**بررسی پایداری نانوسامانه‌ حاوی آنزیم کندروئیتیناز ABCI بر پایه هیدروکسی‌آپاتیت**

فاطمه افرایی۱، سارا دانشجو2\*، بهاره دبیرمنش۳

|  |  |
| --- | --- |
| 1 دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد نانوبیوتکنولوژی، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران | fatemeh.afraei@modares.ac.ir |
| 2\* استادیار گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران | s.daneshjou@modares.ac.ir |
| ۳ استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران | dabirmanesh@modares.ac.ir |

# چكيده

در این مطالعه، آنزیم کندروئیتیناز جداسازی شده از باکتری پروتئوس ولگاریس بر نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت، تثبیت شد. آنزیم دارویی کندروئیتیناز ABCI ماندگاری کمی داشته و محققین برای فائق آمدن به محدودیت استفاده از این آنزیم، تثبیت آنزیم راپیشنهاد کرده‌اند. هیدروکسی‌آپاتیت یک زیست مواد سرامیکی فاقد سمیت بوده که دارای مساحت سطح بالایی می‌باشد، که برای بارگذاری مقدار زیادی از آنزیم سودمند است. در این مطالعه، با هدف دستیابی به بهبود فعالیت دارویی، آنزیم کندروئیتیناز بر نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت، در سه زمان ۴،۱ و ۱۲ ساعت در دمای ◦C۴ تثبیت گردید. مشخصه‌یابی آنزیم تثبیت شده با استفاده از روش تصویربرداری به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی- نشر میدانی و طیف‌سنجی فرابنفش و کندروئیتین ۴-سولفات به عنوان سوبسترا، انجام شد. آنزیم‌های تثبیت شده در مدت زمان ۱ و ۴ ساعت فعالیت بهتری نسبت به آنزیم تثبیت شده در مدت زمان ۱۲ ساعت داشتند به طوری که آنزیم تثبیت شده به مدت ۱۲ ساعت، پس از یک هفته، ٪ ۱۹ فعالیت اولیه‌ی خود را، و آنزیم تثبیت شده به مدت ۱ و ۴ ساعت به ترتیب ٪ ۳۹ و ٪ ۲۸ از فعالیت اولیه‌ی خود را حفظ کردند و این حالت تا حدود یک ماه باقی ماند.

**کليدواژه­ها:** آنزیم کندروئیتیناز، پایداری، نانوسامانه، هیدروکسی‌آپاتیت

**Stability examination of nanosystem containing chondroitinase ABCI based on hydroxyapatite**

**Fatemeh Afraei1, Sara Daneshjou2\*, Bahareh Dabirmanesh3**

|  |  |
| --- | --- |
| 1 MSc Student, Nanobiotechnology Department, Faculty of Biological Science, Tarbiat ModaresUniversity, Tehran, Iran | fatemeh.afraei@modares.ac.ir |
| 2\*Assistant Professor, Nanobiotechnology Department, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran | s.daneshjou@modares.ac.ir |
| 3Assistant Professor, Biochemistry Department, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  | dabirmanesh@modares.ac.ir |

**Abstract**

In this study, chondroitinase ABCI (cABCI), isolated from Proteus vulgaris was immobilized on hydroxyapatite nanoparticles. The maintenance of this enzyme is very limited. To overcome the limitation of using this enzyme, researchers have proposed enzyme immobilization. Hydroxyapatite is a non-toxic ceramic biomaterial that has a high surface area, which is beneficial for loading a large amount of enzyme. In this study, in order to improve the clinical activity, chondroitinase ABCI was immobilized on hydroxyapatite nanoparticles at three times of 1, 4 and 12 hours at 4◦C. Characterization of the immobilized enzymes was carried out using the field emission gun- scanning electron microscopy and UV-spectroscopy and chondroitin 4-sulfate as a substrate. The immobilized enzymes in 1 and 4 hours had better activity than the immobilized enzymes in 12 hours. After one week, the immobilized enzyme for 12 hours, maintained 19% of its initial activity, and the immobilized enzyme for 1 and 4 hours, maintained 39% and 28% of its initial activity, respectively. This state remained for about a month.

**Keywords:** Chondroitinase ABCI, Hydroxyapatite, Stability, Nanosystem

**مقدمه**

تشکیل اسکار گلیال از بیشترین تغییرات واکنشی است، که به دنبال ضایعه‌ی نخاعی، رخ می‌دهد؛ یک فرآیند واکنشی سلولی که موجب تجمع سلول‌های گلیال و احاطه گشتن نواحی آسیب دیده‌ی سیستم عصبی مرکزی توسط آن‌ها، با هدف بسته شدن زخم، میگردد. با این حال، اسکار گلیال یک مانع فیزیکی و یک مانع مولکولی نیز برای بازسازی آکسون‌های آسیب دیده، ایجاد نموده و از رشد مجدد و ترمیم آکسونی جلوگیری می‌کند. یک دسته از مولکول‌های بازدارنده‌ی مرتبط با ماتریکس خارج سلولی اسکار گلیال، پروتئوگلیکان‌های کندروئیتین سولفات می‌باشند .پروتئوگلیکان‌های کندروئیتین سولفات از یک هسته‌ی پروتئینی با یک یا چند زنجییره‌ی گلیکوز آمینوگلیکان کندروئیتین سولفات، که به صورت کووالان به آن متصل می‌شوند، تشکیل شده است. آنزیم باکتریایی کندروئیتیناز ABC لیاز (cABC1, EC 4.2.2.4)، زنجییره‌های گلیکوز آمینوگلیکان را تجزیه کرده و عمل بازدارندگی به وسیله‌ی پروتئوگلیکان‌های کندروئیتین سولفات را کاهش میدهد. شواهد به دست آمده مبنی بر اینکه زنجییره‌های قندی گلیکوز آمینوگلیکان، جزء مهاری اصلی مولکول‌های پروتئوگلیکان‌های کندروئیتین سولفات است، حاصل مطالعات صورت گرفته روی آنزیم باکتریایی کندروئیتیناز ABCI می‌باشد [1-2]. در مطالعات اولیه، که ابتدا اثرات درمانی آنزیم کندروئیتیناز ABC، به عنوان یک استراتژی برای ارتقای بازسازی عصبی نشان داده شد؛ آنزیم از طریق تزریق اینتراتکال به نخاع منتقل شد، با این حال، این روش ممکن است نیاز به تزریق‌های متعدد برای اثربخشی داشته باشد، چراکه آنزیم به سرعت اثر خود را از دست داده است. بنابراین، استراتژی‌های جایگزین تحویل آنزیم مورد بررسی قرار گرفته‌اند. آنزیم کندروئیتیناز ABC ، در ⸰۳۷ سانتیگراد ناپایدار است و بیشتر فعالیت آن در ۷۲ ساعت از بین میرود. تحویل آنزیم کندروئیتیناز ABC از داربست‌ها، به منظور افزایش پایداری آنزیم و دستیابی به رهاسازی آهسته، مورد ارزیابی قرار گرفته شده است. *نی و همکاران*، از میکروفیبرهای پلی(پروپیلن کربنات)-کیتوزان به جهت طولانی کردن رهایش آنزیم کندروئیتیناز ABC استفاده کرده و مطالعه‌ در شرایط آزمایشگاهی، نشان داد که بیشتر آنزیم کندروئیتیناز ABC تا ۱۰ روز رها شده است، اما فقط ٪۲۶ از این مقدار، آنزیم فعال بوده است. یافته‌ها نشان میدهد که در حال حاضر این روش تحویل، تأثیر قابل توجهی بر بهبود عملکرد ندارند [2]. تحویل آنزیم کندروئیتیناز ABCIاز طریق نانوذرات نسبت به میکروفیبرهای پلی(پروپیلن کربنات)-کیتوزان، برتری دارد. نانوذرات، ابزار قدرتمندی هستند؛ که دارای طیف وسیعی از کاربردهای مهم بالینی و تحقیقاتی در نخاع بوده و نویدبخش برای تحویل دارو به نخاع آسیب دیده می‌باشند [6]. در مطالعه‌ای که توسط *دانشجو و همکاران*،صورت گرفت، از نانوذرات سیلیکون متخلخل به عنوان یک بستر پایدارکننده برای حمل آنزیم cABCI، استفاده شده و تثبیت آنزیم، به صورت چشم‌گیری، پایداری آنزیم را در دماهای مختلفی، افزایش داده است. به طور مثال در ⸰۴ سانتی‌گراد ، ٪۲۰ فعالیت آنزیم، بعد از ۱۰۰ دقیقه، باقی می‌ماند؛ در حالیکه آنزیم تثبیت شده، ٪۵۰ از فعالیت اولیه‌ی خود را حفظ می‌کند [3]. با پیشرفت‌های اخیر در فناوری نانو و نانومواد روش‌های منتوعی برای تثبیت آنزیم، ارائه شده است [3]. در دهه‌ی گذشته، توسعه‌ی سیستم‌های دارورسانی ذرات، تمرکز اصلی تحقیقات بارگذاری دارو بوده است. در میان این سیستم‌ها، ذرات بیوسرامیک، به دلیل زیست سازگاری و نزدیکی و فعالیت زیستی عالی، پایداری بالا، توجهات بیشتری را به خود جلب کرده‌اند [5]. به صورت طبیعی، نانو هیدروکس یآپاتیت حدود ۸۰ درصد از وزن استخوان‌ها را به خود اختصاص می‌دهد. ذرات نانو هیدروکسی‌آپاتیت، به علت شکل‌پذیری قابل کنترل، جذب بالا و زیست‌سازگاری بسیار عالی و مساحت سطح بالا، گزینه‌‌ی خوبی برای حامل‌های دارو رسانی می‌باشد. هیدروکسی‌آپاتیت با فرمول مولکولی (Ca)10(PO4)6(OH)2، عمده‌ی ترکیب استخوان و دندان را در انسان، شامل می‌شود [4]. هیدروکسی‌آپاتیت، معمولا، دارای زمان تجزیه بیولوژیکی طولانی هستند و می توانند برای مدت طولانی پس از تزریق، با رهایش پایدار دارو، حفظ شوند؛ بنابراین؛ آزادسازی دارو در کمترین میزان مؤثر، به مدت طولانی، قابل کنترل است و موجب جلوگیری از بروز مسائل مربوط به تزریق‌های مکرر و اثرات جانبی دریافت دوز بالا، می‌گردد. ساختار کریستالی هیدروکسی‌آپاتیت، شش‌ضلعی، و دارای جایگاه‌های اتصال مختلف، یعنی، سایت P دارای بار منفی و سایت Ca با بار مثبت، می‌باشد. این ویژگی‌ها، هیدروکسی‌آپاتیت را به یک جاذب خوب که می‌تواند به مواد مختلف از جمله، پروتئین‌ها، آنتی‌توکسین‌ها و فاکتورهای رشد، متصل شود، تبدیل می‌کند [5]. تخریب هیدروکسی‌آپاتیت از ذرات سیلیکا، کوانتوم‌دات‌ها، نانولوله‌های کربنی، و ذرات مغناطیسی، سمیت کمتری در پی‌دارد. برای تثبیت آنزیم‌های β-گلوکوزیداز [7]، پروتئاز [9] و فیتاز [11] با کاربردهای صنعتی و آنزیم دکستراناز که در تجزیه‌ی پلاک دندانی نقش دارد [8]؛ با هدف افزایش پایداری و کاهش استفاده از آنزیم، از نانوهیدروکسی‌آپاتیت استفاده شده است، که تثبیت کارآمد این آنزیم‌ها با یک پروتکل جذبی ساده، موجب حفظ فعالیت کاتالیزوری آنزیم‌های مذکور شده است [7, 8, 9, 11].

 در این مطالعه، با هدف دستیابی به بهبود فعالیت دارویی، آنزیم کندروئیتیناز بر نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت تثبیت گردید. به این منظور در سه زمان ۱، ۴ و ۱۲ ساعت در دمای ◦C۴ تثبیت صورت گرفت. آنزیم دارویی کندروئیتیناز ABCI جداسازی شده از باکتری پروتئوس ولگاریس، قادر به تجزیه‌ی زنجییره‌های گلوکز آمینوگلیکان موجود در پروتئوگلیکان‌ها بوده و در تسهیل بازسازی آکسون‌ها، نقش حیاتی داشته و در ترمیم بافت عصبی آسیب دیده بسیار کارآمد است [3]. از سوی دیگر، نانو هیدروکسی‌آپاتیت، ماده ای معدنی است، که دسترسی مطلوب آنزیم به سوبسترا را ممکن می‌سازد؛ علاوه براین، دارای خواص ویژه از جمله زیست سازگاری، عدم سمیت، نامحلول بودن، زیست تخریب‌پذیری و قابلیت جذب آن توسط بدن می‌باشد. وجود یون‌های (Ca2+) در ساختار آن‌ها، برهمکنش هیدروکسی‌آپاتیت با زنجییره‌های جانبی آنزیم را ممکن می‌سازد؛ به این صورت که با شلاته کردن گروه‌هاي کربوکسیلیک اسید موجود در اسیدآمینه‌هاي آنزیم‌ها، منجر به تشکیل پیوند کوئوردینانسي مي‌گردد. هیدروکسی‌آپاتیت دارای مساحت سطح بالایی می‌باشد، که برای بارگذاری مقدار زیادی از آنزیم سودمند است. این نانوحامل نیاز به هیچگونه اصلاح شیمیایی اضافه‌اي ندارد، از این رو؛ استفاده از آن، مقرون به صرفه و با کاهش بکارگیري تکنیک‌ها همراه است [7].

**مواد و روش‌ها**

مواد شیمیایی

مواد شیمیایی شامل کندروئیتین ۴-سولفات، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (KH2PO4)، 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.

بیان و تخلیص آنزیم

این مرحله شامل کشت شبانه باکتری مورد نظر، تلقیح محیط کشت لوریا برتانی مایع توسط کشت شبانه، القای بیان توسط ایزوپروپیل β-D-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید (با غلظت 7/0 میلی‌مولار) و انکوبه نمودن نمونه‌ها در دمای oC 27 به مدت 6 ساعت به منظور بیان کامل پروتئین کندروئیتیناز ABCI می‌باشد. سوسپانسیون باكتری‌های القا ‌شده به ‌مدت 10 دقیقه با سرعت × g۳۵۰۰ در دمای oC4 ‌سانتریفیوژ شد. رسوب ‌باكتری به دست ‌آمده ‌با افزودن 4 میلی‌لیتر بافر لیزكننده‌، به حالت سوسپانسیون درآمد. پس از آن سوسپانسیون باكتری تحت سونیكاسیون قرار گرفت. سلول‌های لیز شده، در دمای oC4 با × g ۱۵۵۰۰به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شدند. فعالیت و میزان بیان پروتئین در سوپ رویی به ترتیب از طریق سنجش فعالیت آنزیمی و SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های دارای فعالیت و بیان بالا در این مرحله برای خالص‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند. تخلیص پروتئین­های ‌نوتركیب به ‌روش ‌كروماتوگرافی ‌تمایلیو با استفاده از ستون نیكل سفارزطی یك مرحله انجام گرفت. سپس‌ نمونه حاصل از لیز سلولی که دوباره سانتریفیوژ شده ‌به ستون ‌منتقل و به طور كامل از ستون عبور داده شد و به دنبال آن ستون توسط بافر شستشو، شسته شد و در آخر برای جداسازی پروتئین متصل به ستون از بافر جدا كنندهاستفاده شد. در نهایت پروتئین تخلیص شده در حضور گلیسرول ٪۲ جمع‌آوری و آماده‌ی استفاده برای آزمایش‌های بعدی گردید [3,14]. برای حصول اطمینان از خلوص نمونه­ها از تكنیك الكتروفورز SDS-PAGE احیائی و برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد، استفاده شد[3,13,14,16].

فرآیند تثبیت

 به منظور تثبیت آنزیم کندروئیتیناز ABCI بر روی هیدروکسی‌آپاتیت، ۰.۲ میلی‌لیتر از آنزیم کندروئیتیناز ABCI، با غلظت ۰.۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به ۰.۱ میلی‌گرم از پودر نانوهیدروکسی‌آپاتیت افزوده شد. سپس مخلوط، با هدف توزیع کامل نانوذرات در محلول آنزیم، در التراسونیک حمام (شرکت JAMES، مدل SONIC600M توان ۲۰۰ وات)، سونیکیت گردید. پس از آن، مخلوط‌های حاوی آنزیم و پودر نانوهیدروکسی‌آپاتیت، بر روی استیرر، به مدت ۱، ۴ و۱۲ ساعت در دمای ⸰۴ سانتی‌گراد، داخل یخچال نگه‌داری شدند. پس از گذشت زمان مربوط به هر یک از نمونه‌ها، هر کدام به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ⸼g۲۰۰۰۰ سانترفیوژ شده و در نهایت رسوب باقی‌مانده (آنزیم تثبیت شده) در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار حل شد.

بررسی فعالیت حامل آنزیمی (هیدروکسی‌آپاتیت حاوی آنزیم کندروئیتیناز ABCI)

در اثر تجزیه گلیکوزآمینوگلیکان توسط آنزیم کندروئیتیناز ABCI، الیگو ساکاریدهای غیر اشباع تولید می‌شود. این ترکیبات به دلیل داشتن پیوند دوگانه بین C4 و C5 اسید اورونیک، طول موج 232 نانومتر را جذب می‌کنند. برای سنجش فعالیت آنزیمی از سوبسترای کندروئیتین 4- سولفات با وزن مولکولی حدود 50 کیلودالتون استفاده شد. فعالیت آنزیم cABCΙ بر اساس افزایش جذب در طول موج 232 نانومتر در دمای oC 25 اندازه‌گیری شد. به این منظور μl ۴0 از نمونه آنزیمی به μl ۲۵0 بافر فسفات 50 میلی‌مولار (8/6pH=) دارای C4S با غلظت‌های متفاوت اضافه گردید. سپس میزان افزایش جذب در طول موج ۲۳۲ نانومتر پس از یک دقیقه اندازه‌گیری شد. با در نظر گرفتن ضریب جذب مولی (ε) محصول تولید شده که M-1 cm-1 3800 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 [3,14].

با نگهداری آنزیم کندروئیتیناز ABCI تثبیت شده در ⸰۴ سانتی‌گراد، در فواصل زمانی مختلف، به روش ذکر شده در بالا، باقی‌مانده‌ی فعالیت آنزیم‌ها، در دمای C◦ ۲۵ مورد سنجش قرار گرفتند. این مرحله چندین بار تکرار شد [3].

**بحث بر روی نتایج**

بیان و خالص‌سازی آنزیم

**القاء با ایزوپروپیل** β-D**-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید (**7/0 میلی‌مولار) و با شیک rpm 160و در دمای o C 27 و به مدت 6 ساعت انجام شد. سپس سانتریفیوژ با دور ⸼g۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت و محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب باقی مانده بافر لیز اضافه شد. پس از لیز کردن سلول ها، مجددا سانتریفیوژ با دور ⸼g۱۳۰۰۰ انجام گرفت و مایع رویی که حاوی آنزیم کندروتیناز ABCI است جهت تخلیص پروتئین‌ استفاده شد [3,14]. بررسی ژل پلی آکریل آمید پس از الکتروفورز نمونه‌های تخلیص شده، تک باندهایی با وزن مولکولی حدود kDa 112 را نشان داد. شکل۱ نشان میدهد که آنزیم به صورت نسبتا خوبی تخلیص شده است.

KDa

(۲)

(۱)

112



**شکل۱:** بررسی SDS-PAGE آنزیم cABCI. ۱:استاندارد وزن مولکولی؛ 2: باند مربوط به تخلیص پروتئین. استاندارد وزن مولکولی بر حسب کیلو دالتون kDa مشخص شده است.

تثبیت آنزیم کندروئیتیناز ABCI بر روی هیدروکسی‌آپاتیت

پودرنانوهیدروکسی‌آپاتیت، به عنوان بستر نانویی برای تثبیت آنزیم، بکار رفت. با استفاده از روش برهم‌کنش مستقیم آنزیم کندروئیتیناز با نانوذره، فرآیند تثبیت صورت گرفت. برای هر نمونه‌ی حاوی ۰.۱ میلی‌گرم از هیدروکسی‌آپاتیت به همراه ۲۰۰ میکرولیتر آنزیم با غلظت ۰.۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به ترتیب تثبیت ۱، ۴ و ۱۲ ساعته انجام پذیرفت. به این صورت که، در ابتدا مخلوط آنزیم و پودر نانوهیدروکسی‌آپاتیت به منظور توزیع کامل نانو ذرات در محلول آنزیمی، سونیکیت گردید و سپس، نمونه‌های مربوط به تثبیت ۱، ۴ و ۱۲ ساعت در ⸰۴ سانتی‌گراد در یخچال، بر روی استیرر قرار گرفتند و بعد از گذشت زمان لازم به مدت ۲۰ دقیقه با دور ⸼ g ۲۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. نتایج حاکی از آن بود که با تثبیت ۱ و ۴ ساعته، آنزیم دارای فعالیت بیشتری بود، چرا که هیدروکسی‌آپاتیت دارای ساختاری است که با گذشت زمان، آنزیم را دربرمی‌گیرد و اجازه‌ی دسترسی راحت سوبسترا به آنزیم را نمی‌دهد و اینطور به نظر می‌رسد که به ازای افزایش زمان تثبیت، بیشتر روی آنزیم را می‌پوشاند. هم‌چنین به نظر میرسد مقدار قابل توجهی از آنزیم در یک ساعت اول به ذرات نانوهیدروکسی‌آپاتیت متصل مي‌شود [18]. تصاویر مربوط به نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت قبل و بعد از تثبیت، به ترتیب در شکل‌های ۲و ۳ آورده شده است. در تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانوذرات هیدروکسی آپاتیت بعد از تثبیت آنزیم (شکل۳)، یک لایه از آنزیم دیده می‌شود که تقریبا تمام سطح را می‌پوشاند و اینگونه به نظر می‌رسد که سطح با لایه‌هایی از آنزیم پوشیده شده است و بر اساس مطالعاتی که قبلا انجام شده است، تثبیت را تایید می‌کند [3].



**شکل۲:** تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی- نشر میدانی از نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت قبل از تثبیت آنزیم کندروئیتیناز ABCI



**شکل۳:** تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی- نشر میدانی از نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت بعد از تثبیت آنزیم کندروئیتیناز ABCI

بررسی فعالیت حامل آنزیمی (هیدروکسی‌آپاتیت حاوی آنزیم کندروئیتیناز ABCI)

 با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نور مرئی-فرابنفش، در طول موج ۲۳۲ نانومتر، فعالیت آنزیم تثبیت شده، اندازه‌گیری شد؛ به این ترتیب که، ۴۰میکرولیتر از آنزیم تثبیت شده، به ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات حاوی مقادیر مختلف سوبسترای کندروئیتین ۴-سولفات، اضافه شد. سپس میزان افزایش جذب در طول موج 232 نانومتر پس از یک دقیقه در دماي 25 درجه سانتي‌گراد اندازه‌گیری شد. با در نظر گرفتن ضریب جذب مولی (ε) محصول تولید شده که M-1 cm-1 3800 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[3,14]. با نگهداری آنزیم کندروئیتیناز ABCI تثبیت شده درC⸰ ۴ سانتی‌گراد، در فواصل زمانی مختلف، به روش ذکر شده در بالا، باقی‌مانده‌ی فعالیت آنزیم‌ها، مورد سنجش قرار گرفتند. این مرحله چندین بار تکرار شد [3]. نتایج در شکل ۴ آورده شده است. آنزیم کندروئیتیناز ABC تثبیت شده به مدت ۱ و ۴ ساعت، در مدت یک هفته، پایداری بیشتری نسبت به آنزیم تثبیت شده به مدت ۱۲ ساعت، دارا می‌باشند. با تثبیت‌های بیشتر از ۴ ساعت، به مرور فعالیت آنزیم، کمتر می‌شود؛ چراکه، مولکول‌های آنزیم که در انتهای حامل هیدروکسی‌آپاتیت قرار دارند، نمی‌توانند به راحتی به سطح مهاجرت کرده و به سوبسترا متصل شوند [15]. به نظر می‌رسد با اختصاص دادن زمان بیشتر به فرآیند تثبیت، آنزیم، بیشتر، توسط نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت، در برگرفته می‌شود؛ از این رو تثبیت ۱ و ۴ ساعته مؤثرتر است. همانطور که در شکل ۴ آورده شده است آنزیم تثبیت شده به مدت ۱۲ ساعت، پس از یک هفته، ٪ ۱۹ فعالیت اولیه‌ی خود را، و آنزیم تثبیت شده به مدت ۱ و ۴ ساعت به ترتیب ٪ ۳۹ و ٪ ۲۸ از فعالیت اولیه‌ی خود را حفظ کردند. از سوی دیگر، از دست دادن فعالیت آنزیم تثبیت شده می‌تواند به دلیل تغییرات ساختاری در آنزیم و ریزش آنزیم از سطح حامل نیز، باشد [15].



**شکل ۴:** بررسی پایداری نانو حامل آنزیمی (هیدروکسی‌آپاتیت حاوی آنزیم کندروئیتیناز (ABCI)) به دست آمده در سه زمان تثبیت ۱، ۴ و ۱۲ ساعت

**نتیجه‌گیری**

نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت برای تثبیت آنزیم کندروئیتیناز به کار رفت.پایداری این نانوسامانه حاوی آنزیم تثبیت شده بر نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت، با بررسی روزانه‌ی فعالیت آنزیم، سنجیده شد. یافته‌ها حاکی از آن بود که آنزیم، فعالیت خود را در تثبیت ۱و ۴ ساعت، بیشتر حفظ کرده ولی در تثبیت ۱۲ ساعته، به دلیل ساختار هیدروکسی‌آپاتیت که با گذر بیشتر زمان، بیشتر ساختار آنزیم را در بر می‌گیرد، فعالیت آنزیم کمتر می‌شود. و تا حدود ۱ ماه، نانوسامانه فعالیت خود را حفظ می‌کند. در نتیجه، این نانوسامانه‌ی حاوی آنزیم کندروئیتیناز ABCI و نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت می‌تواند برای 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.

**مراجع و منابع**

1. Bradbury, Elizabeth J & Carter, Lucy M.. “Manipulating the glial scar: Chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury”. Brain Research Bulletin 84 (2011): 306-316
2. E. Muir, F. De Winter., et al. “Recent advances in the therapeutic uses of chondroitinase ABC”. Experimental Neurology 321 (2019)
3. Daneshjou, Sara., et al. “Porous silicon nanoparticle as a stabilizing support for chondroitinase”. International Journal of Biological Macromolecules (2017): 852-858
4. Moslemi, Daryiush., et al. “Synthesis of Nano Hydroxyapatite: Application in Drug Delivery of Sulfasalazine”. Journal of Nanostructures 5(4) (2015) :361-366
5. Wen, Yi., et al. “Improvement of Drug-Loading Properties of Hydroxyapatite Particles Using Triethylamine as a Capping Agent: A Novel Approach” Crystals (2021)
6. Zuidema, Jonathan M., et al. “Nanoparticle Technologies in the Spinal Cord” Cells Tissues Organs (2015): 102–115
7. Coutinho, Thamara C., et al. “Nanoimmobilization of β-glucosidase onto hydroxyapatite” International Journal of Biological Macromolecules 119 (2018): 1042-1051
8. Ding, Yanshuai., et al. “Immobilization of Dextranase on Nano-Hydroxyapatite as a Recyclable Catalyst” Materials 14(1) (2021)
9. Zdarta, Jakub., et al. “Hydroxyapatite as a support in protease immobilization process” Physicochemical Problems of Mineral Processing 51(2) (2015): 633−646
10. Patra, Jayanta Kumar., et al. “Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects” Journal of Nanobiotechnology (2018)
11. Coutinho, Thamara C., et al. “Phytase Immobilization on Hydroxyapatite Nanoparticles Improves Its Properties for Use in Animal Feed” Appl Biochem Biotechnol 190(1) (2020) :270-292
12. Naderi , Mina Sadat., et al. “Improving the Stability of Chondroitinase ABC I via Interaction with Gold Nanorods” International Journal of Biological Macromolecules 107 (2018): 297-304
13. Nazari-Robati, Mahdieh., et al. “Enhancement of thermal stability of chondroitinase ABC I by site-directed mutagenesis: an insight from Ramachandran plot” Biochim. Biophys. Acta. 1834(2013) :479–486
14. Daneshjou, Sara., et al. “Catalytic parameters and thermal stability of chondroitinase ABCI on red porous silicon nanoparticles”, Journal of Biotechnology 324 (2020) 83-90
15. Danping, Qi., et al. “Immobilization of Pectinase onto Porous Hydroxyapatite/Calcium Alginate Composite Beads for Improved Performance of Recycle” ACS Omega 2020 5 (32), 20062-20069
16. M.Bradford, Marion. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding” Analytical Biochemistry 72 (1-2) 1976: 248-254
17. Yamagata T, Saito H, Habuchi O, et al. Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. J Biol Chem. )1968(243:1523–1535.
18. Cabuk. B., et al. “B-Galactosidase immobilization on chitosan-hydroxyapatite complex: effects of immobilization conditions” Journal of Nutritional Health & Food Engineering 2014;1 (1):13-23