

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

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 ۱۱۱-۱۴۱۱۵، تهران، ایران

s.daneshjou@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۲۱

دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۰

چکیده

آنزیم کندروئیتیناز ABCI نو ترکیب، یک لیاژ باکتریایی است که گلیکوزآمینوگلیکان‌ها را تجزیه می‌کند و موجب رشد آکسون‌ها و بهبود عملکرد می‌شود. اما نگهداری این آنزیم به دلیل 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 و لگاریس بر نانوذرات هیدروکسی آپاتیت، تثبیت شد. هیدروکسی آپاتیت 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 ۴ ساعت از طریق جذب فیزیکی در بافر فسفات در سه pH ۵، ۶/۸ و ۸ در دمای ۴ 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 نانو سیستم (نانوهیدروکسی آپاتیت حاوی آنزیم) در سه pH و دما (۴°C، ۲۵°C و ۳۷°C) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج فعالیت بالاتری را در pH ۵ و دمای ۴°C نسبت به سایر pH و دماها برای نانو سیستم نشان داد. بر اساس نتایج بدست آمده که نشان دهنده پایداری سامانه حاوی آنزیم در هر سه دما نسبت به آنزیم آزاد می‌باشد، این نانو سیستم می‌تواند یک گزینه مناسب برای کاربردهای بالینی در آینده باشد.

کلید واژگان: آنزیم کندروئیتیناز، پایداری، نانوسامانه، هیدروکسی آپاتیت

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 این حال، به دلیل پیچیدگی نخاع آسیب دیده، 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 ۱۴ 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، به دلیل وجود زنجیره‌های گلیکوزآمینوگلیکان، است [۱]. آنزیم کندروئیتیناز ABCI، یک آنزیم باکتریایی جداسازی شده از باکتری پروتئوسولگاریس، می‌باشد که قادر به تجزیه‌ی زنجیره‌های گلوکز آمینوگلیکان موجود در پروتئوگلیکان‌ها بوده و در تسهیل بازسازی 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 خنک سازی 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 نانوسامانه‌ها، احتمال تغییر در ساختار و در نتیجه 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 به عنوان پایدارکننده رها شده است [۲]. تنها یک گزارش از کپسوله کردن موفقیت‌آمیز آنزیم کندروئیتیناز ABCI در میکروسفرهای پلی-اسیدلاکتیک وجود دارد، با این حال، میکروسفرهای حاصل بزرگ هستند و احتمالاً از طریق سوزن ظریف قابل تزریق نیستند [۲]. یک سامانه ایده‌آل، برای تحویل آنزیم کندروئیتیناز ABCI به نخاع آسیب‌دیده باید زیست سازگار، 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، هیدروکسی آپاتیت (HA)، می‌باشد که فاقد سمیت بوده و می‌تواند در ابعاد نانومتری، ساخته شود. جذب پروتئین‌ها روی هیدروکسی آپاتیت، برای کاربردهای مختلفی

مانند جدا سازی پروتئین ها تو سط کروماتوگرافی، باز سازی استخوان در زیست پزشکی، دارو-رسانی در صنعت دارویی، انجام شده است [۳]. ساختار هیدروکسی آپاتیت شامل گروه های کلسیم و فسفات است که برای جذب یونی شامل گروه های جانبی پروتئین، در دسترس قرار دارند. همچنین، یون های کلسیم حاضر در هیدروکسی آپاتیت، می توانند تحت فرایند شلاته کردن با گروه های کربوکسیلیک اسید حاضر در اسید آمینه های آنزیم ها، منجر به برهم کنش های با پایداری بالا، برای تثبیت شود [۳]. هیدروکسی آپاتیت، جزء معدنی اصلی دندان و استخوان است. به دلیل زیست سازگاری خوب و فعالیت بیولوژیکی، به طور گسترده، در کلینیک های دندانپزشکی و در ترمیم استخوان، استفاده می شود [۴]. نانوهیدروکسی آپاتیت، نوعی از نانومواد با اندازه کوچک در دانه ها، سطح بزرگ، انرژی آزاد سطح و انرژی اتصال بالا و خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد می باشد. همچنین، از نانوهیدروکسی آپاتیت به عنوان حامل دارو، برای تحویل داروهای ضد تومور، استفاده می شود [۴]. در این منظر، یک حامل ایده آل، برای تثبیت آنزیم است. در مطالعات صورت گرفته، آنزیم تثبیت شده بر بستر هیدروکسی آپاتیت، بسیار پایدار است [۵].

مطالعات اخیر، استفاده از هیدروکسی آپاتیت را به عنوان بستر، برای تثبیت آنزیم ها، ارزیابی کرده اند. آنزیم لیپاز بر روی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت، برای استفاده در صنعت غذایی، تثبیت شد [۶]. آنزیم بتا-گلوکوزیداز، بر روی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت، با هدف به دست آوردن مشتقات با کاربردهای مختلف در صنایع کشاورزی، تثبیت شد [۶]. همچنین، آنزیم فیتاز، بر روی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت برای کاربرد در صنعت خوراک دهی حیوانات، تثبیت شده است [۶].

در این مطالعه، با هدف دستیابی به بهبود فعالیت دارویی، آنزیم کندروئیتیناز نو ترکیب بر نانوذرات هیدروکسی آپاتیت تثبیت شد. این فرایند در سه pH برابر ۵، ۶/۸ و ۸ در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد و پایداری نانو سامانه حاوی آنزیم در دماهای مختلف بررسی شد. شایان ذکر است، نانو هیدروکسی آپاتیت، 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 آن ها، برهم کنش هیدروکسی آپاتیت با زنجیره های جانبی آنزیم را امکان پذیر می کند. به این صورت که با شلاته کردن گروه های کربوکسیلیک اسید موجود در اسید آمینه های آنزیم ها، منجر به تشکیل پیوند کوئوردیناسی می شود. هیدروکسی آپاتیت دارای مساحت سطح بالایی می باشد، که برای بارگذاری مقدار زیادی از آنزیم سودمند است. این نانوحامل نیاز به هیچگونه اصلاح شیمیایی اضافه ای ندارد، از این رو، استفاده از آن، مقرون به صرفه و با کاهش بکارگیری تکنیک ها همراه است [۳].

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد شیمیایی

مواد شیمیایی شامل کندروئیتین ۴-سولفات، پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)، و کالسیوم مایسین از سیگما آلد ریچ؛ (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 نانوهیدروکسی آپاتیت از فاین نانو (ایران) تهیه شدند. محلول ها با استفاده از آب دیونیزه و همچنین بافر فسفات، تهیه شدند. سویه ی باکتری مورد استفاده در این مطالعه *E.coli BL21* می باشد که به عنوان میزبان بیان آنزیم cABC I استفاده شد.

۲-۲- بیان و تخلیص آنزیم

۵، ۶/۸ 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.

۴-۲- بررسی فعالیت نانوسامانه (آنزیم کندروئیتیناز

ABCI تثبیت شده بر نانوذرات هیدروکسی آپاتیت)

در اثر تجزیه گلیکوزآمینوگلیکان توسط آنزیم کندروئیتیناز ABCI، الیگو ساکاریدهای غیر اشباع تولید می شود. این ترکیبات به دلیل داشتن پیوند دوگانه بین C4 و C5 اسید اورونیک، طول موج ۲۳۲ نانومتر را جذب می کنند. برای سنجش میزان فعالیت آنزیمی از سوبسترای کندروئیتین ۴- سولفات با وزن مولکولی حدود ۵۰ کیلودالتون استفاده شد. فعالیت آنزیم کندروئیتیناز ABCI بر اساس افزایش جذب در طول موج ۲۳۲ نانومتر، اندازه گیری شد. برای این کار، ۴۰ میکرولیتر از نمونه آنزیمی به ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار به ترتیب با pH ۵، ۶/۸ و ۸ دارای کندروئیتین ۴- سولفات، با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه شد. سپس، میزان افزایش جذب در طول موج ۲۳۲ نانومتر طی یک دقیقه اندازه گیری شد. با در نظر گرفتن ضریب جذب مولی (ε) محصول تولید شده که $3800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ است، واحد فعالیت آنزیمی به صورت مقداری از آنزیم که بتواند در طی یک دقیقه، یک میکرو مول محصول در حجم واکنش تولید کند، تعریف شد [۷ و ۹].

با نگهداری آنزیم کندروئیتیناز ABCI تثبیت شده در ۴ درجه سانتی گراد، در فواصل زمانی مختلف، به روش ذکر شده در بالا، باقی مانده های فعالیت آنزیم ها، مورد سنجش قرار گرفتند. این مرحله سه بار تکرار شد [۷].

۵-۲- روش تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی

باکتری مورد نظر، به صورت شبانه در ۳۷ درجه سانتی گراد، در ۵۰۰ میلی لیتر محیط کشت لوریا برتانی (LB مایع) به همراه ۰/۰۵ میلی گرم بر میلی لیتر کانامایسین، کشت داده شده و اجازه داده شد سلول ها به $\text{OD}_{600}=0.5$ 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 سانتی گراد به مدت ۶ ساعت، انکوبه شد. پس از سانتریفیوژ (۴ درجه سانتی گراد، ۱۰ دقیقه و ۴۰۰۰ g) سلول ها، برداشت شدند. رسوب سلولی در بافر لیز، شامل پتاسیم فسفات ۵۰ میکرو مولار، کلرید سدیم ۳۰۰ میکرو مولار، ایمیدازول ۵ میکرو مولار با $\text{pH}=6.8$ ، حل شده و دیواره ی سلولی سلول ها، توسط سونیکاسیون، لیز شدند. آنزیم کندروئیتیناز ABCI نو ترکیب، با N-ترمینال His Tag $6 \times$ به سرعت از طریق ستون نیکل-سفاز تخلیص شد. آنزیم تخلیص شده، با SDS-PAGE چک شد [۷ و ۹].

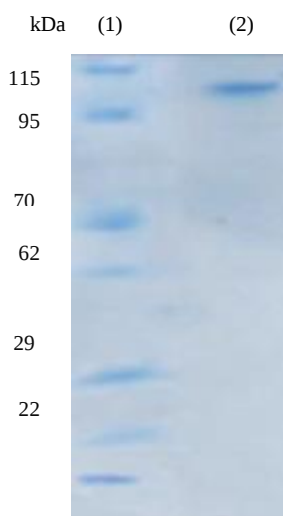
۳-۲- فرایند تثبیت

برای بررسی برهم کنش آنزیم کندروئیتیناز ABCI و

نانوذرات هیدروکسی آپاتیت، ۰/۲ میلی لیتر از

آنزیم کندروئیتیناز ABCI (در بافر فسفات pH برابر ۶/۸)، با غلظت ۰/۲ mg/ml بر میلی گرم بر میلی لیتر، به ۰/۱ میلی گرم از پودر نانوهیدروکسی آپاتیت 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 دقیقه ای سونیکیت شد. پس از آن، مخلوط های حاوی آنزیم و پودر نانوهیدروکسی آپاتیت، بر روی استیرر، به مدت ۴ ساعت در دمای 4°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 ۲۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شده و در نهایت رسوب های باقی مانده (آنزیم تثبیت شده) در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH برابر

یون های Ca^{2+} موجود در نانوذرات هیدروکسی آپاتیت، صورت می پذیرد. در نتیجه، با استفاده از روش برهم کنش مستقیم آنزیم کندروئیتیناز با نانوذره، فرایند تثبیت انجام شد. همچنین، برای به دست آوردن مقدار مناسب آنزیم جهت بارگذاری بر روی نانوهیدروکسی آپاتیت، فعالیت غلظت های مختلف آنزیم بارگذاری شده بر روی هیدروکسی آپاتیت بررسی شد. در ابتدا میزان فعالیت با افزایش غلظت آنزیم، افزایش یافت، و در غلظت 0.2 میلی گرم بر میلی لیتر، بیشترین میزان فعالیت برای آنزیم تثبیت شده، مشاهده شد که در این غلظت حدود 48 میکروگرم آنزیم، در هر 0.1 میلی گرم نانوذره هیدروکسی آپاتیت بارگذاری شده است (بازده به دام افتادن آنزیم، حدود 60 درصد است). برای غلظت های بالاتر از 0.2 میلی گرم بر میلی لیتر، تغییرات قابل توجهی در میزان فعالیت آنزیم مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۱: بررسی SDS-PAGE آنزیم ABC. ۱: استاندارد جرم مولکولی؛ ۲: باند مربوط به تخلیص پروتئین. استاندارد جرم مولکولی بر حسب کیلو دالتون (kDa) مشخص شده است.

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

۶-۲- اثر pH روی فعالیت نانوسامانه

درصد فعالیت آنزیم تثبیت شده در سه pH اسیدی، خنثی و قلیایی، در دمای 4 درجه سانتی گراد، تعیین شد، بافر فسفات 50 میلی مولار با سه pH برابر 5 ، $6/8$ و 8 ، تهیه شد. سپس، فعالیت آنزیم تثبیت شده در بافر با pH های مختلف، سنجش شد.

۷-۲- بررسی پایداری نانوسامانه در دماهای مختلف

در این قسمت، pH بهینه ثابت اما دمای محیط سنجش متغیر بود. در سه دمای 4 ، 25 و 37 درجه سانتی گراد فعالیت آنزیمی سنجیده شد و با آنزیم آزاد مقایسه شد.

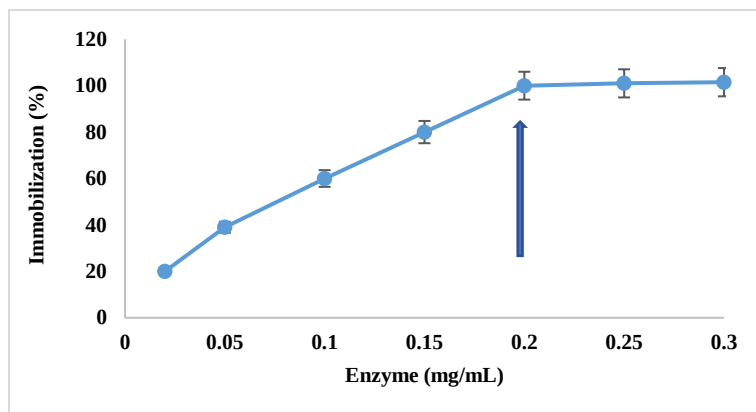
۳- نتایج و بحث

۱-۳- بیان و تخلیص آنزیم کندروئیتیناز ABCI

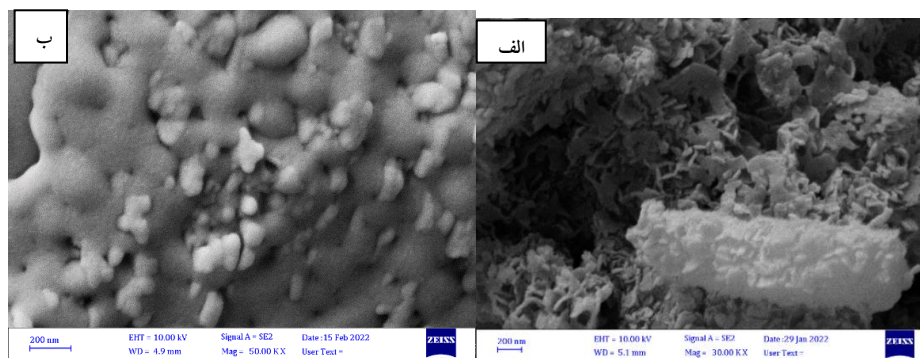
خروجی های ستون تخلیص به کمک ژل SDS-PAGE بررسی شد و تک باندهایی با وزن مولکولی حدود 112 کیلو دالتون را نشان داد (شکل ۱).

۳-۲- تثبیت آنزیم کندروئیتیناز ABCI بر روی هیدروکسی آپاتیت

پودر نانوهیدروکسی آپاتیت، به عنوان بستر نانویی برای تثبیت آنزیم، بکار رفت. در ابتدا، با استفاده از ابزار بیوانفورماتیکی YASARA (Version 20.12.24) ساختار سه بعدی آنزیم مطالعه شد و با توجه به فراوانی وجود آسپاراتات و گلو تامات در ساختار آنزیم، پیش بینی شد که شلاته کردن گروه های کربوکسیلیک اسید از باقی مانده های آسپاراتات (Asp) و گلو تامات (Glu) در زنجیره های جانبی آمینو اسیدها، توسط



شکل ۲ اثر غلظت‌های مختلف آنزیم روی تثبیت آنزیم (با بررسی فعالیت در pH 6.8). در غلظت‌های بالاتر از ۰.۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تغییر قابل توجهی یافت نشد.



شکل ۳ (الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی-نشر میدانی از نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت قبل از تثبیت آنزیم کندروئیناز ABCI؛ (ب)

تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی-نشر میدانی از نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت بعد از تثبیت آنزیم کندروئیناز ABCI

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 الکتروستاتیکی ریز محیط آنزیم‌های تثبیت شده بر روی نانو بستر که حاوی گروه‌های عاملی یونیزه شده (مانند رزین‌های تبدلی 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 ۴ آورده شده است، در pH برابر با ۵ نسبت به دو pH دیگر درصد فعالیت

تصاویر مربوط به نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت قبل و بعد از تثبیت آنزیم، به ترتیب در شکل‌های ۳ (الف و ب) آورده شده است. در تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت بعد از تثبیت آنزیم (شکل ۳ ب)، یک لایه از آنزیم دیده می‌شود که تقریباً تمام سطح را می‌پوشاند و اینگونه به نظر می‌رسد که سطح با لایه‌هایی از آنزیم پوشیده شده است و بر اساس مطالعاتی که قبلاً انجام شده است، تثبیت را تایید می‌کند [۷].

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

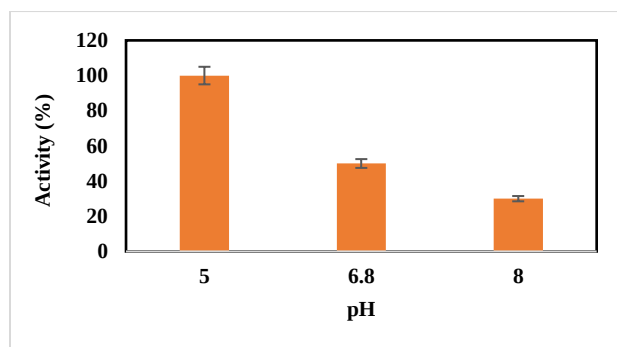
برابر با ۶,۵، به حداکثر می‌رسد. اما برای $pH > 6.5$ کاهش می‌یابد. بنابراین، $pH 6.5$ به‌عنوان pH بهینه برای فرایند تثبیت آنزیم کندروئیتیناز بر نانوذرات Fe_3O_4 ، در نظر گرفته شد [۱۱]. pH ایزوالکتریک نانوذرات Fe_3O_4 برابر با ۲,۷ بوده و pH ایزوالکتریک آنزیم کندروئیتیناز ABCI برابر با ۸,۵ می‌باشد، از این رو، آنزیم دارای بار مثبت و نانوذرات Fe_3O_4 دارای بار منفی در pH مطلوب ۶,۵ 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 $pH (6-9)$ ، مورد ارزیابی واقع شد و حداکثر فعالیت در pH برابر با ۶,۳ مشاهده شد [۱۲].

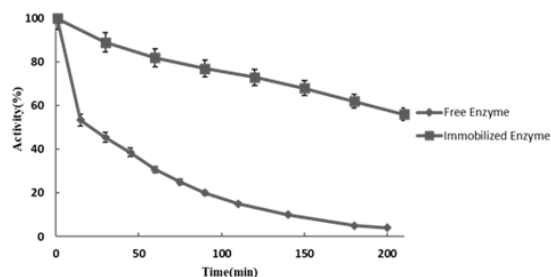
۳-۴- بررسی پایداری نانوسامانه در دماهای مختلف

تأثیر دما، روی فعالیت آنزیم تثبیت شده بر نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت، در شکل ۵، نشان داده شده است. درجه حرارت بهینه آنزیم تثبیت شده، ۴ 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 ۴۰ درصد از فعالیت خود را حفظ کرده است.

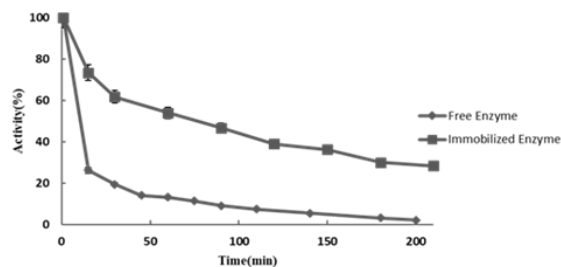
بالاتری به‌دست آمد. این مشاهده به‌دلیل این است که، افزایش pH باعث دپروتونه شدن تعدادی از باقی‌مانده‌های آمینواسیدهای آنزیم، می‌شود، در نتیجه پروتئین به‌طور فزاینده‌ای منفی می‌شود. آنزیم کندروئیتیناز ABCI، pH ایزوالکتریک ۸/۵ دارد و این آنزیم در pH پایتتر از ۸/۵ بار مثبت دارد [۷]. مطالعات گذشته بر روی تجزیه و تحلیل زتا نشان داده است که نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت، دارای بار منفی بوده (در محدوده $pH 4-8$) 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 تقریباً 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 $pH (5.9-9)$ بررسی شد و مشاهده شد که با افزایش pH ، فعالیت آنزیم تثبیت شده افزایش یافته و در pH



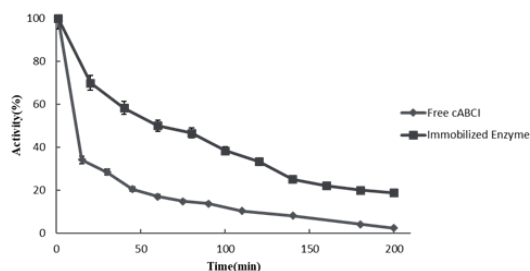
شکل ۴ تأثیر pH بر درصد فعالیت، در pH برابر ۵ درصد فعالیت بالاتری مشاهده می‌شود.



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۵ بررسی پایداری نانوسامانه و آنزیم آزاد، در دمای الف) ۴ درجه سانتی گراد، ب) ۲۵ درجه سانتی گراد و ج) ۳۷ درجه سانتی گراد در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH برابر با ۵.

(شکل ۵). نتایج نشان می‌دهد که نانوسامانه حاوی آنزیم در دمای ۴ درجه سانتی گراد، دارای پایداری بالاتری نسبت به سایر دماها است. اما در سایر دماها مانند ۲۵ و ۳۷ درجه

همچنین، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، نانوسامانه تقریباً ۴۵ درصد از فعالیت اولیه خود، و در دمای ۴ درجه سانتی گراد، ۷۰ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ می‌کند

در نتیجه، میزان پایداری آنزیم تثبیت شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد [۱۱].

۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه، نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت برای تثبیت آنزیم کندروئیتیناز 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 ۴، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد سنجیده شد. یافته‌ها حاکی از آن بود که آنزیم تثبیت شده، فعالیت خود را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بیشتر حفظ می‌کند و تا یک ماه فعالیت خود را نگه می‌دارد، که با توجه به اینکه این آنزیم، به‌صورت آزاد، بسیار ناپایدار است و امکان نگهداری آن، برای مدت طولانی وجود ندارد، پایدار شدن آن در بستر نانویی هیدروکسی‌آپاتیت در دمای ۴ 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 کرد و با حلالت آن، مواد شیمیایی یا داروها می‌توانند در مناطق

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-، ۴ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. آنزیم تثبیت شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ روز، در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۳ روز، و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت نگه داشته شده و در بازه‌های زمانی مختلف، فعالیت باقی‌مانده آنزیم تثبیت شده، در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۸ تعیین شد. مشاهده شد که آنزیم تثبیت شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد بعد از ۶ روز، ۹۶ درصد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، بعد از ۲۳ روز ۹۹ درصد و بعد از ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۱۱ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ می‌کند. بنابراین، بدیهی است که پایداری آنزیم در دماهای پایین یعنی ۲۰- درجه سانتی‌گراد و ۴ درجه سانتی‌گراد به‌صورت 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 این حال، پایداری ذخیره شده‌ی آنزیم در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بعد از تثبیت، کاهش می‌یابد. به‌دلیل نیروهای اتصال ضعیف که بین آنزیم و حامل، در روش جذب فیزیکی، شکل می‌گیرد، با افزایش دما آنزیم کندروئیتیناز ABCI، از سطح حامل، جدا می‌شود.

- [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

هدف خاص، رها شوند. در نتیجه، این نانوسامانه‌ی حاوی آنزیم کندروئیتیناز ABCI و نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت می‌تواند برای بهبود کاربرد بالینی مورد استفاده قرار گیرد و برای فائق آمدن بر محدودیت استفاده 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 1 α (SDF 1 α) 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

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

Fatemeh Afraei¹, Sara Daneshjou^{2*}, Bahareh Dabirmanesh³

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