

رهایش کنترل شده زهر عقرب کمپسوبوتوس از نانوذره‌های کیتوزان به عنوان سامانه انتقال آنتی‌ژن

حمید سعیدیان*⁺، شیما شیرمحمدی بهادران

دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، ص.ب. ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران

ناصر محمدپور دونیقی*

پژوهشکده واکسن و سرم انسانی، موسسه واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

چکیده: نانوذره‌های پلیمری به عنوان یکی از بهترین سامانه‌های انتقال دارو، در سال‌های اخیر به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. در این مطالعه نانوذره‌های پلیمری به روش ژله‌ای شدن یونی تری‌پلی فسفات (TPP) و کیتوزان تهیه شدند. سپس زهر عقرب کمپسوبوتوس بر روی آن‌ها بارگذاری شد. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذره‌های به دست آمده و پارامترهای مؤثر بر آزادسازی زهر در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت. ریخت شناسی و ویژگی نانوذره‌های کیتوزان دارای زهر به ترتیب توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و فناوری طیف سنجی (FT-IR)، تعیین شد و متوسط اندازه ذره‌ها و پتانسیل زتا با استفاده از DLS اندازه‌گیری شد. فناوری FT-IR، اتصال گروه تری‌پلی فسفات با گروه‌های آمین کیتوزان را در نانوذره‌ها تأیید نمود و SEM ساختاری کروی، صاف و به تقریب همگن را برای نانوذره‌ها نشان داد. کپسوله کردن بهینه، با راندمان (۹۹/۹۸٪) و ظرفیت بارگذاری (۸۰/۴۴٪)، با استفاده از محلول کیتوزان با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، نسبت جرمی کیتوزان به TPP برابر با ۲ و غلظت اولیه ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر زهر عقرب به دست آمد. در شرایط آزمایشگاهی، در ۸ ساعت اولیه حدود ۲۰٪ آزادسازی زهر از نانوذره‌ها صورت گرفت و سپس به آرامی و با سرعت ثابت در ۷۲ ساعت، رهایش ادامه یافت. بنابراین می‌توان زهر عقرب کمپسوبوتوس، تثبیت شده روی نانوذره‌های کیتوزان را به عنوان یک سامانه انتقال آنتی‌ژن در نظر گرفت. آزادسازی ناگهانی و یک‌باره در مورد این زهر دیده نمی‌شود و این یکی از نقطه‌های قوت نانوذره‌های کیتوزان تهیه شده دارای زهر می‌باشد، چرا که آزاد سازی تدریجی آنتی‌ژن، برای تقویت سامانه ایمنی بسیار دارای اهمیت است.

واژه‌های کلیدی: زهر عقرب کمپسوبوتوس؛ سامانه انتقال آنتی‌ژن؛ نانوذره‌های کیتوزان؛ ژله‌ای شدن یونی؛ نانوذره‌های پلیمری.

KEYWORDS: *Compsobuthus scorpion venom; Antigen delivery system; Chitosan nanoparticles; Ionic gelation; Polymeric nanoparticles.*

+E-mail: Saeidian1980@gmail.com

*عهده دار مکاتبات

مقدمه

نانوذره‌های پلیمری به عنوان یکی از بهترین سامانه‌های انتقال دارو، در سال‌های اخیر به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. این مواد قادرند گستره‌ی وسیعی از داروها را در دوره‌های زمانی معین، به ناحیه‌های گوناگون بدن، حمل کنند [۱]. روش‌های زیادی برای ترکیب کردن دارو با نانوذره‌ها وجود دارد. برای نمونه، داروها می‌توانند در زمینه‌ی پلیمری حبس شوند یا در هسته‌ی نانوذره‌های کپسوله شوند و یا بوسیله‌ی غشاءهای پلیمری پوسته‌ای مانند احاطه شوند. همچنین ترکیب داروها با نانوذره‌ها از طریق ایجاد پیوندهای شیمیایی به پلیمرها، یا به وسیله جذب سطحی بر روی سطح نانوذره‌ها صورت می‌گیرد. با توجه به نوع روش آماده سازی، نانو ذره، نانو کره یا نانو کپسول به دست می‌آید [۳ و ۲].

نانو کپسول‌ها، سامانه‌های روزه‌داری هستند که در آن‌ها مولکول هدف درون یک روزه قرار می‌گیرد. این روزه دارای مایع درونی است که توسط یک غشاء پلیمری احاطه شده است [۴]. در این گونه موردها، مواد فعال به طور معمول در هسته درونی محلول هستند ولی ممکن است روی سطح کپسول جذب شوند [۵].

نانوذره‌های پلیمری، دارای ویژگی‌های درمانی مفید برای کمک به افزایش پایداری داروها، پروتئین‌ها و کنترل رهایش آن‌ها در بافت هدف، در دوره‌های زمانی معین، می‌باشند. برخی پلیمرها پایه‌ی طبیعی دارند مانند پلی آمینو اسیدها و پلی ساکاریدها و برخی پایه مصنوعی دارند مانند پلی استرها و پلی آمیدها. پلیمرهایی که پایه پلی ساکاریدی دارند اصلی‌ترین نوع پلیمرهای طبیعی هستند که آگاروزها و آلژینات‌ها از جمله‌ی آن‌ها می‌باشند [۶].

کیتوزان با داشتن ویژگی‌های زیست تخریب پذیر، زیست سازگار و غیر سرطان‌زایی، یک انتخاب عالی برای موارد زیست پزشکی، مانند جراحی، مهندسی بافت و ابزارهای رهایش دارو می‌باشد [۷-۱۲]. مقدار LD₅₀ کیتوزان در موش آزمایشگاهی ۱۶ گرم بر کیلوگرم از وزن بدن است که نزدیک به قند و نمک می‌باشد [۱۳]. این ترکیب یک باز ضعیف با pK_a در حدود ۶/۲-۷ است که در pH خنثی و قلیایی نامحلول است [۱۴]. کیتوزان را می‌توان توسط استیل‌زدایی از کیتین، که یکی از پلی ساکاریدهای طبیعی فراوان موجود در اسکلت بیرونی سخت‌پوستان مانند میگو و خرچنگ است، به دست آورد [۱۵]. کیتوزان یک پلیمر استیل‌شده طبیعی پلی کاتیونی با ساختار خطی است که از واحدهای N-استیل-D-گلوکز آمین و D-گلوکز آمین تشکیل شده است [۱۶]. در محیط اسیدی، گروه‌های آمینو متعلق به پلیمر، پروتونه شده و یک پلی ساکارید محلول، با بار

مثبت و دارای چگالی بار بالا ایجاد می‌شود. با توجه به در دسترس بودن گروه آمینو آزاد در کیتوزان، این ترکیب حامل یک بار مثبت است و با بسیاری از آنیون‌های دارای بار منفی، واکنش می‌دهد [۱۷]. سدیم تری‌پلی فسفات (TPP) یک نمک چند ظرفیتی با سه گروه فسفات دارای بار منفی است و می‌تواند در ایجاد پیوندهای عرضی با کیتوزان شرکت کند (طرح ۱).

چهار روش برای تهیه نانوذره‌های کیتوزان با اندازه کوچک گزارش شده است که عبارتند از انعقاد یونی، رسوب‌دهی/ته‌نشینی، انعقاد امولسیون - قطره و روش مایسل وارون [۱۸، ۱۷].

نانوذره‌های کیتوزان دارای TTP می‌توانند به آسانی به عنوان عامل‌های جذاب برای اهداف پزشکی استفاده شوند [۲۰]. زیرا:

۱. سمیت شیمیایی آن‌ها کم است. ۲. برای سنتز در مقیاس بالا بسیار ارزان هستند. ۳. می‌توانند در داروهای کم محلول حل شده و در نتیجه فعالیت زیستی آن‌ها را افزایش دهند. ۴. ظرفیت بارگذاری بالایی دارند و تجزیه مواد دارویی کمینه می‌شود. ۵. توانایی ماندگار بالا در خون برای تجمع تدریجی در بافت مورد نیاز را دارند.

عقرب، به دلیل نیش خطرناک و مرگبارش برای انسان بسیار مضر است. بنابراین از نظر پزشکی بسیار مورد توجه است. عقرب کمپسوبوتوس یکی از عقرب‌های گزنده خطرناک در ایران است. بیش‌ترین درصد گزیدگی توسط این عقرب در خوزستان گزارش شده است [۲۱]. بنابراین تولید آنتی‌ژن این عقرب با یک روش مطمئن می‌تواند بسیار ارزشمند باشد. یکی از راه‌ها تولید آنتی‌ژن فرایند هیپرایمینیزیشن از حیوان‌ها می‌باشد که نیاز به پروتکل‌های پیشرفته‌ای دارد [۲۲].

در این مطالعه، نانوذره‌های کیتوزان به روش ژله‌ای شدن یونی TPP و کیتوزان سنتز شدند. سپس تأثیر برخی فاکتورها در کپسوله کردن زهر عقرب کمپسوبوتوس روی نانوذره‌های کیتوزان سنتزی بررسی شده است. همچنین ریخت شناسی، ساختار نانوذره‌های کیتوزان دارای زهر عقرب و میزان تثبیت موثر زهر روی نانوذره‌های مورد مطالعه قرار گرفت.

بخش تجربی**مواد**

کیتوزان با وزن مولکولی پایین از شرکت پریمکس ایسلند، سدیم تری‌پلی فسفات (TTP) از شرکت سیگما-آلدريج آمریکا، فسفریک اسید (۸۵٪)، اتانول و استیک اسید از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. زهر عقرب کمپسوبوتوس از موسسه واکسن و

ویژگی‌های نانوذره‌ها**طیف‌سنجی فرورسرخ تبدیل فوریه**

طیف FT-IR (بازه‌ی $4000-400 \text{ cm}^{-1}$) در مورد کیتوزان تنها [۲۵]. و نانوذره‌های کیتوزان-TPP و نانوذره‌های کیتوزان دارای زهر ثبت شد. به دلیل برهمکنش بین گروه آمین کیتوزان و گروه فسفات در TPP و نیز زهر با کیتوزان، تغییرها در طیف FT-IR نانوذره‌ها مشاهده شد.

ریخت شناسی ذره‌ها

ویژگی‌های سطحی و شکل نانوذره‌های فریزدرای شده، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) تعیین شدند. به منظور جلوگیری از رشد نانوذره‌ها، نمونه‌های تازه تهیه شده بر روی پایه پوشیده شده از ورقه آلومینیوم قرار داده شد و پس از خشک شدن کامل، توسط یک لایه نازک از طلا پوشانده شد.

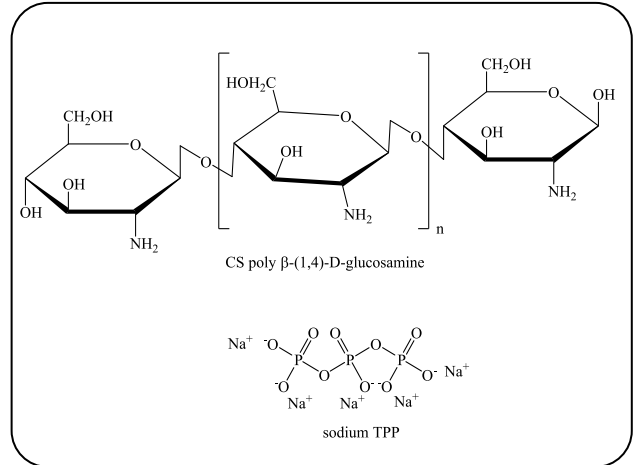
توزیع اندازه ذره‌ها و پتانسیل زتا

توزیع اندازه ذره‌ها، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی در مورد نانوذره‌های به دست آمده، با استفاده از دستگاه زتاسایزر تعیین شد. نمونه‌ها در پوشش پلی‌استایرن قرار داده شدند و شدت پراکندگی (PDI) در دمای 25°C اندازه‌گیری شد. بازه‌ی PDI از صفر تا یک است. مقدارهای نزدیک به صفر نشان‌دهنده پراکندگی همگن و مقدارهای بیش‌تر از نیم، نشان‌دهنده ناهمگنی بالا است. نانوذره‌های کیتوزان و نانوذره‌های کیتوزان دارای زهر به ترتیب دارای PDI 0.2 و 0.3 هستند که هر دو در بازه‌ی قابل قبول واقع شده‌اند ($PDI < 0.5$).

ظرفیت بارگذاری و تعیین بازده کپسوله کردن زهر

به منظور ارزیابی بازده کپسوله کردن زهر و ظرفیت بارگذاری نانوذره‌ها، نمونه‌ها در دمای 14°C به مدت ۳۰ دقیقه، با دور 20000 rpm سانتریفیوژ شده و میزان زهر آزاد در محلول رویی به روش برادفورد تعیین شد [۲۶]. ظرفیت بارگذاری زهر در نانوذره‌های کیتوزان (LC) و بازده کپسوله کردن زهر (AE) طبق فرمول زیر محاسبه شد که در آن A مقدار کل زهر استفاده شده برای آماده سازی، B مقدار زهر آزاد و C وزن نانوذره‌ها می‌باشد.

$$\text{LC}\% = (A-B/C * 100) \quad \text{و} \quad \text{AE}\% = (A-B/A * 100)$$



طرح ۱- ساختار شیمیایی کیتوزان و سدیم تری پلی فسفات.

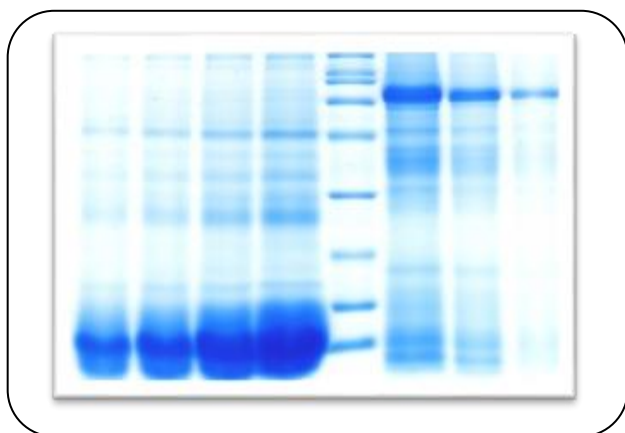
سرم‌سازی رازی تهیه شد. دستگاه تفرق نور دینامیک مدل Zetasizer ساخت شرکت مالورن برای اندازه‌گیری متوسط اندازه نانوذره‌ها و شاخص پراکندگی (poly dispersity index; PDI) و میکروسکوپ الکترونی نگاره مدل Philips 80KV 400 آینه‌دهون هلند برای بررسی ریخت شناسی نانوذره‌های کیتوزان به دست آمده استفاده شدند. ویژگی‌های ساختاری نانوذره‌ها توسط FT-IR-4100 Jasco Colchester انگلستان با استفاده از قرص KBr سنجیده شد. از دستگاه سانتریفیوژ مدل سیگما برای سانتریفیوژ کردن سوسپانسیون و از فریز درایر برای خشک کردن نانوذره‌های به دست آمده استفاده شد.

سنتز نانوذره‌ها

نانوذره‌های کیتوزان از طریق ژله‌ای شدن یونی کیتوزان با آنیون‌های TPP سنتز شدند [۲۳ و ۲۴]. کیتوزان در محلول آبی استیک اسید با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حل شد. محلول TPP با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر به دست آمد. سپس ۵ میلی‌لیتر از محلول کیتوزان به آرامی قطره قطره، به ۲ میلی‌لیتر از محلول TPP در حال چرخش افزوده شد. در این شرایط، سوسپانسیون شیری رنگی به دست آمد. نانوذره‌ها در دمای 14°C به مدت ۳۰ دقیقه به وسیله‌ی سانتریفیوژ با دور 20000 rpm جدا شده و سپس توسط خشک کردن انجمادی خشک شده و در دمای $4-8^\circ\text{C}$ ذخیره شدند. افزودن سم به نانوذره‌ها، با افزودن مقدارهای گوناگون سم (۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نخست به فاز آبی TPP افزوده و سپس به محلول کیتوزان وارد شد.

جدول ۱- تعیین LD₅₀ زهر عقرب کمپسوبوتوس

گروه	غلظت زهر (µg/ml)	تعداد موش	میزان مرگ و میر
۱	۱۳/۶	۵	۰
۲	۲۰/۴	۵	۰
۳	۳۰/۶	۵	۳
۴	۴۵/۹	۵	۵



شکل ۱- الگوی تهیه شده از الکتروفورز نمونه زهر عقرب

همان گونه که در شکل ۲ نشان داده شده، نانوذره‌های کیتوزان دارای زهر عقرب کروی شکل، دارای سطح به نسبت صاف و اندازه ذره‌ها ۸۰-۵۰ نانومتر است.

توزیع اندازه نانوذره‌های کیتوزان و نانوذره‌های کیتوزان دارای زهر عقرب، با استفاده از دستگاه تفرق نور لیزر (DLS) در شکل ۳ نشان داده شده است. اندازه متوسط نانوذره‌های کیتوزان حدود ۸۳ نانومتر است و پس از بارگذاری زهر عقرب، این مقدار به ۱۰۹ نانومتر افزایش می‌یابد. این امر را می‌توان به وزن مولکولی بالا و اندازه بزرگ پروتئین‌های زهر، جذب سطحی زهر بر روی نانوذره‌ها و تغییر جزئی گرانیروی در زمان بارگذاری زهر نسبت داد. البته اندازه نانوذره‌های کیتوزان اندازه‌گیری شده توسط DLS بیش‌تر از اندازه به‌دست آمده از تصویر SEM است و دلیل آن ظرفیت تورم بالای نانوذره‌های کیتوزان است [۲۷].

لازم به ذکر است در شرایطی که نسبت وزنی کیتوزان به TPP برابر با ۱:۲/۵ است میانگین توزیع اندازه ذره‌های ۱۶۰/۸ nm است و هنگامی که این نسبت برابر با ۲ باشد میانگین توزیع اندازه ذره‌ها

آزادسازی زهر در شرایط آزمایشگاهی (In-Vitro)

مقدار مشخصی از نانوذره‌های کیتوزان دارای زهر، در لوله‌های جداگانه دارای حجم‌های مساوی از محلول بافر فسفات با غلظت ۰/۲ مول بر لیتر و PH برابر با ۷/۴، در دمای ۲۵°C بر روی همزن به حالت سوسپانسیون درآمد. در فاصله‌های زمانی معین (۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۲۴، ۳۰، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت) یکی از لوله‌ها برداشته شد و نمونه در دمای ۱۴°C به مدت ۲۰ دقیقه، با دور ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و میزان زهر آزاد در محلول رویی به روش ماکرو برادفورد اندازه‌گیری شد.

مدل سازی سینتیک

به منظور درک مکانیسم و سینتیک آزادسازی زهر، نتیجه‌های مطالعه‌های رهایش زهر از نانوذره‌ها در شرایط آزمایشگاهی معادله‌های گوناگون سینتیکی، مانند درجه صفر، درجه یک، مدل هیگچی و نمودار پیپاس قرار داده شد. R₂ (ضریب همبستگی) و مقدار K (ثابت سرعت آزادسازی) در منحنی خطی، از تجزیه و تحلیل نمودارهای یاد شده به‌دست آمد.

نتیجه‌ها و بحث

ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی نانوذره‌ها

نخست ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی زهر عقرب کمپسوبوتوس مورد مطالعه قرار گرفت. درجه سمیت LD₅₀ معادل ۲۸/۸ میکروگرم در موش‌های ۱۸-۲۰ گرمی به‌دست آمد. البته بسته به شرایط محیطی، زمان سم‌گیری، سن و گونه عقرب مورد نظر، درجه سمیت تغییر می‌کند. این کار با تزریق غلظت‌های گوناگون زهر به ۴ گروه موش صورت گرفت. نتیجه‌های آن در جدول ۱ نشان داده شده است.

سپس براساس فرمول زیر LD₅₀ محاسبه شد.

$$\log LD_{50} = X_{100} \pm \frac{d}{n} \left(\sum r - \frac{n}{2} \right)$$

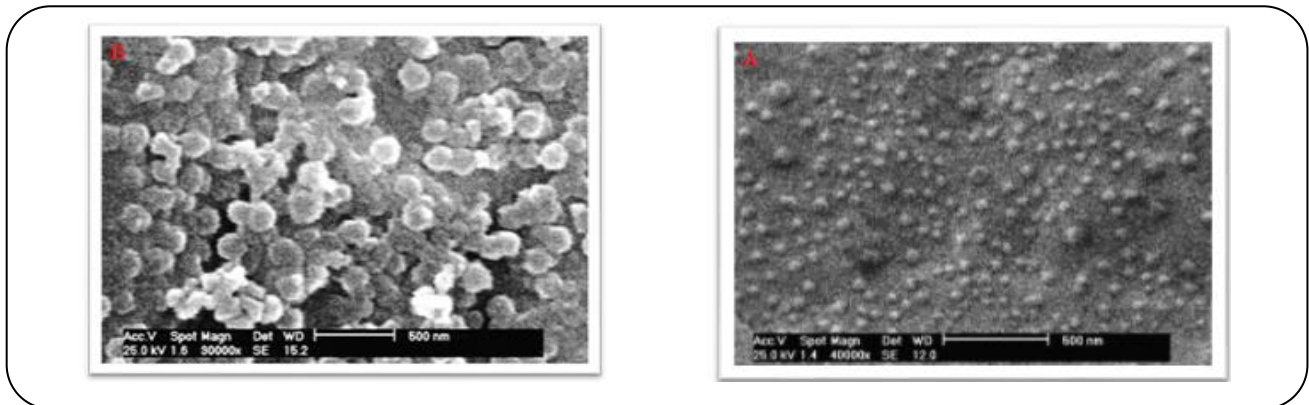
X_{100} = دوزی که صد در صد کشندگی داشته باشد

n = تعداد موش‌های استفاده شده در هر دوز

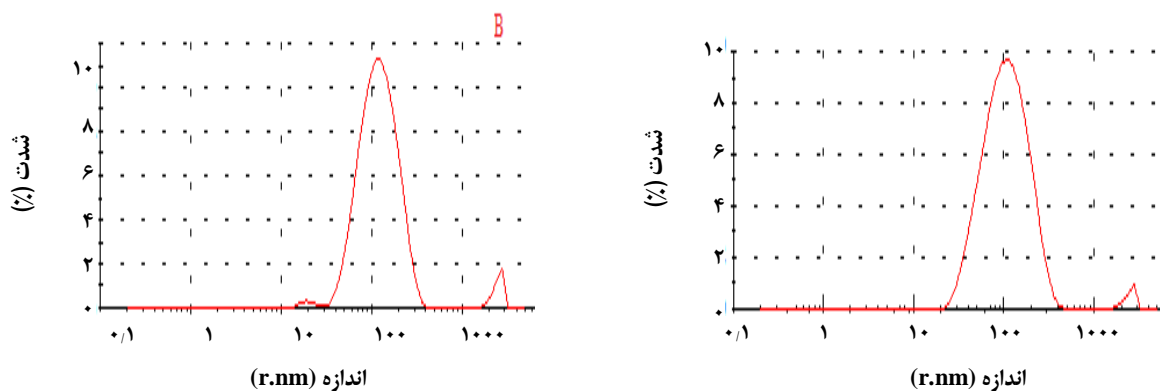
r = تعداد موش‌های کشته شده در هر دوز

$d = \log 1/5$ (ضریب فاصله‌های دوزها)

همچنین بررسی‌های الکتروفورز و کروماتوگرافی HPLC نشان داد که حدود ده نوع پروتئین در زهر عقرب کمپسوبوتوس و با وزن مولکولی تقریبی ۷/۵ کیلودالتون وجود دارد (شکل ۱).



شکل ۲- (A) SEM نانوذره‌های کیتوزان و (B) نانوذره‌های کیتوزان دارای زهر عقرب.



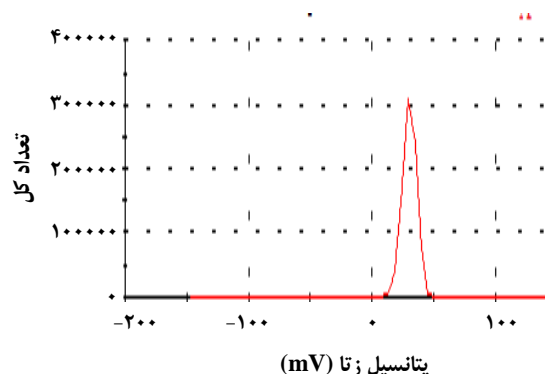
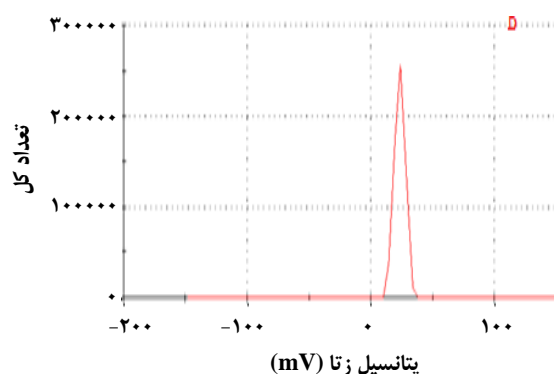
شکل ۳- (A) توزیع اندازه نانوذره‌های کیتوزان (غلظت TPP: ۱ mg/mL، غلظت کیتوزان: ۲ mg/mL و نسبت وزنی کیتوزان به TPP ۱:۲) (B) توزیع اندازه نانوذره‌های کیتوزان دارای زهر عقرب (غلظت TPP: ۱ mg/mL، غلظت کیتوزان: ۲ mg/mL و نسبت وزنی کیتوزان به TPP ۱:۲ و غلظت زهر ۵۰۰ µg/mL).

(B) کاهش می‌یابد. علت کاهش هفت واحدی پتانسیل را می‌توان به منفی بودن گروه‌های عاملی در زهر نسبت داد که موجب خنثی شدن پتانسیل مثبت روی سطح نانوذره‌های کیتوزان می‌شود.

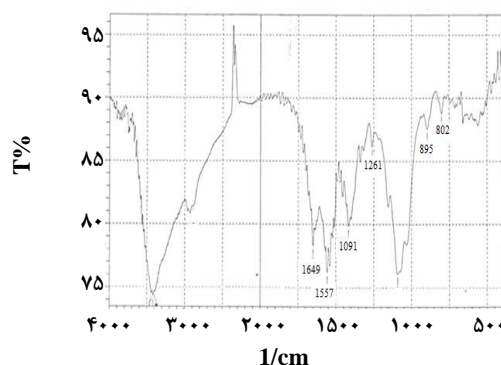
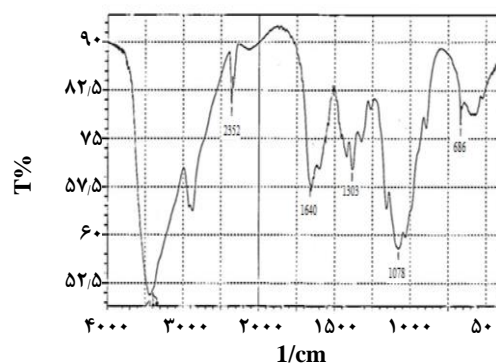
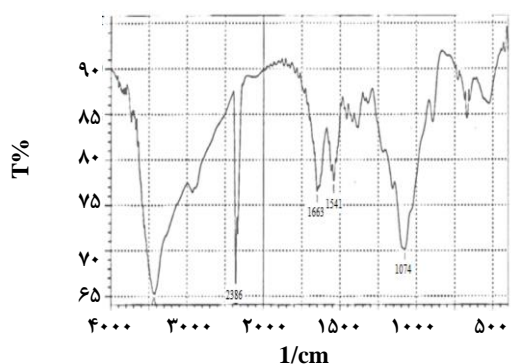
شکل ۵ طیف‌های FT-IR کیتوزان تنها، نانوذره‌های کیتوزان-TPP و نانوذره‌های کیتوزان دارای زهر را نشان می‌دهد. در طیف کیتوزان، پیک‌های در بازه $3400-3200 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به کششی O-H و پیوندهای هیدروژنی است. پیک 1654 در کیتوزان مربوط به گروه‌های $R-CO-NH_2$ است. در طیف نانوذره‌های کیتوزان-TPP، پیک‌ها در ناحیه‌های بین $1000-1250 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به TPP است. پیک اضافه در 1541 cm^{-1} نشان‌دهنده حضور گروه $P=O$ است. دو پیک در 1557 و 1417 cm^{-1} مربوط به خمشی NH_4^+ است و بیانگر برهمکنش بین گروه‌های فسفات TPP و گروه‌های آمین در کیتوزان است [۲۴].

تا $82/92 \text{ nm}$ کاهش می‌یابد. زیرا با افزایش غلظت کیتوزان، به دلیل پیوندهای درون زنجیره‌ای هیدروژنی قوی که بین مولکول‌های کیتوزان وجود دارد، تمایل به برقراری پیوندهای عرضی با TPP کم-تر شده، در نتیجه اندازه نانوذره‌های تولیدی افزایش می‌یابد. در حالی که با کاهش غلظت کیتوزان تا حد معینی، یون‌های تری‌پلی‌فسفات به راحتی می‌توانند با گروه‌های آمین با بار مثبت کیتوزان پیوند عرضی برقرار کنند. در نتیجه در مولکول‌های کیتوزان به طور کامل پیوندهای عرضی ایجاد شده و اندازه ذره‌ها کاهش پیدا می‌کند.

بار سطحی نانوذره‌ها (پتانسیل زتا) در سوسپانسیون کلئیدی رقیق شده با آب مقطر اندازه‌گیری شد. پتانسیل زتای نانوذره‌های کیتوزان $30/7 +$ میلی‌ولت بود (شکل ۴ A)، در حالی که پس از بارگزاری زهر در آن، مقدار پتانسیل زتا به 23 میلی‌ولت (شکل ۴



شکل ۴- (A) پتانسیل زتا نانوذره‌های کیتوزان (غلظت TPP: ۱ mg/mL، غلظت کیتوزان: ۲ mg/mL و نسبت وزنی کیتوزان به TPP ۱:۲) (B) پتانسیل زتا نانوذره‌های کیتوزان دارای زهر عقرب (غلظت TPP: ۱ mg/mL، غلظت کیتوزان: ۲ mg/mL و نسبت وزنی کیتوزان به TPP ۱:۲ و غلظت زهر ۵۰۰ μg/mL).



شکل ۵- طیف FT-IR کیتوزان تنها، (B) نانوذرات کیتوزان-TPP و (C) نانوذرات کیتوزان دارای زهر عقرب.

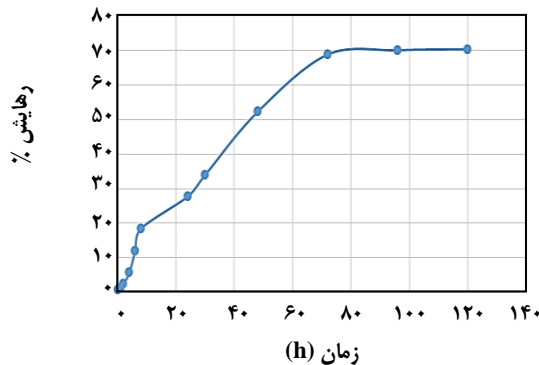
و مناسب می باشد، در حالی که ظرفیت بارگذاری در غلظت $\mu\text{g/mL}$ ۷۵۰ زهر، بیش از ۱۰۰٪ است. مولکول‌های پروتئینی زهر، ماکرومولکول‌های بزرگ با ساختار سه بعدی پیچیده‌ای هستند که قادرند در محلول‌های گوناگون به شکل‌های گوناگون درآیند و برهمکنش آن‌ها با زنجیر بلند کاتیونی کیتوزان در شرایط گوناگون

اثر غلظت زهر در ظرفیت بارگذاری و بازده کپسوله کردن

برای دستیابی به بهترین غلظت زهر برای بارگذاری، سه غلظت ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. همان‌گونه که در جدول ۲ نشان داده شده است بازده کپسوله شدن در غلظت ۵۰۰-۷۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیش‌ترین ارقام را داشته

جدول ۲- اثر غلظت زهر در ظرفیت بارگزاری و بازده کپسوله کردن

ظرفیت بارگزاری	بازده کپسوله کردن	غلظت زهر ($\mu\text{g/ml}$)
۶۶/۳۰	۷۶/۶۵	۲۵۰
۸۰/۴۴	۹۹/۹۸	۵۰۰
۱۳۳/۴۴	۹۹/۱۲	۷۵۰



شکل ۶ - رهایش نانوذره‌های کیتوزان دارای زهر عقرب در شرایط آزمایشگاهی (غلظت TPP: 1 mg/mL ، غلظت کیتوزان: 2 mg/mL و نسبت وزنی کیتوزان به TPP ۱:۲ و غلظت زهر $500 \mu\text{g/mL}$).

مطالعه‌های سینتیکی

به منظور بررسی مکانیسم های احتمالی آزادسازی سم مورد مطالعه، بایستی داده های به دست آمده از آزادسازی سم از نانوذره‌های کیتوزان را با مدل های سینتیکی موجود مطابقت داده و مدلی که بیشترین تطابق را نشان دهد به عنوان مدل احتمالی برای آزادسازی سم انتخاب شود. در شکل ۷ نمودارهای آزادسازی نانوذره‌های دارای سم بر اساس ۳ مدل سینتیکی درجه صفر، هیگوشی و درجه یک به همراه ضرایب برازش هر یک نشان داده شده است. بهترین رابطه‌ی خطی در مدل سینتیکی هیگوشی [۳۰] ($R^2 = 0.9742$) و سپس مدل درجه صفر ($R^2 = 0.9423$) قابل دیدن است.

نتیجه گیری

در این پژوهش، نانوذره‌های کیتوزان بارگزاری شده با زهر عقرب کمپسوبوتوس، که بوسیله ژله‌ای شدن یونی کیتوزان با TPP تولید شده، مورد بررسی قرار گرفتند. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن‌ها و آزادسازی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی مورد

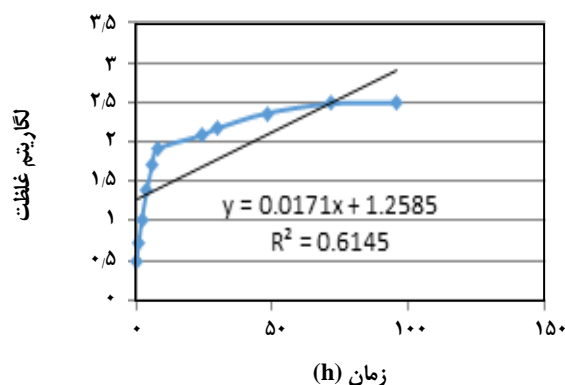
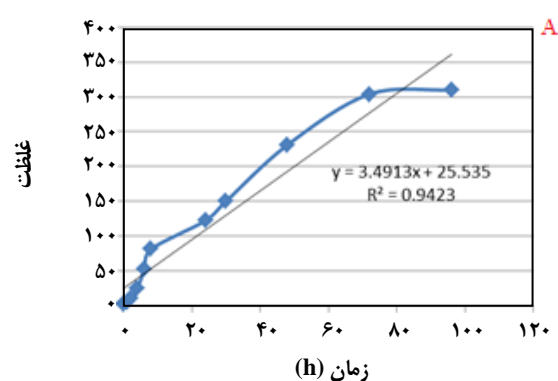
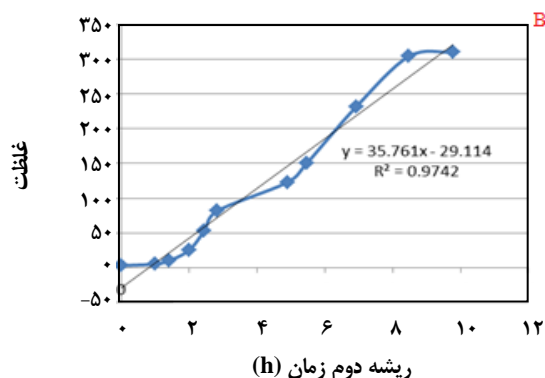
مقاومت است. TPP به عنوان یک اتصال دهنده، پیوندهای هیدروژنی بیش تری با گروه آمین آزاد در هر دو مولکول پروتئین و نانوذره‌های کیتوزان ایجاد نموده و منجر به تراکم بیش تر نانوذره‌های دارای پروتئین کیتوزان می‌شود. جذب بیش تر مولکول‌های زهر بر روی سطح نانوذره‌های به طور مرتب صورت گرفته و منجر به حبس پروتئین زیادی توسط نانوذره‌ها می‌شود. بدین ترتیب ظرفیت بارگزاری ممکن است به بیش از ۱۰۰٪ برسد [۲۸]. غلظت $500 \mu\text{g/mL}$ به عنوان بهترین غلظت انتخاب شد، زیرا ضمن کسب ظرفیت بارگزاری مناسب، از تجمع پروتئین زیادی در سطح نانوذره‌ها جلوگیری می‌شود.

بررسی آزادسازی زهر در شرایط آزمایشگاهی (In-Vitro)

همان گونه که در شکل ۶ دیده می‌شود، ۷۰٪ از زهر قرار گرفته در نانوذره‌های کیتوزان، در ۸۰ ساعت اولیه آزاد شده است. نمودار شامل دو قسمت می‌باشد: در ۸ ساعت اولیه رهایش در حدود ۲۰٪ و به دنبال آن یک رهایش آرام پنجاه درصدی برای ۷۲ ساعت بعدی صورت می‌گیرد. در ساعت‌های اولیه، آزادسازی به صورت توده‌ای و مربوط به جدایی مولکول‌های زهری است که پیوند سستی با سطح نانوذره‌های کیتوزان دارند و سپس، رهایش تدریجی زهر به دام افتاده در درون نانوذره‌ها، به دلیل فرسایش و تخریب تدریجی نانوذره‌های پلیمری، رخ می‌دهد [۲۹].

تفاوت چشمگیری بین روند آزادسازی زهر مورد نظر و داروهای شیمیایی از درون نانوذره‌ها دیده می‌شود. به این ترتیب که آزادسازی ناگهانی و یک‌باره گزارش شده در مورد ترکیب‌های شیمیایی، در مورد این زهر دیده نمی‌شود و این یکی از نقطه‌ها قوت سامانه‌های نانوذره‌های دارای زهر در سامانه‌های انتقال آنتی ژن است، چرا که آزاد سازی تدریجی آنتی ژن، برای تقویت سامانه ایمنی بسیار دارای اهمیت است.

طی آزادسازی زهر از نانوذره‌های کیتوزان در pH فیزیولوژیک بدن، دو فرایند آزادسازی و تخریب پروتئین از همان ابتدا به موازات هم پیش می‌روند. در آغاز روند آزادسازی، سرعت رهایش بیش تر از سرعت تخریب است، اما با گذشت زمان سرعت تخریب بیش تر از سرعت رهایش شده و این امر باعث می‌شود روش برادفورد قادر به اندازه‌گیری پروتئین تخریب شده در این مرحله نباشد. در این پژوهش نیز پس از گذشت ۱۲۰ ساعت، سرعت تخریب پروتئین از سرعت آزادسازی فراتر رفته و نتیجه‌های به دست آمده از پروتئین سنجی برادفورد به صورت عددی منفی ظاهر می‌شوند.



شکل ۷- (A) مدل درجه صفر، (B) مدل هیگچی و (C) مدل درجه یک برای رهایش زهر توسط نانوذره‌های کیتوزان دارای زهر عقرب

قدردانی

این پژوهش با حمایت دانشگاه پیام نور و موسسه واکسن و سرم سازی رازی انجام شده است که بدینوسیله نویسندگان این مقاله، صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نمایند.

مطالعه قرار گرفت. شرایط بهینه برای بهره‌وری دلخواه کپسوله کردن و ظرفیت بارگزاری، در محلول‌های با غلظت TPP برابر با ۱ mg/mL، غلظت کیتوزان ۲ mg/mL و نسبت وزنی کیتوزان به TPP ۱:۲ و غلظت زهر ۵۰۰ µg/mL مشاهده شد. آزادسازی ناگهانی و یک‌باره در خصوص این زهر دیده نمی‌شود و این یکی از نقطه‌های قوت نانوذره‌های کیتوزان دارای زهر تهیه شده می‌باشد، چرا که آزاد سازی تدریجی آنتی‌ژن، برای تقویت سامانه ایمنی بسیار دارای اهمیت است.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۱۴ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۷

مراجع

- [1] Saboktakin M.R., Tabatabaei R.M., *Supramolecular Hydrogels as Drug Delivery Systems*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **75**: 426-436 (2015).
- [2] Langer R., *Biomaterials in Drug Delivery and Tissue Engineering: One Laboratory's Experience*, *Acc. Chem. Res.*, **33**: 94-101 (2000).

- [۳] مرضیه امیدی؛ سید عباس شجاع الساداتی؛ علی مرسلی، بررسی بارگذاری و رهایش کنترل شده یک داروی ضد آریتمی قلبی در یک چارچوب فلز - آلی، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۲) ۳۳: ۲۱ تا ۲۵ (۱۳۹۲).
- [4] Hilder T.A., Hill J. M., Carbon Nanotubes as Drug Delivery Nanocapsules, *Current Appl. Phys.*, **8**: 258-261 (2008).
- [5] Whelan J., Nanocapsules for Controlled Drug Delivery, *Drug Discov. Today*, **6**: 1183-1184 (2001).
- [6] Christie Sonia Mary M., Sasikumar S., Sodium Alginate/Starch Blends Loaded with Ciprofloxacin Hydrochloride as a Floating Drug Delivery System - In Vitro Evaluation, *Iran. J. Chem. Chem. Eng. (IJCCE)*, **34**: 25-31 (2015).
- [7] Bano I., Arshad M., Yasin T., Ghauri M.A., Younus M., Chitosan: A Potential Biopolymer for Wound Management. *Int. J. Biol. Macromol.*, **102**: 380-383 (2017).
- [8] Yeo J.H., Lee K.G., Kim H.C., Oh Y.L., Kim S.Y., The effects of PVA/Chitosan/Fibroin (PCF)-Blended Spongy Sheets on Wound Healing in Rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **23**: 1220-1223 (2000).
- [9] Naghizadeh A.; Ghafouri M., Synthesis and Performance Evaluation of Chitosan Prepared from Persian Gulf Shrimp Shell in Removal of Reactive Blue 29 Dye from Aqueous Solution (Isotherm, Thermodynamic and Kinetic Study), *Iran. J. Chem. Chem. Eng. (IJCCE)*, **36**: 25-36 (2017).
- [10] Broichsitter M.B., Nicolas J., Couvreur P., Design Attributes of Long-Circulating Polymeric Drug Delivery Vehicles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **97**: 304-317 (2015).
- [11] Bhattarai N., Gunn J., Zhang M., Chitosan-Based Hydrogels for Controlled, Localized Drug Delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**: 83-99 (2010).
- [12] Shukla S.K., Mishra A.K., Arotiba O.A., Mamba B.B., Chitosan-Based Nanomaterials: A State-of-the-Art Review, *Int. J. Biol. Macromol.*, **59**: 46-58 (2013).
- [13] Agnihotri S.A., Malli Karjuna N.N., Aminabhavi T.M., Recent Advances on Chitosan-Based Micro- and Nanoparticles in Drug Delivery. *J. Control. Rel.*, **100**: 5-28 (2004).
- [14] Dash M., Chiellini F., Ottenbrite R.M., Chiellini E., Chitosan—A Versatile Semi-Synthetic Polymer in Biomedical Applications, *Progress in Polymer Sci.*, **36**: 981-1014 (2011).
- [15] Nasti A., Zaki N.M., Leonardis P., Ungphaiboon S., Sansongsak P., Rimoli M.G., Tirelli N., Chitosan/TPP and Chitosan/TPP-Hyaluronic Acid Nanoparticles: Systematic Optimisation of the Preparative Process and Preliminary Biological Evaluation. *Pharm. Res.*, **26**: 1918-1930 (2009).
- [۱۶] حسن‌زاده کفشگری، مرتضی؛ منصوری، محسن؛ صمیمی، عبدالرضا، بهسازی و تعیین درجه استیل‌زدایی کیتوزان با روش تیتراسیون پتانسیل سنجی و طیف‌نمایی زیر قرمز، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۲) ۳۱: ۱۳ تا ۲۰ (۱۳۹۱).
- [17] Sinha V.R., Singla A.K., Wadhawan S., Kashik R., Kumria R., Bansal K., Dhawan S., Chitosan Microspheres as a Potential Carrier for Drugs, *Int. J. Pharm.*, **274**: 1-33 (2004).
- [18] Calvo P., Remunan-Lopes C., Vila-Jato J.L., Alonso M.J., Chitosan and Chitosan/Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer Nanoparticles as Novel Carriers for Proteins and Vaccines, *Pharm. Res.*, **14**: 1431-1436 (1997).

- [19] Guliyeva U., Oner F., Ozsor S.S., Hazirolu R., [Chitosan Microparticles Containing Plasmid DNA as Potential oral Gene Delivery System](#), *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **62**: 17-25 (2006).
- [20] Tokumitsu H., Ichikawa H., Fukumori Y., [Chitosan-Gadopentetic Acid Complex Nanoparticles for Gadolinium Neutron-Capture Therapy of Cancer: Preparation by Novel Emulsion-Droplet Coalescence Technique and Characterization](#). *Pharm. Res.*, **16**: 1830-1835 (1999).
- [21] Dehghani R., Djadid N.D., Shahbazzadeh D., Bigdelli S., [Introducing Compsobuthus Matthiesseni \(Birula, 1905\) Scorpion as one of the Major Stinging Scorpions in Khuzestan, Iran](#). *Toxicon.*, **54**: 272-25 (2009).
- [22] Mohammadpour Dounighi N., Damavandi M., Zolfagharian H., Moradi S., [Preparing and characterizing Chitosan Nanoparticles Containing Hemiscorpius Lepturus Scorpion Venom as an Antigen Delivery System](#), *Archives Razi Institute.*, **67**: 145-153 (2012).
- [23] Mohammadpour Dounighi N., Behfar A., Ezabadi A., Zolfagharian H., Heydari M., [Preparation of Chitosan Nanoparticles Containing Naja Naja Oxiana Snake Venom](#), *Nanomed. Nanotechnol. Biol., Med.* **6**: 137-143 (2010).
- [24] Kawashima Y., Handa T., Kasai A., Takenaka H., Lin S.Y., Ando Y., [Novel Method for the Preparation of Controlled- Release Theophylline Granules Coated with a Polyelectrolyte Complex of Sodium Polyphosphate-Chitosan](#), *J. Pharm. Sci.*, **47**: 264-268 (1985).
- [25] Mohammadpour Dounighi N., Yazdizadeh R., Zolfagharian H., [New Antigen Delivery Vehicle Candidate: Orthochirus iranus Scorpion Venom Entrapped in Chitosan Nanoparticles](#), *British J. Pharm. Res.*, **7**: 264-275 (2015).
- [26] Kruger N.J., [The Bradford Method for Protein Quantitation](#). *Methods Mol. Biol.*, **32**: 9-15 (1994).
- [27] Dustgani A., Farahania E.V., Imani M., [Preparation of Chitosan Nanoparticles Loaded by Dexamethasone Sodium Phosphate](#). *Iran. J. Pharm. Sci.*, **4**: 111-114 (2008).
- [28] Gan Q., Wang T., [Chitosan Nanoparticle as Protein Delivery Carrier—Systematic Examination of Fabrication Conditions for Efficient Loading and Release](#), *Colloid Surface B: Biointerface*, **59**: 24-34 (2007).
- [29] Dailey L. A., Wittmar M., Kissel T., [The Role of Branched Polyesters and Their Modifications in the Development of Modern Drug Delivery Vehicles](#), *J. Control Rel.*, **101**: 137-149 (2005).
- [30] Siepmann J., Peppas N. A., [Higuchi Equation: Derivation, Applications, Use and Misuse](#), *Int. J. Pharm.* **418**: 6-12 (2011).