

شناخت و بررسی خصوصیات نانوذرات کیتوزان حاوی سم مار افعی قفقازی به منظور تهیه

سیستم آنتی ژن رسانی و ادجوانت نوین

ناصر محمدپور دونیقی^{*}، مهشید جوادی^۱، حسین ذوالفقاریان^۲، محمدرضا عوادی^۴

خلاصه

مقدمه: کاربرد نانوذرات هیدروفیلیک در سال‌های اخیر به طور گسترده در سیستم‌های انتقال دارو و درمان مورد مطالعه قرار گرفته است. با توجه به معایب ادجوانت‌های سنتی، در تحقیق حاضر زهر مار افعی قفقازی در نانوذرات کیتوزان بارگیری گردید تا به عنوان سیستم آنتی ژن رسانی پیشرفته و جایگزین سیستم‌های سنتی در صنعت تولید پادزهر به کار رود.

روش: برای تهیه نانوذرات از روش ژلاسیون یونی پلیمر کیتوزان و Crosslinker استفاده شد و غلظت پلیمر، غلظت Crosslinker، اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات، پتانسیل سطحی، شکل و خصوصیات سطحی، بازده بارگیری (Loading efficiency یا LE)، ظرفیت بارگیری (Loading capacity یا LC) و ساختار نانوذرات بررسی و اپتیمم سازی گردید.

یافته‌ها: غلظت مناسب پلیمر برای تهیه نانوذرات ۲ میلی گرم بر میلی لیتر، Crosslinker ۱ میلی گرم بر میلی لیتر و زهر افعی قفقازی ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. میانگین اندازه نانوذرات کیتوزان حاوی زهر در شرایط اپتیمم ۱۲۹ نانومتر، توزیع اندازه ذرات ۰/۴۱۸، پتانسیل سطحی ۴۱ میلی ولت، میزان LE و LC به ترتیب ۲/۱ ± ۸۸ و ۱/۹ ± ۸۲ درصد بود. طیف FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) نانوذرات نشان داد که بین کیتوزان و Crosslinker پیوند برقرار شده است و شکل کروی و سطح صاف و هموزن نانوذرات در میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM یا Scanning electron microscopy) مشخص گردید. در مطالعه رهایش زهر، آزادسازی سریع اولیه و سیستم آهسته رهش تا ۹۶ ساعت مشاهده شد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج تحقیق، می توان گفت که نانوذرات کیتوزان حاوی زهر می تواند جایگزین مناسبی برای ادجوانت‌های سنتی در صنعت تولید پادزهر باشند.

واژه‌های کلیدی: کیتوزان، نانوذرات، مار افعی قفقازی، زهر، ژلاسیون یونی

۱- استادیار بیوتکنولوژی، استیتو رازی، کرخ، ایران ۲- پژوهشگر، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران، تهران، ایران ۳- دانشیار بیوشیمی، استیتو رازی، کرخ، ایران

۴- استادیار فارماسیو تیکس، واحد تحقیق و توسعه، شرکت داروسازی حکیم، تهران، ایران

* نویسنده مسؤل، آدرس پست الکترونیک: nasser_mohammadpour@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۱/۱۲ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۴/۷/۲۸ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۸/۵

مقدمه

امروزه نانوتکنولوژی پیشرفت‌های وسیعی در کاربردهای پزشکی در ابعاد نانو داشته است. به طور مثال، با استفاده از روش‌های جدید، می‌توان نانوذرات را در حمل داروها به کار برد (۱). نانوذرات، ذرات کلوئیدی و جامدی با اندازه کوچک‌تر از میکرون هستند و شیمی سطح پیچیده‌ای دارند که دارای خصوصیات ویژه‌ای می‌باشد. افزایش سطح به دلیل کاهش اندازه ذرات، موجب تغییر فشار سطحی و همچنین، تغییر فاصله ذرات می‌گردد. افزایش نسبت سطح به حجم نانوذرات، باعث می‌شود که اتم‌های واقع در سطح، اثر بسیار بیشتری نسبت به اتم‌های درون بر خواص فیزیکی و شیمیایی ذرات داشته باشند. ریزتر شدن، موجب تماس و فعالیت بیشتر می‌شود و در نتیجه، واکنش‌پذیری نانوذرات به شدت افزایش می‌یابد. بر اساس این ویژگی‌ها، می‌توان از نانوذرات در حمل دارو استفاده نمود. نانوذرات حمل‌کننده دارو به طور معمول می‌توانند ظرفیت حمل و کارایی دارورسانی را افزایش دهند. در این بین، کیتوزان نسبت به سایر پلیمرهای طبیعی به طور چشمگیری مورد توجه قرار گرفته است (۲). کیتوزان یک پلی‌ساکارید طبیعی فراوان در طبیعت است که از داستیله شدن کیتین به دست می‌آید (۳). کیتین نیز از واحدهای گلوکز آمین و N-استیل گلوکز آمین تشکیل شده است (۴). کیتوزان خواصی از جمله محرک سیستم ایمنی، مخاط‌جذبی، ضد میکروب و تسریع بهبود زخم دارد (۵-۷). علاوه بر این، به عنوان پلیمر مورد علاقه برای تهیه سیستم‌های واکنش‌رسانی و ادجوانت در فرمولاسیون واکنش‌ها به شمار می‌رود (۸).

ادجوانت‌ها پاسخ ایمنی در مقابل آنتی‌ژن‌ها را تقویت می‌کنند، اما به خودی خود ایمنی‌زا نیستند. در گذشته

ترکیبات نمکی آلومینیوم و کلسیم مانند فسفات آلومینیوم، هیدروکسید آلومینیوم، تارتارات پتاسیم- آلومینیوم و فسفات کلسیم به طور عموم مورد استفاده قرار می‌گرفته است. این ترکیبات غیر محلول، آنتی‌ژن را جذب سطحی می‌کردند و با به تأخیر انداختن زمان رهش آن در محل تزریق زیر جلدی و عضلانی، مدت زمان تحریک سیستم ایمنی را طولانی می‌نمودند که این حالت اثری مشابه با چندین تزریق آنتی‌ژن را دارد (۹-۱۱). نانوذرات کیتوزان به طور بسیار وسیعی تحت عنوان سیستم انتقال انواع عوامل پروتئینی همچون انسولین (۱۲)، توکسوئید دیفتری (۱۳)، زهر عقرب‌ها (۱۴-۱۷)، زهر مار (۱۱) و پروتئین‌ها (۱۹)، (۱۸، ۹)، واکنش‌ساز مخطی (۲۰) و واکنش‌رسانی از طریق خوراکی (۲۱) مورد مطالعه قرار گرفته که نتایج به دست آمده در همه موارد چشمگیر بوده است.

به طور کلی ادجوانت‌ها از لحاظ تئوری امکان استفاده از دوز کمتر آنتی‌ژن به منظور ایجاد پاسخ ایمنی بالا را فراهم می‌کنند. از جمله معایب ادجوانت‌های سنتی می‌توان به عدم پایداری، تجزیه سریع پس از تزریق، وقت‌گیر و پرهزینه بودن فرایند تولید آن، توانایی تقویت ایمنی‌زایی تا حدودی ضعیف و عوارض جانبی در محل تزریق اشاره کرد. بنابراین، تصمیم گرفته شد که طراحی سیستم‌های جایگزین با کارایی و پایداری بالاتر، ایمنی‌زایی بیشتر، عوارض و هزینه ساخت کمتر مد نظر قرار گیرد. امروزه سیستم‌های همراه با آزادسازی کنترل شده بر پایه نانوذرات، با موفقیت چشمگیری همراه بوده است. در تحقیق حاضر سعی شد تا از پلیمر زیست تخریب‌پذیر کیتوزان جهت تولید نانوذرات با آزادسازی کنترل شده زهر مار افعی قفقازی، به منظور کاربرد در فرایند تولید پادزهر استفاده گردد. برای تهیه نانوذرات کیتوزان، روش زوج یونی به کار گرفته شد.

مزیت این روش، امکان کار در شرایط ملایم بدون آسیب زدن به پروتئین‌های موجود در آنتی‌ژن می‌باشد (۲۳، ۲۲). هدف اصلی از انجام این تحقیق، تهیه یک سیستم آنتی‌ژن رسانی جدید و پیشرفته برای جایگزینی ادجوانت‌های سنتی به منظور کاربرد در تهیه پادزهر عیله مار افعی قفقازی بود.

روش بررسی

در پژوهش حاضر از سم مار افعی قفقازی تهیه شده در مؤسسه رازی به صورت پودر لیوفیلیزه استفاده شد. کیتوزان با وزن مولکولی پایین و درجه داستیلاسیون ۹۵ درصد (شرکت پریمکس، ایسلند) نیز به کار برده شد. سدیم تری پلی فسفات، اسید استیک، اسید فسفریک، متانول و کوماسی بریلیانت بلو (Coomassie Brilliant Blue) G250 مورد استفاده ساخت شرکت Merck (آلمان) بود.

از موش سوری با وزن ۱۸-۲۱ گرم برای تعیین میزان سمیت زهر مار افعی قفقازی استفاده شد که از بخش پرورش حیوانات آزمایشگاهی مؤسسه رازی تهیه گردید.

بررسی و تعیین درجه سمیت (LD₅₀) زهر

برای تعیین سمیت زهر مار افعی قفقازی، LD₅₀ زهر در موش‌های سوری ۱۸-۲۰ گرمی با استفاده از روش آماری Spearman-Kärber و بر اساس روش Finney تعیین گردید (۲۴، ۲۵). به این ترتیب دوزهایی از زهر به صورتی انتخاب شدند که در اولین دوز هیچ موشی مرگ نداشته باشد و در آخرین دوز همه موش‌ها دچار مرگ شوند. از هر کدام از دوزهای مورد نظر، ۶ میلی‌لیتر تهیه شد و از هر دوز به ۶ سر موش هر کدام یک میلی‌لیتر به صورت داخل وریدی تزریق گردید. در نهایت، مرگ و میر موش‌ها طی ۲۴ ساعت ثبت و LD₅₀ زهر محاسبه شد.

تهیه نانوذرات کیتوزان و بارگیری سم مار افعی قفقازی

سدیم تری پلی فسفات پلی‌آنیونی است که می‌تواند با کیتوزان واکنش الکترواستاتیکی داشته باشد (۲۶، ۵). در این روش کیتوزان در محلول آبی اسید استیک، به نحوی که غلظت اسید استیک در حلال مائی یک و نیم برابر کیتوزان حل شده باشد، به منظور ایجاد کاتیون کیتوزان محلول گردید و محلول سدیم تری پلی فسفات با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با حل شدن در آب دو بار تقطیر آماده شد. برای تهیه نانوذرات کیتوزان، محلول سدیم تری پلی فسفات به محلول کیتوزان با غلظت دو میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در اسید استیک، به نسبت ۱ به ۲/۵، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با سرعت همزن ۱۰۰۰ دور در دقیقه اضافه گردید. سدیم تری پلی فسفات به عنوان Crosslinker عمل نمود و تحت شرایط مذکور نانوذرات کیتوزان تشکیل گردید (۲۷). برای تهیه نانوذرات کیتوزان حاوی سم، سم با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ازای هر میلی‌لیتر از محلول به فاز آبی سدیم تری پلی فسفات اضافه شد و بقیه مراحل بر اساس مراحل ذکر شده انجام گرفت.

در مراحل بعدی، سوسپانسیون حاصل به مدت یک ساعت با سرعت $50000 \times g$ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سپس، رسوبات حاصل لیوفیلیزه گردید و وزن آن توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد.

بررسی ویژگی‌های نانوذرات کیتوزان و نانوذرات کیتوزان حاوی زهر

خصوصیات ظاهری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning electron microscopy یا SEM) از نوع AIS2300-SEI HITACGHI با Resolution 35 angstroms

که در این معادلات، A مقدار سم کل، B مقدار سم آزاد شده و C وزن نانوذرات می باشد.

رهایش زهر از نانوذرات در شرایط آزمایشگاهی

برای تعیین درصد رهایش زهر از نانوذرات، مقدار مشخص و مساوی از پودر لیوفیلیزه نانوذرات حاوی زهر در میکروتیوب‌هایی حاوی حجم مساوی از بافر فسفات سالین (Phosphate buffered saline یا PBS) ۰/۱ مولار با $\text{pH} = 6/8$ و تحت شرایط سرعت همزنی ۴۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در Shaker انکوباتور قرار داده شد. در فاصله‌های زمانی ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۲۴، ۳۱، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت یکی از میکروتیوب‌ها برداشت گردید و به مدت یک ساعت با سرعت $50000 \times g$ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. سپس، مقدار زهر آزاد شده از نانوذرات کیتوزان در سوپرناتانت مورد محاسبه قرار گرفت (۳۲).

نتایج

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی نانوذرات کیتوزان و نانوذرات حاوی زهر

میانگین اندازه، توزیع اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات کیتوزان با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و سدیم تری پلی‌فسفات با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در شکل ۱ (قسمت‌های الف و ب) نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌گردد، نانوذرات دارای میانگین اندازه ۱۳۸/۳ نانومتر، دارای توزیع اندازه ذرات ۰/۳۱۹ و پتانسیل زتای ۴۲/۶ میلی‌ولت بودند. میانگین اندازه، توزیع اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات کیتوزان حاوی زهر در شکل ۲ (قسمت‌های الف و ب) ارایه شده است. میانگین اندازه

مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، ساختار پلیمر و نانوذرات تهیه شده در این تحقیق توسط طیف FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) (Jasco FTIR-410) بررسی شد. نمونه‌ها پودر شد و با KBr مخلوط گردید (۹۵ درصد KBr + ۵ درصد نمونه). در نهایت، قرص تهیه شد و در دستگاه قرار گرفت و طیف جذبی به دست آمد. در این مرحله برای اندازه‌گیری بار سطحی و همچنین، میانگین و توزیع اندازه ذرات از دستگاه زتاسایزر (Zetasizer) از نوع Malvern استفاده شد؛ بدین صورت که ابتدا نانوذرات به صورت سوسپانسیون تهیه گردید و ۱۵ دقیقه در دستگاه سونیکاتور قرار داده شد. سپس، پارامترهای مورد نظر اندازه‌گیری گردید (۲۹، ۲۸). برای تعیین مقدار پروتئین نمونه سم، از روش‌های Bradford و جذب UV استفاده شد (۳۰).

بررسی ظرفیت بارگیری (Loading capacity یا LC) و بازده

بارگیری (Loading efficiency یا LE) زهر

سوسپانسیون نانوذرات کیتوزان حاوی سم به مدت یک ساعت با سرعت $50000 \times g$ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. رسوب حاصل شده جداسازی و Freeze-Dried گردید و وزن رسوبات توسط ترازوی دیجیتال به دقت اندازه‌گیری شد. میزان پروتئین سوپرناتانت به منظور ارزیابی بازده انکپسولاسیون اندازه‌گیری گردید. برای تعیین مقدار پروتئین، روش Bradford و سنجش اسپکتروفوتومتری مورد استفاده قرار گرفت (۳۰). LC و LE زهر با استفاده از دو معادله محاسبه گردید (۳۱).

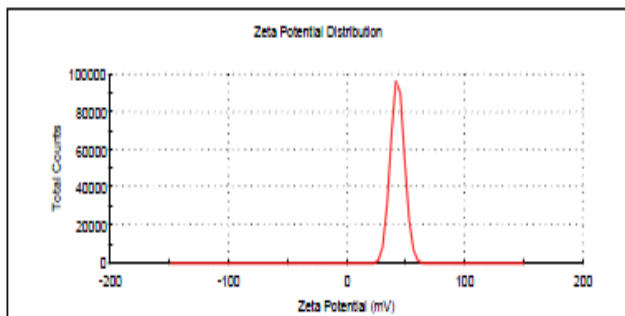
$$\text{معادله ۱} \quad \text{LC} = (A-B)/C \times 100$$

$$\text{معادله ۲} \quad \text{LE} = (A-B)/A \times 100$$

نانوذرات حاوی زهر ۱۲۹ نانومتر، توزیع اندازه ذرات ۰/۴۱۸ و پتانسیل زتای ۴۱/۶ میلی ولت داشتند.

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 42.6	Peak 1: 42.8	100.0	5.75
Zeta Deviation (mV): 5.30	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.623	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

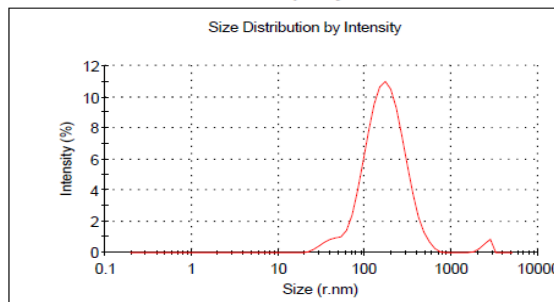
Result quality : Good



(ب)

	Diam. (nm)
Z-Average (r.nm): 138.3	Peak 1: 186.6
Pdi: 0.319	Peak 2: 2507
Intercept: 0.917	Peak 3: 0.000
Cumulants Fit Error: 0.00443	
Multimodal Fit Error: 6.00e-4	

In Range: 96.8 Result quality : Good

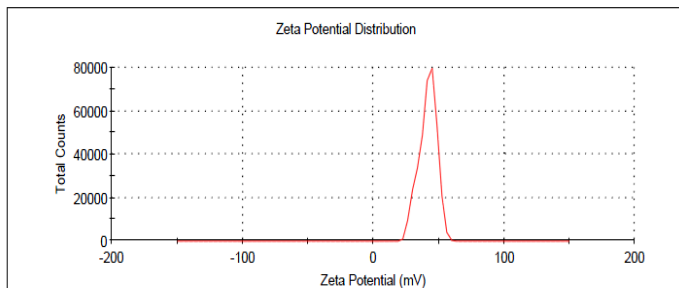


(الف)

شکل ۱. میانگین اندازه، توزیع اندازه (الف) و پتانسیل زتای نانوذرات کیتوزان (ب) (کیتوزان ۲ میلی گرم بر میلی لیتر، تری پلی فسفات ۱ میلی گرم بر میلی لیتر)

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 41.6	Peak 1: 41.7	100.0	6.71
Zeta Deviation (mV): 5.53	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.687	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

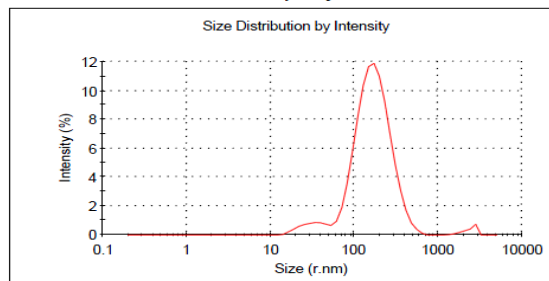
Result quality : Good



(ب)

	Diam. (nm)
Z-Average (r.nm): 129.0	Peak 1: 184.4
Pdi: 0.418	Peak 2: 33.69
Intercept: 0.942	Peak 3: 2377
Cumulants Fit Error: 0.00404	
Multimodal Fit Error: 0.00238	

In Range: 97.6 Result quality : Refer to quality report

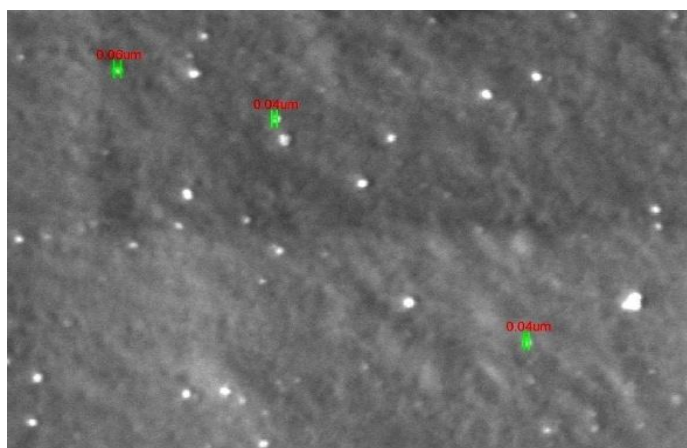


(الف)

شکل ۲. میانگین اندازه، توزیع اندازه (الف) و پتانسیل زتای نانوذرات کیتوزان حاوی زهر (ب) (کیتوزان ۲ میلی گرم بر میلی لیتر، تری پلی فسفات ۱ میلی گرم بر میلی لیتر و زهر افعی قفقازی ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)

بر میلی لیتر و سدیم تری پلی فسفات با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر نشان داده شده است که شکل کروی، سطح صاف و همچنین، عدم تجمع نانوذرات و اندازه ذرات در حدود ۱۳۸ نانومتر مشاهده می گردد.

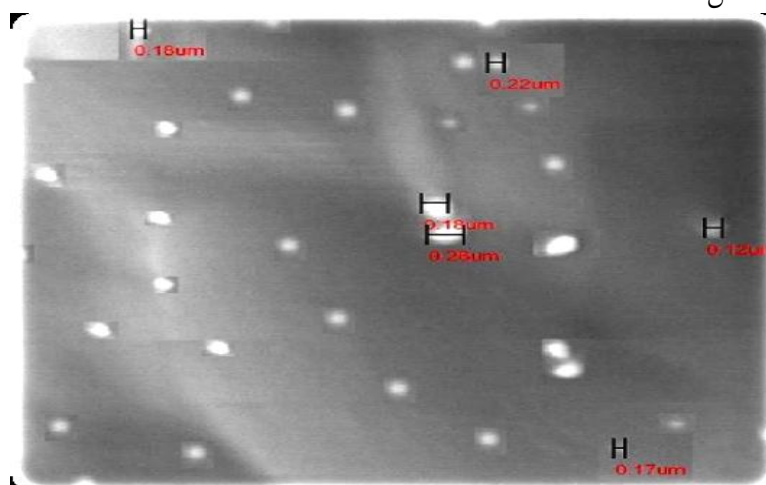
بررسی تصاویر SEM نانوذرات کیتوزان و نانوذرات کیتوزان حاوی زهر ریخت شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. در شکل ۳، تصویر SEM گرفته شده از نانوذرات با غلظت کیتوزان ۲ میلی گرم



شکل ۳. تصویر SEM (Scanning electron microscopy) نانوذرات کیتوزان (کیتوزان ۲ میلی گرم بر میلی لیتر و تری پلی فسفات ۱ میلی گرم بر میلی لیتر)

همان گونه که مشاهده می گردد، نانوذرات دارای سطح صاف، شکل کروی، توزیع اندازه ذره ای مناسب بودند.

تصویر نانوذرات کیتوزان حاوی زهر با غلظت کیتوزان ۲ میلی گرم بر میلی لیتر و سدیم تری پلی فسفات با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر در شکل ۴ نشان داده شده است.



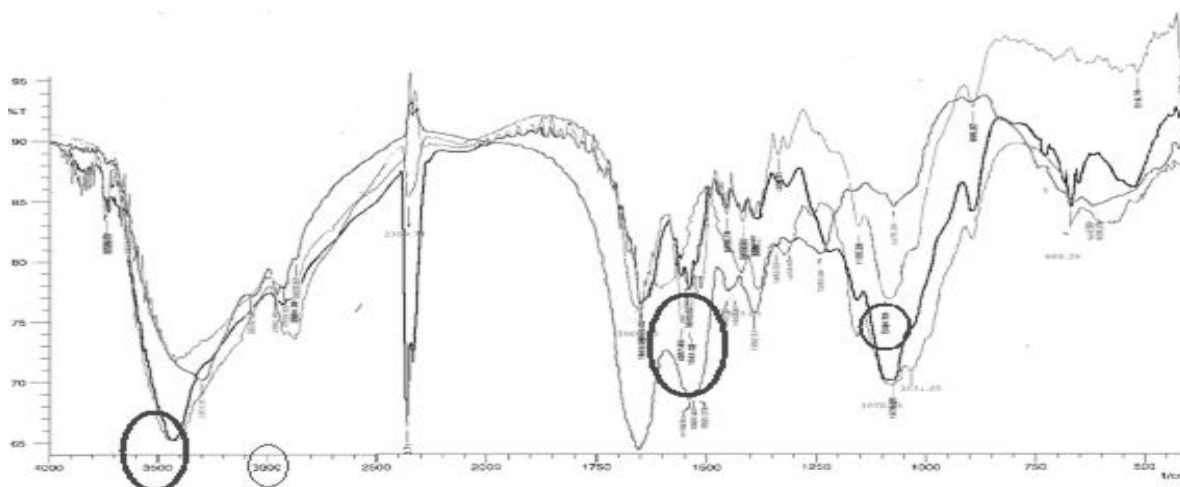
شکل ۴. تصویر SEM (Scanning electron microscopy) نانوذرات کیتوزان حاوی زهر (کیتوزان ۲ میلی گرم بر میلی لیتر، تری پلی فسفات ۱ میلی گرم بر میلی لیتر و زهر افعی قفقازی ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)

مشاهده شد که شامل پیک پهن در محدوده 3500 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی گروه OH، پیک 1660 cm^{-1} مربوط به گروه کربونیل آمیدی و پیک 1078 cm^{-1} مربوط به گروه C-O-C داخل و خارج حلقه ای بود. در نانوذرات کیتوزان نیز پیک های شاخص 1541 cm^{-1} و 1649 cm^{-1}

بررسی ساختار زهر، کیتوزان، نانوذرات کیتوزان و نانوذرات کیتوزان حاوی زهر طیف FTIR زهر افعی قفقازی، کیتوزان، نانوذرات کیتوزان و نانوذرات کیتوزان حاوی زهر در شکل ۵ ارائه شده است. چند پیک شاخص در طیف FTIR کیتوزان

نانوذرات کیتوزان حاوی زهر مار، پیک محدود cm^{-1} $3000-3400$ پهن تر شده است.

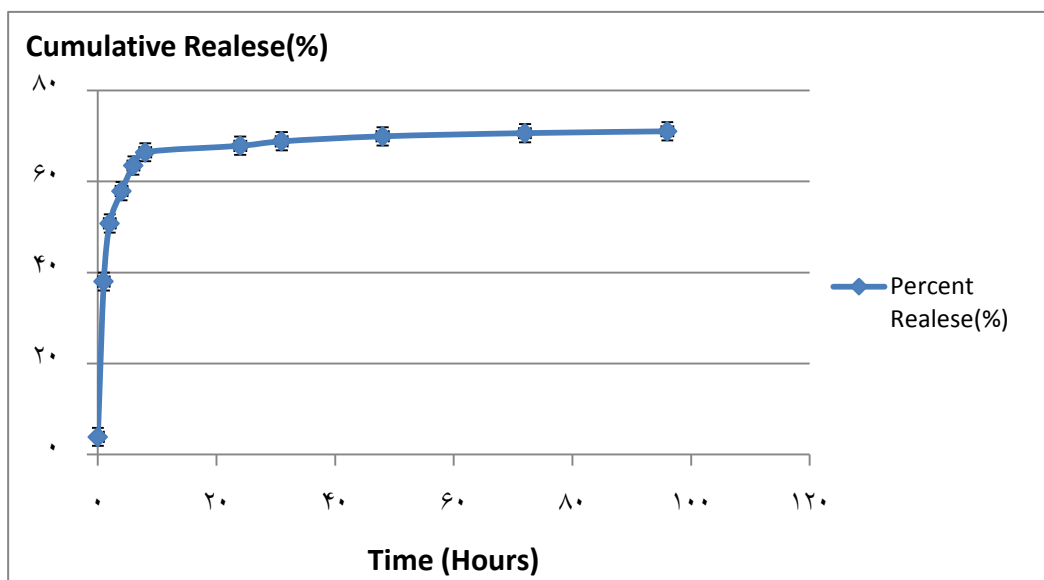
جابه‌جایی پیک $1660 cm^{-1}$ و پهن تر شدن پیک در محدوده $3000-3400 cm^{-1}$ وجود داشت. در طیف FTIR مربوط به



شکل ۵. طیف FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) زهر، کیتوزان، نانوذرات کیتوزان و نانوذرات کیتوزان حاوی زهر

برای LC و LE، 500 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همان‌گونه که در شکل ۶ نشان داده شده است، میزان LC در غلظت بهینه زهر حدود $82 \pm 1/9$ درصد و میزان LE نیز $2/1 \pm$ 88 درصد به دست آمد.

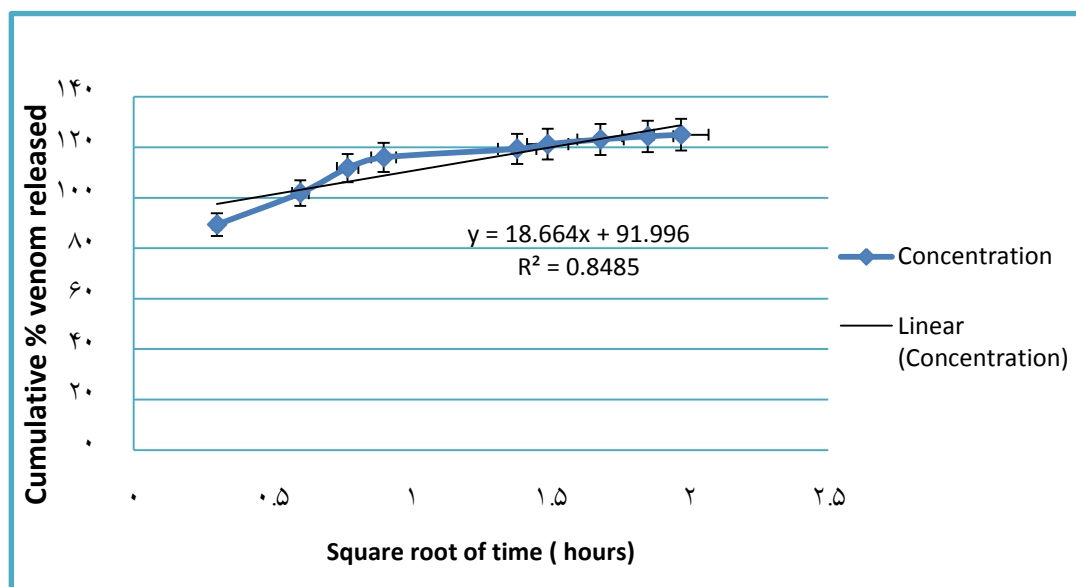
بررسی تأثیر غلظت زهر بر LC و LE نانوذرات غلظت اولیه سم بر میزان LC و LE زهر تأثیرگذار بود. تأثیر غلظت‌های مختلف زهر (100 ، 200 ، 300 ، 400 ، 500 ، 600 ، 700 و 800 میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر خصوصیات ذرات تهیه شده مورد بررسی قرار گرفت و غلظت بهینه



شکل ۶. الگوی آزادسازی نانوذرات حاوی زهر در شرایط آزمایشگاهی

آرامی از نانوذرات آزاد گردید. شکل آزادسازی زهر از نانوذرات نیز از نظر سینتیک درجه صفر، یک و هیگوشی مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به بالا بودن ضریب رگرسیون خطی به دست آمده در شکل رهاسازی، میزان رهایش سم از نانوذرات کیتوزان بیشتر از سینتیک هیگوشی پیروی کرده است (شکل ۷).

بررسی میزان و سینتیک آزادسازی زهر از نانوذرات کیتوزان الگوی آزادسازی نانوذرات حاوی زهر در شرایط آزمایشگاهی در شکل ۶ ارایه شده است. بررسی روند آزادسازی زهر از نانوذرات به صورت دو مرحله‌ای می‌باشد و نشان داد که تا ۸ ساعت اولیه، زهر با سرعت بالایی آزاد شد و بعد از ۸ ساعت (تا ۹۶ ساعت)، تا ۷۰ درصد سم به



شکل ۷. سینتیک آزادسازی نانوذرات حاوی زهر در شرایط آزمایشگاهی بر اساس مدل هیگوشی

گردید، نانوذرات کیتوزان و نانوذرات کیتوزان حاوی زهر مار افعی قفقازی به ترتیب دارای میانگین اندازه ۱۳۸/۳ و ۱۲۹ نانومتر، توزیع اندازه ذرات ۰/۳۱۹ و ۰/۴۱۸ و پتانسیل زتای ۴۲/۶ و ۴۱/۶ میلی‌ولت بودند. بارگیری زهر مار افعی قفقازی منجر به کاهش میانگین اندازه نانوذرات شد که شاید به دلیل کنش متقابل مولکول‌های زهر و پلیمر باشد که منجر به متراکم‌تر شدن و در نتیجه، کاهش میانگین اندازه ذرات می‌شود. افزایش توزیع اندازه ذرات می‌تواند به افزایش ویسکوزیته محیط ساخت نانوذرات به دنبال اضافه شدن زهر مرتبط باشد (۱۱). روند کاهشی در پتانسیل سطح نانوذرات طی مرحله بارگیری، بیانگر این امر است که در شرایط ساخت نانوذرات، مولکول‌های پروتئینی زهر دارای

مطالعات فعالیت زیستی زهر

برای بررسی فعالیت زیستی زهر، درجه سمیت (LD_{50}) آن در موش آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، میزان فعالیت زهر بر اساس LD_{50} حدود ۱۰/۵ میکروگرم به دست آمد. نتایج حاصل شده نشان دهنده سمیت بالای زهر این گونه از مار می‌باشد.

بحث

نانوذرات تهیه شده در شرایط بهینه (کیتوزان با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و Crosslinker با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از نظر میانگین اندازه، توزیع اندازه و پتانسیل سطحی مورد بررسی قرار گرفت. همان‌گونه که بیان

و ناشی از واکنش گروه آمین کیتوزان با گروه کربوکسیل پروتئین‌های سم است.

لازم به ذکر است که غلظت اولیه سم اثرات مهمی بر میزان LC و LE می‌گذارد. نانوذرات تهیه شده در شرایط غلظت زهر ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، مقدار LC ($1/9 \pm$) ۸۲ درصد) و LE ($2/1 \pm$) ۸۸ درصد) بسیار مناسبی را نشان دادند. بنابراین، می‌تواند به عنوان غلظت بهینه زهر برای تهیه نانوذرات حاوی زهر در نظر گرفته شود.

یک سیستم آهسته رهش باید الگوی آزادسازی قابل قبولی داشته باشد. الگوی آزادسازی نانوذرات حاوی زهر در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. بررسی روند آزادسازی زهر از نانوذرات نشان داد که تا ۸ ساعت اولیه، زهر با سرعت بالایی آزاد می‌شود و این امر به دلیل وجود سم در قسمت‌های سطحی نانوذره و داشتن پیوند ضعیف با آن می‌باشد. بعد از ۸ ساعت (تا ۹۶ ساعت)، به دنبال نفوذ آب، تورم و فرسایش نانوذره، تا ۷۰ درصد سم به آرامی از نانوذرات آزاد می‌گردد. در ابتدا سرعت آزادسازی سم زیاد و سرعت تخریب کم است، اما با گذشت زمان به دلیل کاهش غلظت پروتئین سم در نانوذرات، سرعت آزادسازی کاهش می‌یابد و سرعت تخریب در محیط افزایش پیدا می‌کند. بر اساس بررسی ضریب رگرسیون خطی به دست آمده در شکل رهاسازی، میزان رهایش سم از نانوذرات کیتوزان در بیشتر موارد از سینتیک هیگوشی پیروی می‌کند که سینتیک آزادسازی مطلوب برای سیستم‌های آهسته رهش ماتریکسی به شمار می‌رود (۳۴).

با توجه به این که زهر باید سمیت بالایی داشته باشد تا ضرورت تهیه پادزهر علیه آن وجود داشته باشد، سمیت زهر مار افعی قفقازی در این مطالعه به روش درون‌تن بر روی موش آزمایشگاهی و درجه سمیت آن بر اساس LD₅₀ تعیین شد. نتایج میزان فعالیت زهر بر اساس LD₅₀ در حدود ۱۰/۵ میکروگرم برآورد گردید که حاکی از سمیت بالای زهر این مار و ضرورت تهیه پادزهر علیه آن می‌باشد.

بار منفی هستند و با واکنش با گروه‌های آمونوم دارای بار مثبت پلیمر کیتوزان، منجر به کاهش پتانسیل سطحی نانوذرات می‌شوند.

بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی نانوذرات کیتوزان و نانوذرات کیتوزان حاوی زهر نشان داد که نانوذرات در هر دو حالت دارای شکل کروی و سطح صاف بودند و تجمع نانوذرات مشاهده نمی‌شود و توزیع اندازه ذره‌ای مناسب بود. این امر بیان‌کننده شرایط بهینه تولید نانوذرات در غلظت و ویسکوزیته مناسب کیتوزان و همچنین، غلظت مناسب اتصال دهنده سدیم تری پلی فسفات می‌باشد.

ساختار زهر، کیتوزان، نانوذرات کیتوزان و نانوذرات کیتوزان حاوی زهر با تهیه طیف FTIR مورد بررسی قرار گرفت. پیک پهن در محدوده 3500 cm^{-1} در طیف FTIR کیتوزان، مربوط به ارتعاشات کششی گروه OH می‌باشد و باعث همپوشانی با ارتعاشات گروه آمینی موجود در ساختمان کیتوزان شده است. پیک 1660 cm^{-1} مربوط به گروه کربونیل آمیدی است؛ چرا که کیتوزان مورد استفاده در این آزمایش به صورت ۹۵ درصد داستیله شده بود. بنابراین، پیک مشاهده شده قابل قبول می‌باشد که در نانوذرات کیتوزان به دو پیک 1541 cm^{-1} و 1649 cm^{-1} تبدیل شده است. همچنین، پیک 1078 cm^{-1} مربوط به گروه C-O-C داخل و خارج حلقه‌ای قابل مشاهده است (۳۳).

پس از اتصال الکترواستاتیکی بین گروه NH₃ کیتوزان و P=O سدیم تری پلی فسفات به دلیل تغییر در محیط شیمیایی اطراف، گروه آمیدی کیتوزان موجب جابه‌جایی پیک 1660 cm^{-1} می‌شود (۱۱، ۱۴، ۱۵). همچنین، پهن‌تر شدن پیک در محدوده $3000-3400 \text{ cm}^{-1}$ ناشی از افزایش پیوندهای هیدروژنی است و نشان می‌دهد که نانوذرات کیتوزان تشکیل شده‌اند. طیف FTIR مربوط به نانوذرات کیتوزان حاوی زهر مار در محدوده $3000-3400 \text{ cm}^{-1}$ پهن‌تر شده بود که بیانگر افزایش پیوند هیدروژنی می‌باشد

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر نانوذرات کیتوزان حاوی سم مار افعی قفقازی به روش زوج یونی با خصوصیات مطلوب، LC و LE بالا با توانایی حفظ فعالیت بیولوژیکی سم که در سیستم‌های انتقال آنتی ژن و صنعت تولید پادزهر بسیار حایز اهمیت است، با موفقیت تهیه گردید.

سیستم‌های سنتی آنتی ژن رسانی در صنعت تولید پادزهر از نوع امولسیون‌های (Water-in-Oil) W/O می‌باشند که میزان بارگیری پایین دارند و ماهیت روغنی سیستم موجب تخریب بخش قابل توجهی از سم می‌شود. همچنین، به دلیل

پایداری کم، آزادسازی سریع آنتی ژن را به دنبال دارد و انتقال مقدار مورد نیاز آنتی ژن به بدن حیوان نیاز به تکرار تزریق دارد. با توجه به عواملی همچون کمیاب و بسیار با ارزش بودن سم مار افعی قفقازی، تخریب کمتر و حفاظت بهتر فعالیت زهر در نانوذرات نسبت به روش‌های سنتی، آهسته رهش بودن، تکرار تزریق کمتر، عوارض جانبی کمتر برای حیوان، سادگی و هزینه کمتر تولید، این نانوذرات می‌توانند گزینه مناسبی برای جایگزین شدن با سیستم‌های سنتی باشند.

References

- Jain KK. Nanopharmaceuticals. In: Jain KK, Editor. The handbook of nanomedicine. Berlin, Germany: Springer Science & Business Media; 2008. p. 119-60.
- Shahbazi MA, Hamidi M, Peymani P. Interaction of chitosan, a natural polymer used in nanodrug/gene delivery, with Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). *The Internet Journal of Nanotechnology* 2008; 2(2): 1-7.
- Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res* 1998; 15(9): 1326-31.
- Bowman K, Leong KW. Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. *Int J Nanomedicine* 2006; 1(2): 117-28.
- Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release* 2004; 100(1): 5-28.
- Lai WF, Lin MC. Nucleic acid delivery with chitosan and its derivatives. *J Control Release* 2009; 134(3): 158-68.
- Nwe N, Furuike T, Tamura H. The mechanical and biological properties of chitosan scaffolds for tissue regeneration templates are significantly enhanced by chitosan from *Gongronella butleri*. *Materials* 2009; 2(2): 374-98.
- Borges O, Silva M, de Sousa A, Borchard G, Junginger HE, Cordeiro-da-Silva A. Alginate coated chitosan nanoparticles are an effective subcutaneous adjuvant for hepatitis B surface antigen. *Int Immunopharmacol* 2008; 8(13-14): 1773-80.
- Cui Z, Mumper RJ. The effect of co-administration of adjuvants with a nanoparticle-based genetic vaccine delivery system on the resulting immune responses. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 55(1): 11-8.
- Gupta RK, Rost BE, Relyveld E, Siber GR. Adjuvant properties of AL and CA

- compounds. In: Powell M, Newman M, Burdman JR, Editors. Vaccine design: the subunit and adjuvant approach. New York, NY: Plenum Press; 1995. p. 229-48.
11. Mohammadpour dounighi N, Behfar A, Ezabadi A, Zolfagharian H, Heydari M. Preparation of chitosan nanoparticles containing Naja naja oxiana snake venom. *Nanomedicine* 2010; 6(1): 137-43.
 12. Avadi MR, Sadeghi AM, Mohammadpour N, Abedin S, Atyabi F, Dinarvand R, et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine* 2010; 6(1): 58-63.
 13. Rezaei Mokarram A, Alonso M. Preparation and evaluation of chitosan nanoparticles containing Diphtheriatoxid as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *Archives of Razi Institute* 2006; 61(1): 13-25.
 14. Mohammadpour Dounighi N, Eskandari R, Avadi MR, Zolfagharian H, Mir Mohammad Sadeghi A, Rezayat M. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing Mesobuthus eupeus scorpion venom as an antigen delivery system. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2012; 18(1): 44-52.
 15. 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 of Razi Institute* 2012; 67(2): 145-53.
 16. Mohammadpour Dounighi N, Yazdizadeh R, Zolfagharian H. A new antigen delivery vehicle candidate: Orthochirus iranus scorpion venom entrapped in chitosan nanoparticles. *British Journal of Pharmaceutical Research* 2015; 7(4): 264-75.
 17. Ghorban Dadrass O, Mir Mohammad Sadeghi A, Farhangi N, Forouhar N, Mohammadpour N, Avadi MR. Preparation, characterization and in vitro studies of chitosan nanoparticles containing androctonus crassicauda scorpion venom. *Journal of Applied Chemical Research* 2013; 7(3): 35-46.
 18. Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, José Alonso M. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci* 1998; 63(1): 125-32.
 19. Xu Y, Du Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2003; 250(1): 215-26.
 20. Borges O, Borchard G, Verhoef JC, de Sousa A, Junginger HE. Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. *Int J Pharm* 2005; 299(1-2): 155-66.
 21. Farhadian A, Dounighi NM, Avadi M. Enteric trimethyl chitosan nanoparticles containing hepatitis B surface antigen for oral delivery. *Hum Vaccin Immunother* 2015; 1-8.
 22. Pan Y, Li YJ, Zhao HY, Zheng JM, Xu H, Wei G, et al. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan

- nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int J Pharm* 2002; 249(1-2): 139-47.
23. Fernandez-Urrusuno R, Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm Res* 1999; 16(10): 1576-81.
 24. Finney DJ. The median lethal dose and its estimation. *Arch Toxicol* 1985; 56(4): 215-8.
 25. Possani LD, Fletcher PL, Alagon AB, Alagon AC, Julia JZ. Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion, *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicon* 1980; 18(2): 175-83.
 26. Dustgani A, Vasheghani-Farahani E, Imani M. Determination of the optimum conditions for production of chitosan nanoparticles. *Polymer Science and Technology* 2008; 20(5): 457-64.
 27. Domard A. Determination of N-acetyl content in chitosan samples by c.d. measurements. *International Journal of Biological Macromolecules* 1987; 9(6): 333-6.
 28. Harris R, Lecumberri E, Mateos-Aparicio I, Meng-bar M, Heras A. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers* 2011; 84(2): 803-6.
 29. Sarei F, Mohammadpour Dounighi N, Zolfagharian H, Khaki P, Bidhendi SM. Alginate Nanoparticles as a Promising Adjuvant and Vaccine Delivery System. *Indian J Pharm Sci* 2013; 75(4): 442-9.
 30. Saraei F, Mohamadpour Dounighi N, Zolfagharian H, Moradi Bidhendi S, Khaki P, Inanlou F. Design and evaluate alginate nanoparticles as a protein delivery system. *Archives of Razi Institute* 2013; 68(2): 139-46.
 31. Noble JE, Knight AE, Reason AJ, Di Matola A, Bailey MJ. A comparison of protein quantitation assays for biopharmaceutical applications. *Mol Biotechnol* 2007; 37(2): 99-111.
 32. van der Lubben IM, Kersten G, Fretz MM, Beuvery C, Coos VJ, Junginger HE. Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice. *Vaccine* 2003; 21(13-14): 1400-8.
 33. Yuan Q, Shah J, Hein S, Misra RD. Controlled and extended drug release behavior of chitosan-based nanoparticle carrier. *Acta Biomater* 2010; 6(3): 1140-8.
 34. Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm* 2010; 67(3): 217-23.

Preparation and Characterization of *Agkistrodon Halys* Venom Entrapped Chitosan Nanoparticles: Novel and Advanced Antigen Delivery and Adjuvant System

Naser Mohammadpour Dounighi, Ph.D.^{1*}, Mahshid Javadi, M.Sc.², Hossein Zolfagharian, Ph.D.³, Mohammad Reza Awadi, Ph.D.⁴

1. Assistant Professor of Biotechnology, Human Vaccines and Sera Dept, Razi Vaccine and Sera Research Institute, Karaj, Iran
2. Researcher, Pharmaceutical Branch of Islamic Azad University of Tehran, Tehran, Iran
3. Associate professor of Biochemistry, Human Vaccines and Sera Dept, Razi Vaccine and Sera Research Institute, Karaj, Iran.
4. Assistant professor of Pharmaceutics, Research and Development Dept, Hakim Pharmaceutical Company

* Corresponding author; e-mail: nasser_mohammadpour@yahoo.com

(Received: 10 Feb 2015 Accepted: 26 Oct. 2015)

Abstract

Background & Aims: In recent years, the feasibility of hydrophilic nanoparticles has been broadly investigated for use in drug delivery and therapeutic systems. Due to the problems of traditional adjuvants, in this study *Agkistrodon halys* (Ah) Snake venom was loaded in chitosan nanoparticles (CS NPs) in order to be used as an advanced adjuvant and antigen delivery system in antidote production industry.

Methods: CS NPs containing Ah venom were prepared using ionic gelation and crosslinker method. In this study, polymer concentration, cross-linker concentration, particles size, particle size distribution, zeta potential, particles shape and surface characteristics, loading efficiency, loading capacity, and particles structure were optimized.

Results: Optimum concentration achieved were chitosan 2mg/ml and cross-linker 1mg/ml and *Agkistrodon Halys* snake venom 500 mg/ml. Mean particle size, polydispersity index (PDI), and zeta potential of of venom-loaded CS NPs were respectively 129 nm, 0.418 and 41 mV. The loading capacity (LC) and loading efficiency (LE) were 82 ± 1.9 and 88 ± 2.1 , respectively. Fourier transform infrared spectroscopy of nanoparticles showed between chitosan and crosslinker. An initial burst release and second slow release up to 96 hours was observed.

Conclusion: The obtained results suggested that venom-loaded CS NPs could be a suitable alternative to conventional adjuvant for manufacturing antivenom.

Key word: Chitosan, Nanoparticles, *Agkistrodon halys*, Venom, Ionic gelation