

ثبیت آنزیم کندروئیتیناز بر روی نانوذره متخلخل سیلیکن: تعیین خصوصیات و پایداری

مهربد مهرافزا^۱، سارا دانشجو*^۱، صفورا جباری^۲ و خسرو خواجه^۳

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

۲- گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

تاریخ ثبت اولیه: ۱۴۰۰/۰۹/۱۶، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۴۰۱/۰۱/۱۸، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۴۰۱/۰۲/۲۳

چکیده

هدف از این مطالعه، پایداری آنزیم cABCI از طریق تثبیت با روش entrapment بر روی نانوذره سیلیکن متخلخل می باشد. نانوذره سیلیکن متخلخل به دلیل زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، خواص لومینسانس ذاتی و ساختار متخلخل برای حمل دارو، قابلیت های قابل توجهی در کاربردهای بیولوژیک از خود نشان می دهد. در نتیجه این نانوذره به عنوان حامل آنزیم cABCI با هدف افزایش پایداری این آنزیم بکار برده شده است. نانوذره سیلیکن متخلخل از طریق روش electrochemical etching بر روی ویفر سیلیکن در محلول HF/Etanol تهیه شد. مورفولوژی نانوذره سنتز شده از طریق SEM مورد مطالعه قرار گرفت و تثبیت آنزیم کندروئیتیناز ABC I بر روی سیلیکن متخلخل از طریق تصویربرداری میکروسکوپ SEM از سیلیکن متخلخل قبل و بعد تثبیت آنزیم مورد تایید قرار گرفت. نتایج بدست آمده، میزان K_m مشابه و کاهش در V_{max} برای آنزیم تثبیت شده در مقایسه با آنزیم آزاد را نشان داد. علاوه بر این، با بررسی خصوصیات لومینسانس نانوذرات سیلیکن، ماکزیم پیک برای سیلیکن سبز و قرمز به ترتیب در طول موج ۵۰۰ و ۷۵۰-۶۵۰ نانومتر مشاهده شد. همچنین، آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات سیلیکن متخلخل افزایش چند برابری پایداری در تمامی دماهای بررسی شده بعد از گذشت ۵۰ دقیقه را نشان می دهد. بنابراین سیلیکن متخلخل می تواند به عنوان یک بستر پایداری کننده برای حمل آنزیم cABCI، در کاربردهای بالینی آینده مفید واقع شود.

واژه های کلیدی: آنزیم کندروئیتیناز، سیلیکن متخلخل، پارامترهای سینتیکی، پایداری حرارتی.

۱- مقدمه

آن ها می توان به مرگ سلولی گسترده، خود ترمیمی ناقص و عدم باز تولید آکسون ها اشاره نمود [۴-۱]. علت اصلی عدم باز تولید آکسونی، تشکیل اسکار آستروگلیایی در محل ضایعه است. در واقع پس از ایجاد ضایعه در نخاع، پاسخ های

سطوح ضایعات نخاعی از یکسری فرآیندهای پاتوفیزیولوژیکی پیچیده تشکیل می شوند که از ویژگی های

* عهده دار مکاتبات: سارا دانشجو

نشانی: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه نانوبیوتکنولوژی

تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۷۸۴، ۰۲۱-۸۲۸۸۴۷۱۷، پست الکترونیکی: s.daneshjou@modares.ac.ir

شد و با مطالعه بر روی مدل‌های مختلف آسیب نخاعی ادامه یافت [۱۵،۱۶]. نتایج مطالعات مختلف نشان داد که درمان با آنزیم cABC نه تنها باعث رشد مجدد آکسون‌ها می‌شود بلکه سبب تشکیل انشعابات عصبی جدید هم از طریق آکسون‌های آسیب‌دیده و هم آکسون‌های سالم، بازیابی مسیرهای عصبی و بهبود عملکرد آن‌ها می‌گردد [۱۷،۱۸]. بنابراین استفاده از آنزیم cABC I، در درمان ضایعات نخاعی مورد توجه قرار گرفت. با توجه به ویژگی ذکر شده و گستره وسیعی از ویژگی‌پذیری سوسترایی، استفاده از این آنزیم در شرایط *in vivo* به منظور تجزیه اسکار گلیایی در اطراف ضایعه نخاعی مورد توجه می‌باشد ولی به دلیل حساسیت دمایی بالا، کاربرد آن محدود می‌گردد زیرا فعالیت این آنزیم به سرعت و به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد [۱۹،۲۰،۲۱،۲۲]. با توجه به این که پس از بروز ضایعه نخاعی افزایش میزان CSPGs آغاز شده و حداقل تا ۲ هفته ادامه می‌یابد از این رو لازم است که این آنزیم چندین بار به محل ضایعه تزریق شود تا همواره منبع تازه‌ای از آنزیم جهت تجزیه CSPGs تازه سنتز شده وجود داشته باشد [۲۰،۲۱،۲۲] و تزریق مکرر آنزیم روشی تهاجمی است که می‌تواند منجر به عفونت گردد [۲۱،۲۲]. هدف اصلی در درمان ضایعات نخاعی، افزایش میزان بازتولید آکسون‌ها در محل آسیب دیده می‌باشد.

همان‌طور که اشاره شد تشکیل اسکار گلیایی در محل ضایعه که بیشتر از پروتوگلیکان‌های کندروئیتین سولفات تشکیل شده است، مانع از بازتولید آکسون‌ها می‌گردد.

از این رو از بین بردن اثر ممانعتی CSPGs از طریق تجزیه آن‌ها توسط آنزیم باکتریایی کندروئیتیناز ABC I قابل توجه می‌باشد که با در نظر گرفتن حساسیت بالای این آنزیم نسبت به حرارت، افزایش پایداری حرارتی به منظور بهبود کارایی بالینی آنزیم مربوطه از طریق تثبیت آنزیم بسیار مورد توجه می‌باشد. پایداری حرارتی آنزیم cABC I به منظور طولانی کردن زمان نگه‌داری آنزیم در دماهای مختلف و افزایش مدت اثر آنزیم در محل ضایعه و در نتیجه کاهش

سلولی و مولکولی بسیاری آغاز می‌شود که در نهایت باعث تشکیل یک اسکار آستروگلیایی محکم در محل ضایعه می‌گردد. ماکروفاژها، میکروگلیاها، پیش‌سازهای الیگودندروسیت و آستروسیت‌ها به محل ضایعه مهاجرت نموده و مولکول‌های مهارکننده مانند پروتوگلیکان‌های کندروئیتین سولفات (CSPGs) و پروتئین‌های میلین مانند Myelin Associated Glycoprotein (MAG) و Myelin Glycoprotein (Oligodendrocyte) (OMG) را تولید می‌نمایند. محصول نهایی، اسکار گلیایی درهم تنیده محکمی است که بیشتر از CSPGs تشکیل شده و اطراف ضایعه را می‌پوشاند [۲،۳،۴،۵،۶].

بررسی‌ها نشان می‌دهند که یکی از راهکارها به منظور رشد مجدد آکسون‌ها و مهار آسیب بافتی پیش‌رونده به دنبال ضایعه نخاعی، از بین بردن اسکار گلیایی از طریق هضم آنزیمی CSPGs می‌باشد [۷،۸،۹]. آنزیم مورد استفاده برای تجزیه CSPGs در اسکار گلیایی، کندروئیتیناز ABC (cABC) می‌باشد. این آنزیم از باکتری *Proteus vulgaris* استخراج شده و دارای فعالیت لیازی (EC 4.2.2.20) می‌باشد. آنزیم کندروئیتیناز ABC — گلیکوزآمینوگلیکان‌های کندروئیتین ۴-سولفات، درماتان سولفات و کندروئیتین ۶-سولفات موجود در پروتوگلیکان‌ها که به ترتیب کندروئیتین سولفات نوع A (CS-A)، نوع B (CS-B) و نوع C (CS-C) نامیده می‌شوند، اثر می‌نماید و با حذف یک پروتون، باعث تولید دی‌ساکاریدهای غیراشباعی می‌شود که در طول موج ۲۳۲ nm جذب دارند. همچنین ژن آنزیم کلون و در *E. coli* بیان شده است [۹،۱۰،۱۱]. بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم cABC I از منبع باکتریایی نشان می‌دهد که این آنزیم در دمای ۳۷ °C دارای حداکثر فعالیت می‌باشد [۱۲-۱۴]. مطالعات *in vitro* نشان دادند که تجزیه رشته‌های CSPGs توسط آنزیم cABC به رشد نورون‌ها کمک می‌نماید [۱۴-۱۱]. سپس بررسی‌های *in vivo* در مورد تجزیه آنزیمی CSPGs در اسکار گلیایی، توسط Lemons و همکاران آغاز

تعداد تزریق‌ها، بسیار مورد توجه می‌باشد. راهکارهای مختلفی مانند تغییرات شیمیایی، مهندسی حلال با بکار بردن کمک حلال‌ها و مهندسی آنزیم برای بهبود آن‌ها ارائه شده است [۲۳]. یکی از روش‌های موثر روش تثبیت آنزیم است، که به منظور تغییر در عملکرد آنزیم‌ها قابل توجه می‌باشد [۲،۳]. با توجه به نقشی که برای این آنزیم در درمان بیماری‌های مرتبط با سیستم عصبی مرکزی متصور است، در این مطالعه تلاش بر این است که با تثبیت آنزیم بر روی نانوذره سیلیکن متخلخل، تا حدودی پایداری آنزیم افزایش یابد. امروزه فناوری نانو در بهبود روش‌های تثبیت آنزیم بسیار موثر بوده است. کاهش اندازه مواد حامل آنزیم، سبب بهبود بازده و کارایی آنزیم تثبیت شده می‌شود [۲۴]. استفاده از مواد نانوساختار برای تثبیت و پایداری آنزیم نه تنها باعث افزایش پایداری فعالیت آنزیم می‌شود بلکه سایر خواص ویژه آن، به عنوان یک سیستم نانوکاتالیست زیستی، را هم تقویت می‌کند. علاوه بر این اتصال بین آنزیم با بستر نانویی مورد استفاده برای تثبیت، جلوی باز شدن ساختار درهم پیچیده مولکول پروتئین را می‌گیرد و در نتیجه، پایداری افزایش می‌یابد. نانوذره سیلیکن متخلخل (PSi) با داشتن سطح مخصوص زیاد، تخلخل بالا، ساختمان متخلخلی منظم، می‌تواند در حسگرها، سامانه‌های دارورسانی و بسیاری از زمینه‌های دیگر مفید واقع شود [۲۴،۲۵].

در سال ۱۹۵۴، شروع عصر سیلیکن، اینگبورگ اوهرلر و همسرش در آزمایشگاه بل در آمریکا در تلاش برای توسعه روشی به منظور پرداخت و شکل‌دهی سطوح دو ماده نیمه رسانای سیلیکن و ژرمانیم، در فرآیند الکتروشیمیایی سیلیکن در محلول HF، متوجه شدند که تحت شرایط مناسب سیلیکن بطور یکنواخت حل نشده و در سطح آن یک لایه قهوه‌ای رنگ ایجاد می‌شود [۲۶]. این لایه قهوه‌ای رنگ که لایه‌ای از سیلیکن دارای تخلخل بود، سیلیکن متخلخل نام گرفت. بسیاری از کارهای اولیه کنام بطور گسترده بر روی برنامه‌های کاربردی سیلیکن متخلخل در دارورسانی و مهندسی بافت متمرکز بوده است. بسیاری از کارهای او نشان داد که

سیلیکن متخلخل زیست‌سازگار و زیست‌بازجذب پذیر است [۱۱،۱۲،۲۷،۲۸]. همچنین زیست‌فعالی در سیستم‌های سلولی زنده مورد بررسی قرار گرفته است و تا به حال هیچگونه اثر سمی از ساختار سیلیکن متخلخل و یا محصولات تخریب آن که به سلول‌ها می‌چسبند، مشاهده نشده است [۲۴،۲۹]. نشان داده شده است سیلیکن متخلخل بطور کامل به فرم زیست‌بازجذب پذیر سیلیسیک اسید Si(OH)_4 حل شده، که نیاز به هیچگونه عمل جراحی اضافی و یا روش‌های پزشکی برای حذف و یا بهبود دستگاه رسانش ندارد [۳۰]. اولین گزارش در سال ۲۰۰۳ از رسانش دارو توسط سیلیکن متخلخل در دهان و دندان بود که به علت توانایی این ماده در جلوگیری از تغییرات فیزیکی و شیمیایی در ویژگی‌های داروی بارگذاری شده، مورد استفاده قرار گرفته بود. اخیراً امکان استفاده از یک ماتریس سیلیکن متخلخل به عنوان یک حامل برای تحویل کنترل شده عامل ضد سرطان دوکسوروبیسین نشان داده شده است [۳۱]. لازم بذکر است که افزایش پایداری آنزیم می‌تواند موجب کاهش مقدار مصرفی آنزیم‌ها، افزایش طول عمر راکتورهای آنزیمی، افزایش شانس استفاده دوباره آنزیم، و نیز حصول سیگنال قوی‌تر در حسگر زیستی شود [۲،۳،۳۲]. تحقیقاتی بر روی تثبیت آنزیم کندروئیتیناز ABC I انجام گرفته است. از جمله پژوهش‌های انجام شده می‌توان به تثبیت این آنزیم روی نانوذرات مغناطیسی و تثبیت روی نانوذرات مغناطیسی پوشیده شده با دکستران اشاره نمود [۲،۳]. بر پایه آنچه یاد شد هدف از این مطالعه تثبیت آنزیم cABC I بر روی نانوذره سیلیکن متخلخل به منظور رفع معایب و محدودیت‌های فوق‌الذکر آنزیم cABC I آزاد جهت کاربردهای بالینی بوده است. در راستای این هدف، فعالیت و پایداری آنزیم cABC I آزاد و تثبیت شده بررسی شد.

۲- فعالیت‌های تجربی

۲-۱- میکروارگانسیم‌ها و پلاسمیدها

سویه باکتری مورد استفاده در این مطالعه *E. coli* BL21

فعالیت و بیان بالا در این مرحله برای خالص سازی مورد استفاده قرار گرفتند. تخلیص پروتئین های نوترکیب به روش کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از ستون نیکل سفارز طی یک مرحله انجام گرفت.

در این مطالعه آنزیم های نوترکیب دارای دنباله هیستیدینی می باشند که این دنباله تمایل زیادی به نیکل داشته و میانکش محکمی با آن برقرار می کند.

قبل از انجام تخلیص، ابتدا ستون کروماتوگرافی توسط بافر شستشو یا تعادلی شامل ۵۰ mM Potassium Phosphate، ۳۰۰ mM NaCl و ۲۰ mM Imidazole با pH ۶/۸ به تعادل رسید. سپس نمونه حاصل از لیز سلولی که دوباره سانتریفیوژ شده به ستون منتقل و بطور کامل از ستون عبور داده شد و به دنبال آن ستون توسط بافر شستشو، شسته شد و در آخر برای جداسازی متصل به ستون از بافر جدا کننده استفاده شد. بافر جدا کننده حاوی ۳۰۰ mM NaCl، ۲۵۰ mM Imidazole، ۵۰ mM Potassium Phosphate با pH ۶/۸ می باشد. رقابت ایمیدازول موجود در این بافر با هیستیدین برای اتصال به نیکل سبب خروج پروتئین از ستون می شود [۱۱،۲۵]. برای جلوگیری از تخریب گرمایی پروتئین مورد نظر و تاثیر پروتئین های موجود در محیط، تخلیص در یخ و با استفاده از بافرهای سرد شده انجام گرفت.

در نهایت پروتئین تخلیص شده در حضور گلیسرول ۲ درصد جمع آوری و آماده استفاده برای آزمایش های بعدی گردید. برای حصول اطمینان از خلوص نمونه ها از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE احیایی استفاده شد. ژل تغلیظ کننده (بالا) با غلظت ۵٪ و ژل جداکننده (پایین) با غلظت ۱۲/۵٪ مورد استفاده قرار گرفت. رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو R250 انجام شد.

۲-۴- بررسی فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم cABC I بر اساس افزایش جذب در طول موج ۲۳۲ nm در ۲۵ °C اندازه گیری شد. به این منظور ۱۰ μl از نمونه آنزیمی به ۲۹۰ μl بافر فسفات ۵۰ mM (pH=۶/۸) دارای C4S با غلظت ۱ mg/ml اضافه گردید. سپس میزان

می باشد که به عنوان میزبان بیان آنزیم cABC I بکار گرفته شد. همچنین از پلاسمید pET-28a به عنوان حامل بیانی استفاده گردید.

۲-۲- محیط های کشت باکتری

مواد بکار رفته جهت تهیه محیط کشت LB مایع (۱ Lit) به صورت زیر می باشد: پپتون ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۵ گرم و کلرید سدیم ۱۰ گرم. همچنین در صورت نیاز آنتی بیوتیک هم به محیط کشت ها اضافه شد که آنتی بیوتیک های مورد استفاده در این مطالعه، کانامایسین با غلظت ۵۰ μg/ml می باشد.

۲-۳- بیان و تخلیص آنزیم cABC I

این مرحله شامل کشت شبانه باکتری مورد نظر، تلقیح محیط کشت LB مایع توسط کشت شبانه (به ازای هر ۱۰۰ ml از محیط کشت LB مایع، ۱ ml از کشت شبانه افزوده شد)، رسیدن سلول ها به OD₆₀₀ = ۰/۶، القای بیان توسط IPTG (با غلظت ۰/۷ mM) و انکوبه نمودن نمونه ها در دمای ۲۷ °C به مدت ۶ ساعت به منظور بیان کامل پروتئین cABC I می باشد. سوسپانسیون باکتری های القا شده به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت 3500 × g در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شد.

رسوب باکتری بدست آمده با افزودن ۴ میلی لیتر بافر لیزکننده، به حالت سوسپانسیون در آمد. بافر لیزکننده دارای pH برابر ۶/۸ و حاوی ۵۰ mM Potassium Phosphate (شامل مقدار مشخصی از (KH₂PO₄))، ۳۰۰ mM NaCl و ۵ mM Imidazole است. پس از آن سوسپانسیون باکتری تحت سونیکاسیون قرار گرفت [۱۱،۲۵]. برنامه سونیکاسیون شامل ۲۰ مرحله ۴۵ ثانیه ای با فاصله زمانی ۶۰ ثانیه بین هر مرحله بود. به علاوه برای جلوگیری از تخریب گرمایی تمامی مراحل سونیکاسیون در حضور یخ انجام گرفت. سلول های لیز شده، در دمای ۴ °C با 15500 × g به مدت ۲۰ 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 [۱۲،۲۷]. نمونه های دارای

شده در سلول الکتروشیمیایی قرار می‌گیرد و اطراف آن بوسیله یک اورینگ آب‌بندی می‌شود. سپس سلول الکتروشیمیایی در مدار قرار می‌گیرد و الکتروپلاتینی نیز همزمان در مدار قرار می‌گیرد و مدار بسته می‌شود. در مرحله بعد محلول الکتروولیت داخل سلول ریخته می‌شود. حال جریان الکتریکی منبع تغذیه و زمان بر روی مقدار مورد نظر تنظیم می‌شود. نمونه‌هایی با شرایط ساخت متفاوت به منظور بهینه‌سازی تخلخل و رسیدن به منافذی با اندازه‌های متناسب با هدف تحقیق، بررسی شد. ویفر سیلیکونی در همه نمونه‌ها یکسان اما پارامترهای دیگر مانند میزان جریان و مدت زمان واکنش تغییر داده شد که نمونه‌های سیلیکن متخلخل ساخته شده در جدول ۱ آمده است. شماره گذاری نمونه‌ها بر اساس چگالی جریان الکتریکی-زمان خوردگی می‌باشد. سیلیکن‌های نهایی که برای ادامه کار انتخاب شد با علامت تیک مشخص شده است. نمونه‌های آماده شده با چگالی جریان 20 و 5 mA/cm^2 به ترتیب برای سنتز سیلیکن متخلخل با نور سبز و سیلیکن متخلخل با نور قرمز نتایج مطلوب را نشان دادند و در نتیجه برای ادامه کار مورد استفاده قرار گرفتند. در ادامه کار، بعد از اعمال جریان و زمان مورد نظر بر روی سطح سیلیکن، برای مدت زمان $40-30$ ثانیه جریان را تا حدود 250 mA بالا برده شد تا لایه متخلخل سیلیکن از سطح جدا شد. سپس، به مدت یک شبانه روز در حمام سونیکاتور سونیکیت شد. در نهایت ذرات با فیلتر 0.2 فیلتر شدند و بدین ترتیب نانوذرات سیلیکن متخلخل آماده شدند. نانوذرات سیلیکن متخلخل با آنزیم cABCI در 4°C به مدت 7 ساعت مخلوط شد و پس از آن سه بار با بافر فسفات شستشو داده شد و در $15000 \times \text{g}$ به مدت 60 دقیقه سانتریفیوژ شد و در نهایت رسوب باقیمانده در بافر فسفات حل شد.

افزایش جذب در طول موج 232 nm پس از یک دقیقه اندازه‌گیری شد [۱۱، ۱۲، ۲۷]. 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. بطور کلی برای تمام آزمایشات مربوط به سینتیک آنزیمی از سوبسترای کندروئیتین ۴-سولفات (C4S) با وزن مولکولی حدود 50 kDa ~ استفاده شد.

۲-۵- سنتز Si متخلخل و تثبیت آنزیم بر روی آن

ویفر سیلیکونی مورد استفاده در این تحقیق، نوع p به ضخامت 800 میکرون و مقاومت ویژه 0.5 است. بر پشت این ویفر، یک لایه آلومینیومی به روش تبخیر حرارتی نشانده شد تا رسانایی الکتریکی برای بستن مدار ایجاد شود. سپس ویفر سیلیکونی با دستگاه برش لیزری صنعتی به قطعات مربعی شکل $(11\text{mm} \times 11\text{mm})$ برش داده شد. قطعات برش داده شده ابتدا با آب و صابون شستشو داده شد. سپس این قطعات با آب مقطر شستشو داده شد و در مرحله نهایی به مدت 10 دقیقه داخل محلول اتانول و استون در دستگاه التراسونیک قرار گرفت. بعد از گذشت این مدت زمان، قطعات از داخل محلول خارج شده و با ششوار خشک شد.

برای ساخت سیلیکن متخلخل دو نوع محلول الکتروولیت $\text{HF}:\text{Ethanol}:\text{H}_2\text{O}_2$ و $\text{HF}:\text{Ethanol}:\text{H}_2\text{O}$ ، با نسبت‌های مختلف تست شد و در نهایت از محلول $\text{HF}:\text{Ethanol}:\text{H}_2\text{O}$ به نسبت $1:3:2$ (v/v) برای سنتز سیلیکن با نور سبز و به نسبت $1:5:3$ (v/v) برای سنتز سیلیکن با نور قرمز استفاده شد (اسید فلئوریک 49 درصد مرک، اتانول 99.5 درصد مرک و آب دیونیزه). در این مرحله سیلیکن در محل در نظر گرفته

جدول ۱: نمونه‌های مختلف سیلیکن متخلخل ساخته شده در شرایط متفاوت ساخت.

انتخاب نهایی	نوع سیلیکن (رنگ)	نسبت محلول‌ها HF:Ethanol:H ₂ O	مدت زمان (دقیقه)	چگالی جریان (mA/cm ²)	نام نمونه زمان-چگالی جریان
x	جهت سنتز سیلیکن سبز	۲:۳:۱ (v/v)	۲۰	۵	۲۰-۵
x	جهت سنتز سیلیکن سبز	۲:۳:۱ (v/v)	۲۰	۱۰	۲۰-۱۰
✓	جهت سنتز سیلیکن سبز	۲:۳:۱ (v/v)	۲۰	۲۰	۲۰-۲۰
x	جهت سنتز سیلیکن سبز	۲:۳:۱ (v/v)	۲۰	۳۰	۲۰-۳۰
x	جهت سنتز سیلیکن قرمز	۳:۵:۱ (v/v)	۵	۲	۵-۲
✓	جهت سنتز سیلیکن قرمز	۳:۵:۱ (v/v)	۵	۵	۵-۵
x	جهت سنتز سیلیکن قرمز	۳:۵:۱ (v/v)	۵	۱۰	۵-۱۰
x	جهت سنتز سیلیکن قرمز	۳:۵:۱ (v/v)	۵	۲۰	۵-۲۰

آنزیم در زمان صفر دمای انکوباسیون، فعالیت نسبی بدست آمد. سپس پایداری حرارتی آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده مقایسه گردید.

۲-۸- مطالعات میکروسکوپ الکترونی روبشی

در ابتدا برای شناخت ریخت سطح سیلیکن متخلخل ساخته شده، از سطح آن تصویر با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تهیه شد. در ادامه خصوصیات مورفولوژیک سیلیکن تنها و سیلیکن که آنزیم روی آن تثبیت شده است با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، PhilipsXL30 (Netherlands)، مشاهده شد. (EDX)، برای تجزیه عنصری استفاده شد.

۲-۹- مطالعات (DLS)

اندازه هیدرودینامیک نانوذرات PSi با استفاده از روش DLS، در ۵۰ میلی مولار بافر فسفات (با pH 6.8) در دمای اتاق اندازه گیری شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بیان و خالص سازی آنزیم کندروتیناز ABC I القاء با (۰/۷ IPTG mM) و با شیک ۱۶۰ rpm و در دمای ۲۷ °C و به مدت ۶ ساعت انجام شد. سپس سانتیفریوژ با دور

۲-۶- تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم آزاد و تثبیت شده

به منظور تعیین پارامترهای سینتیکی، فعالیت آنزیم آزاد cABC I و تثبیت شده آن در حضور غلظت‌های مختلف سوبسترای C4S و در بافر فسفات ۵۰ mM با pH ۶/۸ و دمای ۲۵ °C اندازه گیری شد. برای محاسبه پارامترهای سینتیکی V_m و K_m آنزیم، مقدار فعالیت‌های آنزیمی (V) علیه غلظت‌های مختلف کندروئیتین ۴- سولفات (C4S) رسم شد. سپس با رسم منحنی لینیویربرک با محاسبه عرض از مبدا و شیب خط حاصل که $y = ax + b$ می‌باشد، مقدار V_m و K_m آنزیم محاسبه شد. لازم بذکر است که تمام سنجش‌ها حداقل سه بار تکرار شد.

۲-۷- بررسی پایداری حرارتی آنزیم آزاد و تثبیت شده

پایداری حرارتی آنزیم آزاد cABC I و تثبیت شده آن در دماهای مختلف ۳۰ و ۴۰ و ۶۰ °C انجام شد. در این آزمایشات از بافر فسفات ۵۰ mM محتوی C4S (غلظت ۱ mg/ml) با pH ۶/۸ استفاده شد. به این منظور مقدار یکسانی از آنزیم مورد نظر (۱ μM) در هر دما انکوبه و نمونه‌ها در فواصل زمانی معین به یخ منتقل گردید. پس از ۳۰ دقیقه، فعالیت آنزیم‌ها اندازه گرفته شد و با توجه به فعالیت

شرایط سنتز ذکر شده برای تثبیت آنزیم chondroitinase انتخاب شدند.

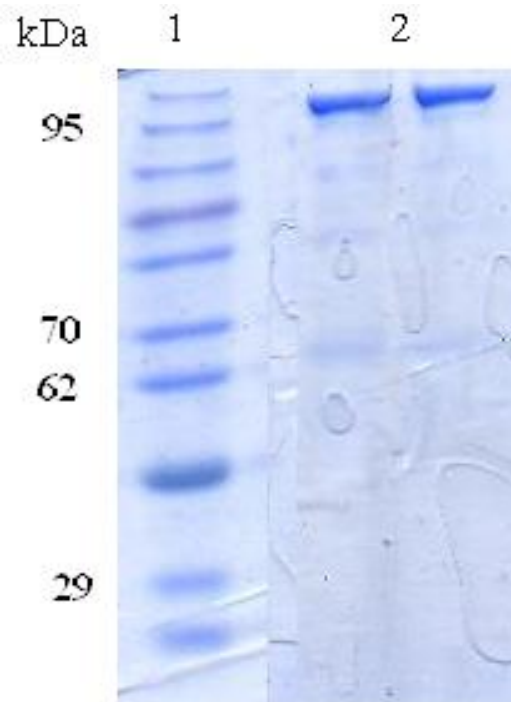
مورفولوژی بستر سیلیکن متخلخل با منافذ نانو با استفاده از میکروسکوپ SEM در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. همانطور که مشخص است، سطح نانوذره به صورت متخلخل و تقریباً یکنواخت می‌باشد. وجود حفرات نانو روی سطح، موجب افزایش سطح تماس و در نتیجه افزایش ظرفیت تثبیت آنزیم گردیده است. علاوه بر این اندازه حفرات در سیلیکن سبز و سیلیکن قرمز توسط دستگاه SEM مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳ a-b).

اندازه حفرات در نانوذره سیلیکن سبز حدود ۳۰-۶۰ nm و در سیلیکن قرمز ۸-۲۰ nm مشخص شد و در ادامه EDX حضور سیلیکن را با $K=1.739 \text{ keV}$ ، در نمونه سنتز شده تایید کرد. همچنین دستگاه DLS، متوسط اندازه ذرات سیلیکن سبز را ۱۸۰ nm و سیلیکن قرمز را ۲۱۰ nm نشان داد. در ادامه، برای تعیین خصوصیات لومینسانس نانوذرات، طیف فلورسانس، با برانگیختگی نانوذره سیلیکن در طول موج ۳۷۵ نانومتر و مشاهده طیف نشری بین ۴۷۰-۸۰۰ نانومتر مورد مطالعه قرار گرفت. همانطور که در شکل ۲ مشخص است در سیلیکن سبز ماکزیمم پیک در طول موج ۵۰۰ nm مشاهده شد که در محدوده طیفی سبز است و در سیلیکن قرمز ماکزیمم پیک در طول موج ۶۵۰-۷۵۰ nm مشاهده شد که در محدوده طیفی قرمز است، که نشان دهنده red shift است، که این مشاهدات توسط دستگاه میکروسکوپ فلورسانس نیز تایید شد (شکل ۲).

طیف فلورسانس به وضوح تغییر رنگ سیلیکن را در اثر تغییر جریان‌های مختلف نشان می‌دهد (شکل ۲). اهمیت سنتز نانوذره سیلیکن با نور قرمز از آن جهت است که این نوع نانوذره سیلیکن به دلیل داشتن نور فلورسانس قرمز امکان شناسایی و ردیابی در بدن را دارد که این ویژگی بسیار مهمی در کار با نانوحامل‌ها و ارتقا کاربرد بالینی این آنزیم است.

علاوه بر این نانوذره سیلیکن متخلخل به دلیل خاصیت خود تخریب پذیری به مرور زمان تخریب می‌شود و با تخریب آن

۸۰۰۰ rpm صورت گرفت و محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب باقیمانده بافر لیز اضافه شد. پس از لیز کردن سلول‌ها، مجدداً سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ rpm انجام گرفت و مایع رویی که محتوی آنزیم کندرویتیناز I ABC است جهت تخلیص پروتئین استفاده شد. بررسی ژل پلی آکریل آمید پس از الکتروفورز نمونه‌های تخلیص شده، تک باندهایی با وزن مولکولی حدود ۱۱۲ kDa را نشان داد (شکل ۱).

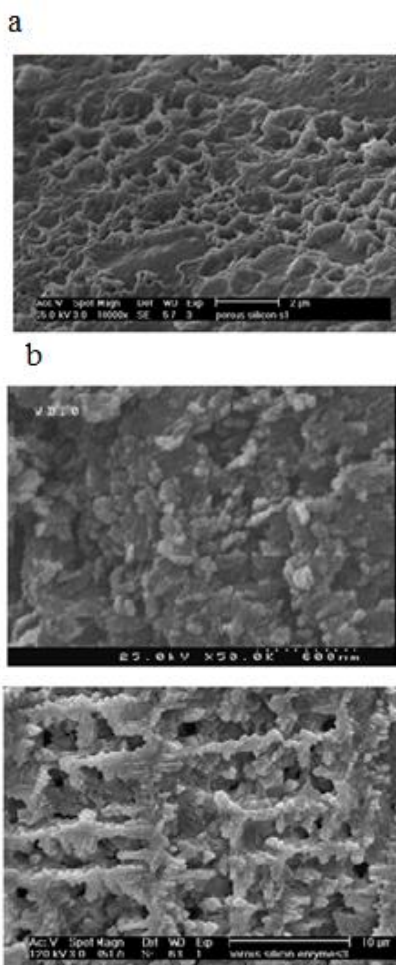


شکل ۱: بررسی SDS-PAGE آنزیم ABC. (۱) استاندارد وزن مولکولی و (۲) باند مربوط به تخلیص پروتئین. استاندارد وزن مولکولی بر حسب کیلو دالتون kDa مشخص شده است.

۲-۳- سنتز نانوذره سیلیکن متخلخل

از بین تمامی نمونه‌های سنتز شده سیلیکن، در نمونه‌های سنتز شده با شرایط 20 mA/cm^2 زمان ۲۰ دقیقه (جهت سنتز سیلیکن با نور سبز) در محلول الکترولیت HF:Ethanol:H₂O با نسبت ۲:۳:۱ و 5 mA/cm^2 زمان ۵ دقیقه (جهت سنتز سیلیکن با نور قرمز) در محلول الکترولیت HF:Ethanol:H₂O با نسبت ۴:۵:۱، فعالیت آنزیم حفظ شده، بدون هیچ گونه leaching، در نتیجه نانوذرات سیلیکن با

بعد از تثبیت (شکل 3c)، به نظر می‌رسد یک لایه از آنزیم روی سطح سیلیکن را پوشانده است.

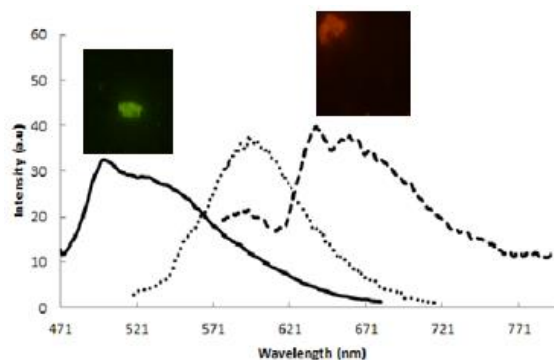


شکل 3: تصاویر SEM از نانوذره سیلیکن متخلخل. (a) تحت چگالی جریان 20 mA/cm^2 زمان 20 دقیقه (قبل تثبیت). (b) تحت چگالی جریان 5 mA/cm^2 زمان 5 دقیقه (قبل تثبیت) و (c) سیلیکن متخلخل بعد تثبیت آنزیم کندروئتیناز.

3-4- تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم آزاد و تثبیت شده

نتایج نشان می‌دهد که Specific activity در دو نمونه آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذره سیلیکن قرمز و سبز نسبت به آنزیم آزاد کاهش یافته است. همچنین پارامتر K_m که نشان دهنده تمایل آنزیم به سوبسترا است در نمونه آنزیم تثبیت شده بر روی سیلیکن قرمز نسبت به آنزیم آزاد به مقدار کمی افزایش یافته و در نمونه آنزیم تثبیت شده بر روی سیلیکن سبز نسبت به آنزیم آزاد کاهش یافته است (شکل 3a,b,c). (4)

به مرور دارو از آن رها می‌شود [11,27] که این ویژگی در بهبود کاربرد بالینی این آنزیم دارویی و حل مشکل از دست دادن فعالیت سریع این آنزیم بعد تزریق در محل ضایعه، بسیار حایز اهمیت است.



شکل 2: طیف انتشار نانوذرات سیلیکن متخلخل در بافر فسفات pH 7/8 به همراه تصویر میکروسکوپ فلورسانس، نمایش تغییر پیک فلورسانس با تغییر زمان و جریان ایچینگ. (—) نانوذرات سیلیکن متخلخل با چگالی جریان 20 mA/cm^2 و زمان 20 دقیقه، (---) سیلیکن متخلخل با چگالی جریان 2 mA/cm^2 و زمان 5 دقیقه، (....) نانوذرات سیلیکن متخلخل با چگالی جریان 5 mA/cm^2 و زمان 5 دقیقه.

3-3- تثبیت آنزیم کندروئتیناز I ABC بر روی سیلیکن متخلخل

به منظور بدست آوردن مقدار مناسب از آنزیم جهت لود شدن بر روی سیلیکن متخلخل، فعالیت غلظت‌های مختلف آنزیم لود شده بر روی سیلیکن متخلخل مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا، میزان فعالیت با افزایش غلظت آنزیم افزایش یافته و در غلظت 0.2 mg/ml ، بیشترین میزان فعالیت برای آنزیم تثبیت شده مشاهده شد، که در این غلظت حدود 35 میکروگرم آنزیم در هر میلی‌گرم PSi لود شده است. برای غلظت‌های بالاتر از 0.2 mg/ml تغییرات قابل توجهی در میزان فعالیت مشاهده نشد.

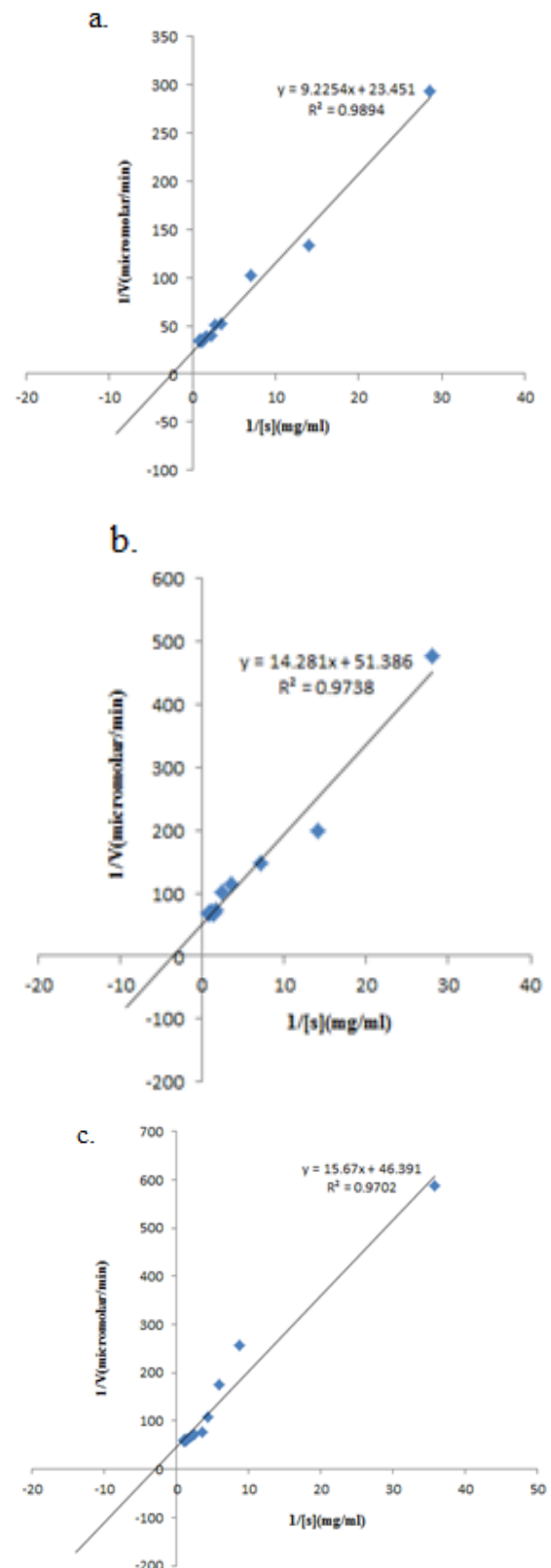
در ادامه، تثبیت آنزیم کندروئتیناز I ABC بر روی نانوذره سیلیکن متخلخل از طریق تصویربرداری میکروسکوپ SEM از سیلیکن متخلخل قبل و بعد از تثبیت آنزیم مورد تایید قرار گرفت (شکل 3a,b,c). همانطور که در شکل مشخص است،

۳-۵- بررسی پایداری حرارتی آنزیم آزاد و تثبیت شده

پیش از این، گزارش شد که کندروئیتیناز تخلیص شده، بعد از ستون Ni-NTA، ۸۰٪ فعالیت خود را در ۳۰۰ میلی‌متر ایمیدازول در دمای ۴ درجه تا ۲۱ روز و در دمای ۲۰- تا ۳ روز می‌تواند حفظ کند [۳۳]. در حالی که، در غیاب ایمیدازول پس از دیالیز، هیچ فعالیتی مشاهده نمی‌شود. از این رو، به منظور مطالعه پایداری حرارتی، پس از مرحله تخلیص، غلظت ایمیدازول با استفاده از centricon به ۱۰-۱۵ میلی‌مولار کاهش یافت. پس از آن، پایداری حرارتی آنزیم آزاد (در ۱۰-۱۵ میلی‌متر ایمیدازول) و آنزیم تثبیت شده (بدون ایمیدازول) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. اندازه‌گیری سرعت غیرفعال‌سازی با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پس از تیمار دمایی بدست می‌آید.

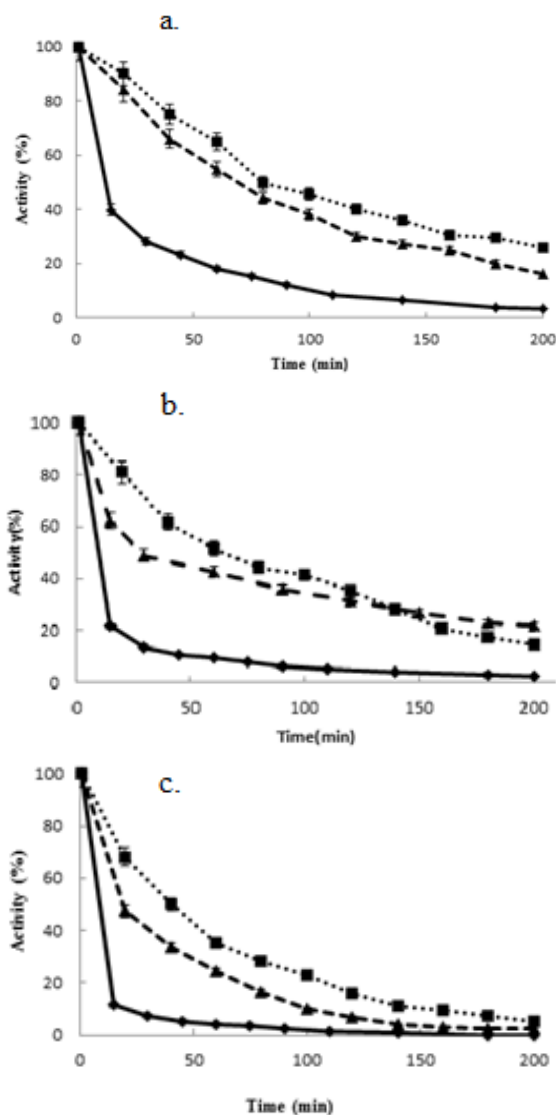
به این منظور میزان غیرفعال شدن در دماهای ۳۰، ۴۰ و ۶۰ °C بررسی شد. نمونه‌ها در زمان‌های مختلف پس از انکوباسیون از بن‌ماری خارج شده و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. فعالیت باقیمانده هر یک از نمونه‌ها اندازه‌گیری و با فعالیت آنزیم آزاد مقایسه و بصورت درصد فعالیت نسبی محاسبه شد (شکل ۵ a,b,c). ترتیب پایداری در هر سه دما بصورت: آنزیم آزاد > آنزیم تثبیت شده بر روی سیلیکن متخلخل قرمز > آنزیم تثبیت شده بر روی سیلیکن متخلخل سبز بود.

با مقایسه نمودارهای موجود در شکل ۵ مشخص می‌شود که در دمای ۳۰ °C پس از ۵۰ دقیقه آنزیم آزاد در بافر فسفات حدود ۲۰٪ از فعالیت خود را حفظ کرده ولی آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذره سیلیکن سبز و قرمز به ترتیب ۶۰ و ۵۰٪ از فعالیت خود را حفظ کرده‌اند (شکل ۳a). در دمای ۴۰ °C پس از ۴۰ دقیقه آنزیم آزاد ۱۰٪ از فعالیت خود را حفظ کرده این در حالی است که آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذره سیلیکن سبز و قرمز در این زمان حدود ۴۰٪ از فعالیت خود را حفظ کرده‌اند (شکل ۳b) و در دمای ۶۰ °C پس از ۵۰ دقیقه آنزیم آزاد ۵٪ از فعالیت خود را حفظ کرد.



شکل ۴: منحنی لینووربرک: (a) آنزیم آزاد، (b) آنزیم تثبیت شده بر روی سیلیکن متخلخل سبز و (c) آنزیم تثبیت شده بر روی سیلیکن متخلخل قرمز.

حرارتی آنزیم کندروتیناز ABC I نوترکیب صورت گرفت مشخص گردید که این آنزیم در ۳۰۰ میلی مولار ایمیدازول، در دمای ۳۷°C در حضور گلیسرول، سوریتول و ترهالوز پایدارتر می گردد [۳۴،۳۵]. اما در تحقیق پیشرو با حذف ایمیدازول به عنوان یک عامل پایدار کننده با استفاده از یک حامل نانویی موفق به پایدارسازی آنزیم در سه دمای مختلف شدیم. همچنین در تلاش دیگری نظری و همکارانش با بکارگیری روش های مهندسی پروتئین اقدام به پایدارتر کردن آنزیم کندروتیناز ABC I نمودند که در تمامی این شرایط ایمیدازول به عنوان عامل پایدار کننده وجود داشته است. [۳۳]. در سال های اخیر تلاش های بسیاری جهت افزایش پایداری حرارتی این آنزیم دارویی شده است که اکثر آن ها بر جهش های هدفمند متمرکز بوده است. علاوه بر نقش موثری که هر اسید آمینه در پایداری پروتئین ها دارد، در دهه های اخیر نقش، immobilization پروتئین ها بر روی بسترهای نانویی، بر پایداری آن ها توجه زیادی را بر خود معطوف کرده است. مطالعات پایداری این آنزیم در حضور محلول های شیمیایی نیز مورد بررسی قرار گرفته است که نتایج حاصله نشان داد، ترکیبات شیمیایی تا حدودی از آنزیم در مقابل غیرفعال شدن محافظت می کنند. اما از آنجا که استفاده از محلول های شیمیایی کاربردهای بالینی این آنزیم را محدود می کند ما در این راستا تلاش کردیم تا پایداری حرارتی آنزیم را با استفاده از روش immobilization پروتئین بر روی حامل نانویی افزایش دهیم. به همین منظور وضعیت پایداری حرارتی آنزیم آزاد و تثبیت شده بر روی دو نوع نانوذره سیلیکن در دمای ۳۰، ۴۰ و ۶۰°C مورد ارزیابی قرار گرفت. مجددا تاکید می شود که تمام مطالعات پیشین بر روی پایداری و فعالیت این آنزیم در حضور ۳۰۰ میلی مولار ایمیدازول صورت گرفته است که ایمیدازول در این آنزیم به عنوان یک عامل پایدار کننده است و در صورت حذف ایمیدازول آنزیم بطور کامل غیر فعال می شود و گزارش شده است که در ۳۰۰ میلی مولار ایمیدازول، این آنزیم به مدت ۲۱ روز در ۴°C و ۳ روز در ۲۰°C فعالیت



شکل ۵: پایداری دمایی. (a) دمای ۳۰ درجه سانتی گراد.

(b) دمای ۴۰ درجه سانتی گراد. (c) دمای ۶۰ درجه سانتی گراد.

(—) آنزیم آزاد (---) آنزیم تثبیت شده بر روی سیلیکن

قرمز (.....) آنزیم تثبیت شده بر روی سیلیکن سبز.

در حالیکه آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذره سیلیکن سبز و قرمز در این زمان به تربیت حدود ۴۰ و ۳۰٪ از فعالیت خود را حفظ کرده اند (شکل ۳c) (زمان ۵۰ دقیقه اینجا به عنوان مثال، از بین سایر زمان ها، ذکر شده است) قابل ذکر است، میزان فعالیت آنزیم تثبیت شده بر روی سیلیکن متخلخل به مدت یک هفته تا ده روز ثابت می ماند.

همانطور که به صورت خلاصه در بالا اشاره شد در مطالعات قبلی که توسط نظری و همکاران در خصوص پایداری

دارد [۳۳،۳۵]. در نتیجه برای اطمینان از اینکه تثبیت بر روی نانوذره سیلیکن عامل افزایش پایداری است و عامل دیگری در پایداری دخالت ندارد، مقدار ایمیدازول به کمترین مقداری که امکان داشت کاهش داده شد (چون در صورت حذف کامل ایمیدازول آنزیم بطور کامل فعالیتش را از دست می‌داد و امکان تثبیت آنزیم غیرفعال وجود نداشت) و مقایسه پایداری آنزیم آزاد و آنزیم تثبیت شده در سه دمای ذکر شده، حاکی از افزایش پایداری در آنزیم تثبیت شده بر روی دو نوع نانوذره سیلیکن (سبز و قرمز) نسبت به آنزیم آزاد است. بطور کلی، می‌توان گفت سرعت غیرفعال شدن آنزیم کندروئیتیناز تثبیت شده بر روی نانوذره سیلیکن متخلخل قرمز سریعتر از آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذره سیلیکن متخلخل سبز و کندتر از آنزیم آزاد است. این نتایج نشان می‌دهد که افزایش قابل توجه پایداری حرارتی cABC، نتیجه تثبیت این آنزیم بر روی هر دو نوع نانوذره سیلیکن متخلخل است. در مطالعات گذشته نیز، افزایش پایداری آنزیم اوره آز، chloroperoxidase و FDH به ترتیب با تثبیت بر روی نانوذره سیلیکن متخلخل، magnetic bead و مواد مزوپور زیرکونیا (MPZ) گزارش شده است [۳۸،۳۹].

۴- نتیجه گیری

با توجه به فعالیت حیاتی سیستم عصبی مرکزی، در سال‌های اخیر توجه زیادی به آسیب‌های نخاعی و درمان موثر آن‌ها شده است. در طول دهه گذشته درمان این عارضه بسیار محدود بوده است. امروزه پیشرفت‌هایی صورت گرفته است که امید به بازیابی و برگشت عملکرد در سیستم عصبی مرکزی را بیشتر کرده است. البته تاکنون هیچ درمانی وجود ندارد که منجر به بهبود کامل آسیب نخاعی شود. چندین مطالعه اخیر نشان داده است که آنزیم باکتریایی کندروئیتیناز ABC بهبود عملکرد را در سیستم عصبی مرکزی آسیب دیده فراهم می‌آورد. شواهدی نیز مبنی بر اثر مثبت این آنزیم بر روی ترمیم آسیب نخاعی وجود دارد که عبارت از بازسازی اکسون‌های آسیب دیده، شکل‌پذیری مسیرهای آسیب دیده

و محافظت نورونی از نورون‌های آسیب دیده می‌باشند. قابل ذکر است که، استفاده از آنزیم cABC I در درمان ضایعات نخاعی دارای چالش‌های متعددی می‌باشد. که از آن جمله می‌توان به ناپایداری حرارتی آن اشاره کرد، که علی‌رغم کاربرد کلینیکی آنزیم کندروئیتیناز ABC، استفاده از این آنزیم را در شرایط *in vivo* محدود می‌کند که در این مطالعه این چالش مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعات قبلی نشان داد که استخراج و تخلیص آنزیم از باکتری *Proteus vulgaris* به عنوان منبع مهم آنزیم cABC I صورت می‌گیرد [۳۴]. ژن آنزیم cABC I از قبل کلون شد و در باکتری *E.coli* بیان گردید [۳۵]. توالی ژن مورد استفاده، مطابق با توالی گزارش شده توسط Ryan و همکاران بود که با توالی اسیدهای آمینه گزارش شده توسط Huang و همکاران تطابق داشت [۳۶]. آنزیم cABC I بیان شده دارای دنباله هیستیدینی در انتهای آمینو است که از طریق تشکیل میانکنش با یون‌های نیکل در ستون کروماتوگرافی، امکان تخلیص تک مرحله‌ای، سریع و فراوان آن را فراهم می‌نماید [۸،۳۳]. از این روش قبلاً به منظور تخلیص کندروئیتینازهای AC، B، ABC I و ABC II استفاده شده است [۸،۹]. مطالعات قبلی در مورد cABC در باکتری *B. thetaiotaomicron* و cABC نوع I و II در باکتری *P. vulgaris* نشان داد که این آنزیم‌ها در دمای ۳۷ °C دارای حداکثر فعالیت آنزیمی می‌باشند [۳۷-۳۹]. مطالعات Tester و همکاران نشان داد که پایداری آنزیم cABC I بسیار کم بوده، از این رو افزایش پایداری آنزیم به لحاظ بالینی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۱۹]. هدف هر سامانه دارورسانی نانویی فراهم کردن مقدار داروی مورد نیاز به محل مناسب در بدن، یا دستیابی سریع به آن و نیز حفظ دوز نگهدارنده‌ی دارو می‌باشد. با پیشرفت علم پزشکی به نظر می‌رسد سامانه‌های سنتی دارورسانی نیازمند اصلاح و تغییر در جهت بهبود کیفیت دارورسانی و کاهش سمیت داروها می‌باشند [۴۰]. یک سامانه نانویی ایده‌آل جهت دارورسانی بایستی بی‌اثر، زیست‌تخریب‌پذیر، دارای سازگاری زیستی بالا بوده و برای مصرف بیمار مناسب باشد

آنزیم با تثبیت آنزیم بر روی نانوذره سیلیکن متخلخل پایداری تقریبی آنزیم در برخی از دماها مشاهده شده است [۱۱،۱۲]. بنابراین بر آن شدیم که پایداری حرارتی این آنزیم ناپایدار دارویی را در سه دمای ۳۰، ۴۰ و ۶۰°C با تثبیت بر روی نانوذره سیلیکن متخلخل نیز مورد مطالعه و بررسی قرار دهیم، زیرا این آنزیم یک آنزیم دارویی است و پایداری آن در دماهای مختلف می‌تواند کاربرد بالینی آن را گسترده‌تر کند. علاوه بر این به دنبال پایداری‌سازی این آنزیم در یک طیف دمایی گسترده، کار با این آنزیم به مراتب راحت‌تر و مقرون به صرفه خواهد شد. در نهایت تثبیت آنزیم بر روی نانوذره سیلیکن متخلخل از طریق entrapment انجام شد و تصویربرداری SEM تثبیت را اثبات کرد. در ادامه فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده بر روی سیلیکن قرمز و سبز و مقایسه آن‌ها باهم با استفاده از روش‌های سینتیکی انجام شد. همچنین پارامترهای سینتیکی V_{max} ، k_m و specific activity مورد بررسی قرار گرفت. k_m اغلب برای نشان دادن چگونگی میانکنش سوبسترا با آنزیم استفاده می‌شود. افزایش نسبی مقدار k_m در آنزیم تثبیت شده بر روی سیلیکن قرمز نسبت به آنزیم تثبیت شده بر روی سیلیکن سبز و فرم آزاد آن نشان از کاهش تمایل آنزیم به سوبسترا در این فرم دارد. بررسی نتایج پایداری حرارتی این آنزیم دارویی در سه دمای ۳۰، ۴۰ و ۶۰°C با تثبیت بر روی نانوذره سیلیکن متخلخل نشان داد که آنزیم دارویی cABC I با تثبیت بر روی هر دو نوع نانوذره سیلیکن متخلخل در سه دمای ذکر شده به صورت چشمگیری پایدار می‌شود که در کاربرد بالینی این آنزیم بسیار حائز اهمیت خواهد بود.

مراجع

- [1] K. Fouad, L. Schnell, M.B. Bunge, M.E. Schwab, T. Liebscher, *Journal of Neuroscience*, **25**, 2005, 1169.
- [2] H. Askaripour, M. Vossoughi, K. Khajeh, *Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, **47**, 2019, 2721.
- [3] H. Askaripour, M. Vossoughi, K. Khajeh, I. Alemzadeh, *Journal of Biotechnology*, **309**, 2020, 131.
- [4] M.H. Hettiaratchi, M.J. O'Meara, T.R. O'Meara, A.J. Pickering, N. Letko-Khait, M.S. Shoichet, *Science Advances*, **6**, 2020, 6378.

[۴۱]. نانوحامل‌های متخلخل به دلیل دارا بودن سطح مخصوص بالا در اولویت قرار گرفتند، زیرا میزان دارویی بارگیری شده در این نانوحامل‌ها برای کنترل رهش و هدف درمانی مناسب ارزیابی شده است. تلاش‌های تحقیقاتی قابل توجهی در سال‌های اخیر در زمینه پیشرفت سامانه‌هایی نانویی متخلخل در دارورسانی انجام شده است زیرا که چندین ویژگی قابل توجه مثل داشتن ساختار پایدار تخلخل‌ها، سطح مخصوص بالا، اندازه قابل تنظیم منافذ، حداقل سمیت، سازگاری زیستی و زیست‌تخریب‌پذیری آن‌ها را نسبت به سایر حامل‌های دارویی ممتاز کرده است [۴۲،۴۳]. نانوحامل سیلیکن متخلخل از جمله نانوذرات متخلخلی است که تمام ویژگی‌های ذکر شده را داراست و به دلیل داشتن نور فلورسانس در بدن قابل شناسایی است. که از این نانوذره مفید در این پروژه برای تثبیت آنزیم cABC I استفاده شد. در تحقیق پیشرو، بعد از سنتز نانوذره سیلیکن متخلخل مناسب جهت تثبیت آنزیم کندرویتیناز تصویر SEM از دو نمونه سنتز شده گرفته شد و اندازه حفرات نانوذرات سیلیکن متخلخل مشخص شد. در سنتز نانوذرات سیلیکن، با کاهش جریان 20 mA/cm^2 و زمان ۲۰ دقیقه به جریان 5 mA/cm^2 و زمان ۵ دقیقه، اندازه حفرات از $60-30 \text{ nm}$ در سیلیکن متخلخل سبز به $20-8 \text{ nm}$ در سیلیکن متخلخل قرمز کاهش یافت که این مشاهدات با پژوهش‌های دیگران در این زمینه ساخت سیلیکن متخلخل با همین پایه و شرایط مشابه ساخت مطابقت دارد [۴۴]. مطالعات قبلی تست سمیت سلولی نشان داده است که، آنزیم کندرویتیناز به تنهایی برای سلول سمیتی ندارد و در مورد سیلیکن تنها، تعداد سلول‌های زنده با گذشت زمان کاهش یافت که می‌تواند به این دلیل باشد که، از تخریب سیلیکن به مرور زمان silicic acid ایجاد می‌شود که باعث کاهش pH محیط و کاهش سلول‌های زنده در گذر زمان می‌شود [۳۹]. در واقع این عنصر متداول در انسان است که به راحتی از طریق ادرار از بدن خارج می‌شود [۴۵]. تثبیت آنزیم بر روی بسترهای نانویی یکی از راهکارهای افزایش پایداری آنزیم‌ها می‌باشد و در مطالعات قبلی صورت گرفته روی این

- [25] D.S. Kumar, D. Banji, B. Madhavi, V. Bodanapu, S. Dondapati, A. Sri, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **1**, 2009, 8.
- [26] J.A. Uhler, *Bell System Technical Journal*, **35**, 1956, 333.
- [27] L.T. Canham, *Advanced Materials*, **7**, 1995, 1033.
- [28] A.B. Foraker, R.J. Walczak, M.H. Cohen, T.A. Boiarski, C.F. Grove, P.W. Swaan, *Pharmaceutical Research*, **20**, 2003, 110.
- [29] K.E. Petersen, *Proceedings of the IEEE*, **70**, 1982, 420.
- [30] J. Drott, K. Lindström, L. Rosengren, T. Laurell, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **7**, 1997, 14.
- [31] C. Charnay, S. Begu, C. Tourné-Péteilh, L. Nicole, D.A. Lerner, J.M. Devoisselle, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **57**, 2004, 533.
- [32] J. Ge, D. Lu, Z. Liu, *Biochemical Engineering Journal*, **44**, 2009, 53.
- [33] M. Nazari-Robati, K. Khajeh, M. Aminian, N. Mollania, A. Golestani, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1834**, 2013, 479.
- [34] F.E. Harrison, J.O. van Hoof, C.H. Vanroelen, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **34**, 1986, 1231.
- [35] M. Nazari-Robati, K. Khajeh, M. Aminian, M. Fathiroudsari, A. Golestani, *International Journal of Biological Macromolecules*, **50**, 2012, 487.
- [36] W. Huang, V. Lunin, Y. Li, S. Suzuki, N. Sugiura, H. Miyazono, M. Cygler, *Journal of Molecular Biology*, **328**, 2003, 623.
- [37] D. Shaya, B.S. Hahn, T.M. Bjerkan, W.S. Kim, N.Y. Park, J.S. Sim, Y.S. Kim, M. Cygler, *Glycobiology*, **18**, 2008, 270.
- [38] S. Libertino, V. Aiello, A. Scandurra, M. Renis, F. Sinatra, *Sensors*, **8**, 2008, 5637.
- [39] J. Salonen, A.M. Kaukonen, J. Hirvonen, V.P. Lehto, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**, 2008, 632.
- [40] G. Ahuja, K. Pathak, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **71**, 2009, 599.
- [41] N.A. Vadia, S. Rajput, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, **4**, 2011, 44.
- [42] M. Vallet-Regí, F. Balas, *Open Biomedical Engineering Journal*, **2**, 2008, 1.
- [43] H.T. Chen, B.G. Trewyn, J.W. Wiench, M. Pruski, V.S. Lin, *Topics in Catalysis*, **53**, 2010, 187.
- [۴۴] فرشته رحیمی، "مطالعه حسگرهای مقاومتی گاز با ساختارهای سیلیکن متخلخل و لایه‌ای اکسید قلع" پایان‌نامه دکتری، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ۱۳۸۵
- [45] S.H. Anderson, H. Elliott, D.J. Wallis, L.T. Canham, J.J. Powell, *Physica Status Solidi*, **197**, 2003, 331.
- [5] S. Rossignol, M. Schwab, M. Schwartz, M.G. Fehlings, *Journal of Neuroscience*, **27**, 2007, 11782.
- [6] P.M. Warren, M.R. Andrews, M. Smith, K. Bartus, E.J. Bradbury, J. Verhaagen, J.W. Fawcett, J.C. Kwok, *Scientific Reports*, **10**, 2020, 1.
- [7] M. Akbari, S. Dabiri, M.M. Moeini-Aghtaei, M. Nazari-Robati, *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, **27**, 2020, 369.
- [8] V. Prabhakar, I. Capila, C.J. Bosques, K. Pojasek, R. Sasisekharan, *Biochemical Journal*, **386**, 2005, 103.
- [9] V. Prabhakar, I. Capila, V. Soundararajan, R. Raman, R. Sasisekharan, *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 2009, 974.
- [10] T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi, S. Suzuki, *Journal of Biological Chemistry*, **243**, 1968, 1523.
- [11] S. Daneshjou, B. Dabirmanesh, F. Rahimi, K. Khajeh, *International Journal of Biological Macromolecules*, **94**, 2017, 852.
- [12] S. Daneshjou, B. Dabirmanesh, F. Rahimi, S. Jabbari, K. Khajeh, *Journal of Biotechnology*, **324**, 2020, 83.
- [13] E.J. Bradbury, L.M. Carter, *Brain Research Bulletin*, **84**, 2011, 306.
- [14] R.J. McKeon, A. Hoke, J. Silver, *Experimental Neurology*, **136**, 1995, 32.
- [15] M.L. Lemons, D.R. Howland, D.K. Anderson, *Experimental Neurology*, **160**, 1999, 51.
- [16] J. Hu, W. Rodemer, G. Zhang, L.Q. Jin, S. Li, M.E. Selzer, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **9**, 2021, 1.
- [17] J.M. Massey, C.H. Hubscher, M.R. Wagoner, J.A. Decker, J. Amps, J. Silver, S.M. Onifer, *Journal of Neuroscience*, **26**, 2006, 4406.
- [18] I.C. Maier, M.E. Schwab, *Biological Sciences*, **361**, 2006, 1611.
- [19] N.J. Tester, A.H. Plaas, D.R. Howland, *Journal of Neuroscience Research*, **85**, 2007, 1110.
- [20] E.J. Bradbury, L.M. Carter, *Brain Research Bulletin*, **84**, 2011, 306.
- [21] C.M. Galtrey, J.W. Fawcett, *Brain Research Reviews*, **54**, 2007, 1.
- [22] W.B. Cafferty, E.J. Bradbury, M. Lidieth, M. Jones, P.J. Duffy, S. Pezet, S.B. McMahon, *Journal of Neuroscience*, **28**, 2008, 11998.
- [23] P.V. Iyer, L. Ananthanarayan, *Process biochemistry*, **43**, 2008, 1019.
- [24] R. Fopase, S. Paramasivam, P. Kale, B. Paramasivan, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **15**, 2020, 104266.