیت آنزیم کندروئیتیناز ABCI؛ ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی-نشر میدانی از نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت بعد از تثبیت آنزیم کندروئیتیناز ABCI

تصاویر مربوط به نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت قبل و بعد از تثبیت آنزیم، به ترتیب در شکل‌های ۳ (الف وب) آورده شده است. در تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانوذرات هیدروکسی آپاتیت بعد از تثبیت آنزیم (شکل۳ ب)، یک لایه از آنزیم دیده می شود که تقریبا تمام سطح را می‌پوشاند و اینگونه به‌نظر می‌رسد که سطح با لایه‌هایی از آنزیم پوشیده شده است و بر اساس مطالعاتی که قبلا انجام شده است، تثبیت را تایید می‌کند[۷].

۳-۳- بررسی اثر pH بر فعالیت نانوسامانه (آنزیم کندروئیتیناز ABCI تثبیت شده بر نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت)

با استفاده از دستگاه طیف سنج نور مرئی-فرابنفش، در طول موج ۲۳۲ نانومتر، فعالیت آنزیم تثبیت شده، اندازه‌گیری شد. با توجه به روش تثبیت مورد استفاده، زمانی که یک آنزیم تثبیت می‌شود، تفاوت در پروفایل فعالیت pH رخ می‌دهد. با توجه به مشخصات فعالیت pH، پتانسیل الکتروستاتیکیِ ریز محیط آنزیم‌های تثبیت شده بر روی نانو بستر که حاوی گروه‌های عاملی یونیزه شده (مانند رزین‌های تبادلی با بار منفی یا مثبت است)، می‌تواند بر غلظت موضعی (H^+) تأثیر بگذارد، که به نوبه‌ی خود بر فعالیت pH مشاهده شده نیز، اثر می‌گذارد[۳]. همانطور که در شکل ٤ آورده شده است، در pH برابر با ۵ نسبت به دو pH دیگر درصد فعالیت

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

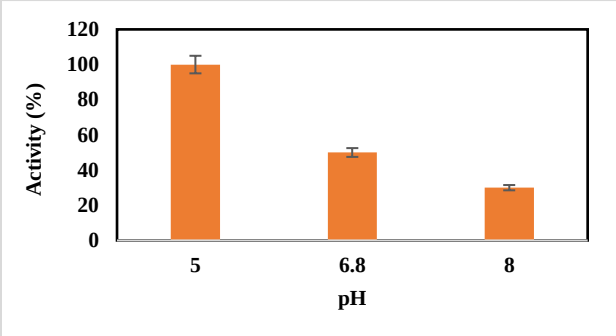
بالاتری به‌دست آمد. این مشاهده به‌دلیل این است که، افزایش pH باعث دپروتونه شدن تعدادی از باقی‌مانده‌های آمینواسیدهای آنزیم، می‌شود، در نتیجه پروتئین به‌طور فزاینده‌ای منفی می‌شود. آنزیم کندروئیتیناز ABCI، pH ایزوالکتریک ۸/۵ دارد و این آنزیم در pH پایینتر از ۸/۵، بار مثبت دارد[۷]. مطالعات گذشته بر روی تجزیه و تحلیل زتا نشان داده است که نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت، دارای بار منفی بوده (در محدوده‌ی pH ٤–٨) که با افزایش pH، حتی منفی‌تر هم می‌شوند[۱۰]. با توجه به اینکه با افزایش pH، پروتئین به‌طور فزاینده‌ای منفی می‌شود و نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت نیز بار منفی دارند، میزان فعالیت در pH برابر ۸ کاهش می‌یابد. با توجه به موارد گفته شده، شرایط اسیدی، کمتر باعث ایجاد دافعه بین آنزیم و بستر به‌دلیل بارهای مثبت و منفی، می‌شود. از این رو، در pH برابر ۵ میزان فعالیت بالاتری مشاهده می‌شود. نرخ انحلال نانوهیدروکسی‌آپاتیت در pH اسیدی بیشتر است، از این رو، می‌توان گفت تقریبا تمام مولکول‌های آنزیم، تدریجی، رها شده و سوبسترا به‌طور کامل در اختیار آنزیم قرار می‌گیرد.

در مطالعه‌ای که توسط عسکری‌پور و همکاران، انجام شد، فعالیت آنزیم کندروئیتیناز تثبیت شده بر نانوذرات Fe_3O_4، در محدوده pH (٤,٥–٩) بررسی شد و مشاهده شد که با افزایش pH، فعالیت آنزیم تثبیت شده افزایش یافته و در pH برابر با ٦,٥، به حداکثر می‌رسد. اما برای pH >٦,٥ کاهش می‌یابد. بنابراین، pH ٦,٥ به‌عنوان pH بهینه برای فرایند تثبیت آنزیم کندروئیتیناز بر نانوذرات Fe_3O_4، در نظر گرفته شد[۱۱]. pH ایزوالکتریک نانوذرات Fe_3O_4، برابر با ۲,۷ بوده و pH ایزوالکتریک آنزیم کندروئیتیناز ABCI برابر با ۸,۵ می‌باشد، از این رو، آنزیم دارای بار مثبت و نانوذرات Fe_3O_4 دارای بار منفی در pH مطلوب ٦,٥ می‌باشند[۱۱].

در مطالعه‌ای دیگر توسط همین تیم، فعالیت آنزیم کندروئیتیناز ABCI تثبیت شده بر نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 پوشش داده شده با دکستران، در محدوده pH (٦–٩)، مورد ارزیابی واقع شد و حداکثر فعالیت در pH برابر با ٦,٣ مشاهده شد[۱۲].

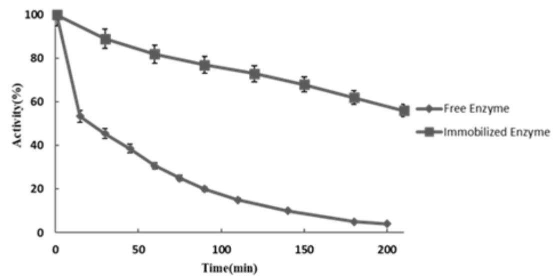
٤–۳– بررسی پایداری نانوسامانه در دماهای مختلف

تأثیر دما، روی فعالیت آنزیم تثبیت شده بر نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت، در شکل ۵، نشان داده شده است. درجه حرارت بهینه آنزیم تثبیت شده، ٤ درجه سانتی‌گراد بود. در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بعد از گذشت ۱۰۰ دقیقه، آنزیم آزاد حدود ۱۵ درصد از فعالیت خود را حفظ کرده است، در حالی که نانوسامانه حاوی آنزیم، حدود ٤۰ درصد از فعالیت خود را حفظ کرده است.

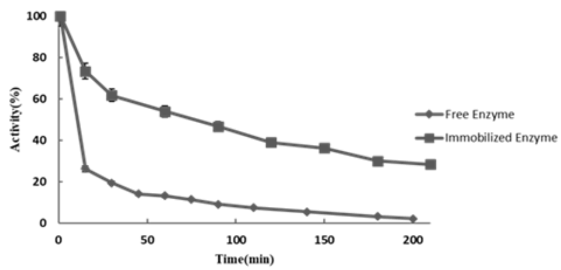


شکل ٤ تأثیر pH بر درصد فعالیت، در pH برابر ۵ درصد فعالیت بالاتری مشاهده می‌شود.

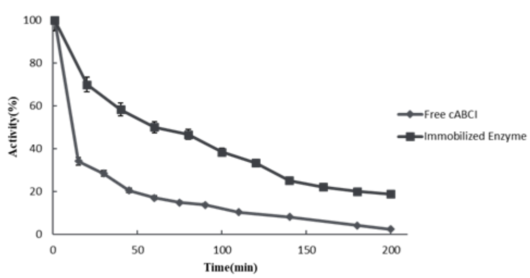
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]



(الف)



(ب)



(ج)

شکل۵ بررسی پایداری نانوسامانه و آنزیم آزاد، در دمای الف) ٤ درجه سانتی‌گراد، ب) ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ج) ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH برابر با ۵.

همچنین، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، نانوسامانه تقریبا، ٤۵ درصد از فعالیت اولیه خود، و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد،۷۰ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ می‌کند (شکل ۵). نتایج نشان می‌دهد که نانو سامانه حاوی آنزیم در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، دارای پایداری بالاتری نسبت به سایر دماها است. اما در سایر دماها مانند ۲۵و ۳۷ درجه

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

سانتی‌گراد نیز، نسبت به آنزیم آزاد، دارای پایداری بسیار بالاتری می‌باشد و تا یک ماه فعالیت خود را حفظ می‌کند که با توجه به پایداری کم آنزیم در کاربردهای بالینی، می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد. در نتیجه، تثبیت آنزیم بر روی نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت، به‌طور قابل توجهی پایداری نانوسامانه را در دماهای پایین تا بالا بهبود می‌بخشد و این به‌دلیل پیوندهای قوی است که بین مولکول‌های آنزیم و نانوبستر ایجاد می‌شود که از غیر فعال شدن آنزیم، جلوگیری می‌کند[۱۲].

در مطالعه‌ای که توسط عسکری‌پور و همکاران انجام شد، پایداری آنزیم کندروئیتیناز ABCI تثبیت شده بر نانوذرات Fe_3O_4، در سه دمای ۲۰-، ٤ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. آنزیم تثبیت شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ٦ روز، در ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۳ روز، و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦ ساعت نگه داشته شده و در بازه‌های زمانی مختلف، فعالیت باقی‌مانده آنزیم تثبیت شده، در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH برابر ۸ تعیین شد. مشاهده شد که آنزیم تثبیت شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد بعد از ٦ روز، ۹٦ درصد و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، بعد از ۲۳ روز ۹۹ درصد و بعد از ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۱۱ در صد از فعالیت اولیه خود را حفظ می‌کند. بنابراین، بدیهی است که پایداری آنزیم در دماهای پایین یعنی ۲۰- درجه سانتی‌گراد و ٤ درجه سانتی‌گراد به صورت چشم‌گیری بهبود یافته است چراکه در تثبیت آن‌ها بر نانوذرات Fe_3O_4، پیوندهای مستحکم‌تر آنزیم و بستر، از غیرفعال شدن حرارتی جلوگیری می‌کند. با این‌حال، پایداری ذخیره شده‌ی آنزیم در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بعد از تثبیت، کاهش می‌یابد. به‌دلیل نیروهای اتصالی ضعیف که بین آنزیم و حامل، در روش جذب فیزیکی، شکل می‌گیرد، با افزایش دما آنزیم کندروئیتیناز ABCI، از سطح حامل، جدا می شود. در نتیجه، میزان پایداری آنزیم تثبیت شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد[۱۱].

٤- نتیجه‌گیری

در این مطالعه، نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت برای تثبیت آنزیم کندروئیتیناز ABCI به کار رفت. نتایج نشان داد که آنزیم کندروئیتیناز ABCI می‌تواند به‌صورت مؤثری با یک روش جذبی ساده بر نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت تثبیت شود. و فرایند تثبیت منجر به برهم‌کنش با تمایل بالا بین آنزیم و نانو بستر در محدوده‌ی وسیعی از pH می‌شود. در این میان آنزیم تثبیت شده، در صد فعالیت بالاتری در pH برابر با ۵ از خود نشان داد. همچنین، پایداری این نانوسامانه حاوی آنزیم تثبیت شده بر نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت، با بررسی روزانه‌ی فعالیت آنزیم، در سه دمای ٤، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد سنجیده شد. یافته‌ها حاکی از آن بود که آنزیم تثبیت شده، فعالیت خود را در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد بیشتر حفظ می‌کند و تا یک ماه فعالیت خود را نگه می‌دارد، که با توجه به اینکه این آنزیم، به صورت آزاد، بسیار ناپایدار است و امکان نگهداری آن، برای مدت طولانی وجود ندارد، پایدارشدن آن در بستر نانویی هیدروکسی‌آپاتیت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، کمک بسیار مؤثری برای نگهداری طولانی مدت این آنزیم می‌باشد. علاوه بر این، به‌طور کلی مشخص شد نانو سامانه حاوی آنزیم، در سایر دماهای مورد بررسی نیز، نسبت به آنزیم آزاد، پایدارتر است و تا یک ماه فعالیت خود را حفظ می‌کند که با توجه به پایداری کم آنزیم آزاد و محدودیت در کاربرد بالینی آن، این بهبود پایداری در نانوسامانه حاوی آنزیم، می‌تواند کمک بزرگی به کاربرد بالینی این آنزیم کند.. هیدروکسی‌آپاتیت انحلال وابسته به pH دارد و می‌توان از طریق جایگزینی انواع مختلف یون‌ها، مانند کربنات، کلرید، یا فلورید انحلال آن را کنترل کردو با حلالیت آن، مواد شیمیایی یا داروها می‌توانند در مناطق

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــ

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

هدف خاص، رها شـوند. در نتیجه، این نانوسـامانه‌ی حاوی آنزیم کندروئیتیناز ABCI و نانوذرات هیدروکســـی‌آپاتیت می‌تواند برای بهبود کاربرد بالینی مورد اســـتفاده قرار گیرد و برای فائق آمدن بر محدودیت اســـتفاده از آنزیم آزاد، که فعالیت خود را به سرعت از دست می‌دهد، مورد توجه واقع شود.

۵- منابع

[1] Zhao RR, Fawcett JW. (2013) Combination treatment with chondroitinase ABC in spinal cord injury--breaking the barrier. Neurosci Bull. 29, 477-83

[2] Malgorzata P. (2016) Combined Delivery of Chondroitinase ABC (ChABC) and Stroma Cell Derived Factor 1α (SDF 1α) for Spinal Cord Regeneration. Chemical Engineering Applied Chemistry.

[3] Coutinho, TC., et al. (2018) Nanoimmobilization of β-glucosidase onto hydroxyapatite. International Journal of Biological Macromolecules. 119, 1042-1051

[4] Mingzu, Du., et al. (2021) Recent advances in biomedical engineering of nano-hydroxyapatite including dentistry, cancer treatment, and bone repair. Composites Part B: Engineering. 215, 108790

[5] Qi D, Gao M, Li X, Lin J. (2020) Immobilization of Pectinase onto Porous Hydroxyapatite/Calcium Alginate Composite Beads for Improved Performance of Recycle. ACS Omega. 5, 20062-20069

[6] Coutinho TC, Tardioli PW, Farinas CS. (2020) Hydroxyapatite nanoparticles modified with metal ions for xylanase immobilization. Int J Biol Macromol. 1, 344-353.

[7] Daneshjou, S., et al. (2017) Porous silicon nanoparticle as a stabilizing support for chondroitinase. International Journal of Biological Macromolecules. 852-858

[8] Naderi, MS., et al. (2018) Improving the stability of chondroitinase ABC I via interaction with gold nanorods. Int J Biol Macromol. 107, 297-304

[9] Nazari-Robati, M., et al. (2013) Enhancement of thermal stability of chondroitinase ABC I by site-directed mutagenesis: an insight from Ramachandran plot. Biochim. Biophys. Acta. 1834, 479–486

[10] Coutinho, TC., et al. (2020) Phytase Immobilization on Hydroxyapatite Nanoparticles Improves Its Properties for Use in Animal Feed. Appl Biochem Biotechnol 190, 270-292

[11] Askaripour, H., et al. (2019) Magnetite nanoparticle as a support for the stabilization of chondroitinase ABCI. Artificial Cells. Nanomedicine, and Biotechnology. 47, 2721-2728

[12] Askaripour, H., et al. (2020) Examination of chondroitinase ABC I immobilization onto dextran-coated Fe3O4 nanoparticles and its in-vitro release, Journal of Biotechnology. 309, 131-141

[13] Moslemi, D., et al. (2015) Synthesis of Nano Hydroxyapatite: Application in Drug Delivery of Sulfasalazine. Journal of Nanostructures 5, 361-366

[14] Wen, Yi., et al. (2021) Improvement of Drug-Loading Properties of Hydroxyapatite Particles Using Triethylamine as a Capping Agent: A Novel Approach. Crystals. 11, 703

[15] Zuidema, JM., et al. (2015) Nanoparticle Technologies in the Spinal Cord. Cells Tissues Organs. 202, 102–115

[16] Patra, JK., et al. (2018) Nano-based drug delivery systems: recent developments and future prospects. Journal of Nanobiotechnology. 16, 71

[17] Yamagata T, Saito H, Habuchi O, et al. (1968) Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. J Biol Chem. 243, 1523–1535

[18] Cabuk. B., et al. (2014) B-Galactosidase immobilization on chitosan-hydroxyapatite complex: effects of immobilization conditions. Journal of Nutritional Health & Food Engineering. 1, 13-23

[19] Daneshjou, S., et al. (2020) Catalytic parameters and thermal stability of chondroitinase ABC1 on red porous silicon nanoparticles. Journal of Biotechnology 324, 83-90

[20] Mohammad, NF., et al. (2014) Nanoporous hydroxyapatite preparation methods for drug delivery applications. Reviews on Advanced Materials Science 38, 138-147

Examination of the effect of pH and temperature on the activity of nanosystem containing chondroitinase ABCI based on hydroxyapatite

Fatemeh Afraei[1], Sara Daneshjou[2*], Bahareh Dabirmanesh[3]

1. MSc Student, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2.Assistant Professor, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

s.daneshjou@modares.ac.ir

Receipt: 2023/01/30 Accepted: 2023/04/10

ABSTRACT

Chondroitinase ABCI is a bacterial lyase that degrades glycosaminoglycans and promotes axonal growth and functional improvement. However the stability and maintenance of this enzyme is very limited. One of the strategies to overcome this limitation is to immobilize the enzyme. In this research, chondroitinase ABCI (cABCI) from Proteus Vulgaris was immobilized on hydroxyapatite nanoparticles. Hydroxyapatite is a non-toxic ceramic biomaterial that has a high surface area, which is beneficial for loading a large amount of enzyme. Therefore, to increase the stability of chondroitinase ABCI, immobilization on hydroxyapatite nanoparticles for 4 hours through physical adsorption in phosphate buffer pH 5, 6.8, and 8 at 4◦C was carried out. Enzyme immobilization on hydroxyapatite nanoparticles was then confirmed by field emission gun-scanning electron microscopy and UV-spectroscopy, before and after immobilization. Then, in order to obtain the optimal pH and temperature, the activity of the nanosystem was investigated at three pH and temperatures (4°C, 25°C, and 37°C). Results revealed higher activity at pH 5 and temperature 4 ◦C than the other pH and temperatures for the nanosystem. Based on the obtained results, which show the stability of the nanosystem at all three temperatures compared to the free enzyme, this nanosystem could be a potential candidate for clinical applications in future.

Keywords: Chondroitinase ABCI, Hydroxyapatite, Stability, Nanosystem

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]