

سنتز نانوذرات آلزینات سدیم حاوی سم مار افعی قفقازی (*Agkistrodon halys*) و بررسی فعالیت زیستی و زنده‌مانی سلول‌های سرطان کولون SW-480

سحر سلمانزاده زهکشی^۱ و ناصر محمدپور دونیقی^{۱*}

۱- بخش جانوران سمی و تهیه پادزهر، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، البرز، ایران

*نویسنده مسئول: ناصر محمدپور دونیقی، دکتری تخصصی، nasser_mohammadpour@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱/۳۱ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۳/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۵/۲۴

چکیده

پیشینه مطالعه و هدف: نانوذرات آلزینات بدلیل داشتن خواصی مانند زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب پذیری، مخاط چسبی، غیر سمی بودن بطور گسترده‌ای در سیستم‌های جدید انتقال دارویی مورد استفاده قرار گرفته است. امروزه برای ایمنی‌زایی بر علیه سم مارها انواع مختلفی از ادجوانت‌ها مانند محلول‌ها، سوسپانسیون‌ها و امولسیون‌ها استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه طراحی یک سیستم انتقال آنتی ژن جدید با استفاده از سم مار قفقازی (*Agkistrodon halys*) و نانوذرات آلزینات بود.

روش مطالعه: نانوذرات آلزینات به روش زوج یونی سنتز شد. از تکنیک‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، DLS و طیف‌سنجی FT-IR برای بررسی شکل، اندازه، بار سطحی و ساختار نانوذرات حاوی سم مار افعی قفقازی استفاده شد. رفتار آزاد سازی سم و زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولون SW-480 تیمار شده با نانوذرات حاوی سم نیز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نانوذرات دارای شکل کروی بودند و اتصال آلزینات و کلسیم کلرید بوسیله FT-IR تایید شد. بهینه اندازه نانوذرات آلزینات و نانوذرات آلزینات حاوی سم بترتیب ۱۱۸ و ۱۶۹ نانومتر بود. فعالیت بیولوژیکی سم بعد از فرایند ساخت نانوذرات کاملاً حفظ شد. زنده‌مانی سلول‌های SW-480 تیمار شده با غلظت‌های بالای ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات حاوی سم نسبت به گروه کنترل دچار کاهش معناداری گردید ($P < 0.05$). **نتیجه‌گیری:** نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد که نانوذرات آلزینات می‌تواند جایگزین مناسبی برای ادجوانت‌ها سنتی باشد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات آلزینات، سم مار افعی، ادجوانت‌ها، سلول‌های سرطانی کولون SW-480

می‌باشد. مارگزیدگی خصوصاً در مناطق گرمسیری و نواحی که قطب کشاورزی است به وفور دیده می‌شود. زیرا در این مناطق تعداد زیادی مار در همزیستی با انسان بسر می‌برند. مارگزیدگی از نظر اجتماعی حوادث مختل کننده و کشنده‌ای محسوب می‌شود. ادجوانت‌ها (Adjuvants) در صنعت واکسن‌سازی دارای جایگاه بسیار مهمی هستند. در حال حاضر توجه زیادی از طرف مراجع بین المللی نظیر W.H.O برای جایگزینی ادجوانت‌های سنتی (مانند امولسیون‌های

مقدمه

پادزهرها ابزار اصلی پزشکی در جهت حفاظت از افراد در مقابل با مارگزیده به شمار می‌روند. چنانچه پادزهر سریعاً و به میزان کافی و همچنین با کارایی بالا تأمین گردد، می‌تواند از مرگ افراد جلوگیری کند. تخمین زده می‌شود که سالانه ۵ میلیون مارگزیدگی در سراسر جهان اتفاق می‌افتد که موجب ۱۲۵۰۰۰ مرگ و میر در طول سال

تولید آلژینات از باکتری‌ها برای مصارف تجاری مقرون به صرفه نیست (Bon, 1996).

از نظر ساختاری آلژینات‌ها، پلی ساکاریدهای خطی و غیرمنشعب هستند که از اتصالات ۱ به ۴ ریشه‌های β -D-mannuronic acid (M) و α -L-gluronic acid تشکیل شده است. ترکیب این ریشه‌ها بسیار متغیر است و عامل بخش‌های هوموپلیمریک (پلی-M و پلی-G) و یا هتروپلیمریک (پلی-MG) می‌باشد که به منبعی که آلژینات از آن بدست آمده است بستگی دارد (Freire-Maia et al., 1994). از نظر قابلیت انحلال در آب آلژینات‌ها به دو دسته تقسیم می‌شوند:

۱. آلژینات‌های محلول در آب: مانند آلژینات‌های سدیم، پتاسیم، آمونیوم و منیزیم.

۲. آلژینات‌های نامحلول در آب: مانند کاتیون‌های فلزات سنگین مثل آهن، روی و آلومینیوم.

زهر مار یکی از غنی‌ترین منابع آنزیمی در طبیعت به شمار می‌رود. همچنین این آنزیم حاوی مقادیر مختلفی از ترکیبات پلی پپتیدی هستند ولی تصویر نهایی مسمومیت با سم مار، حاصل فعل و انفعالات پیچیده و برهمکنش بین پلی پپتیدهای زهری با آنزیم‌های مختلف در بدن انسان است. بطور کلی سموم مارهای تیره الاییده شامل مولکول‌های درشت پروتئینی و غنی از آنزیم می‌باشد. از ویژگی‌های این آنزیم‌ها (به شرطی که در شرایط خشک نگهداری شوند) قدرت ثبوت آن‌ها است. بنابر تحقیقات صورت گرفته حدود ۲۰ نوع آنزیم سمی در زهر مارهای جهان موجود است که در هر مار بین ۶ تا ۱۲ نوع از این آنزیم‌ها متغیر است. هر یک از این آنزیم‌ها فعالیت تخصصی خود را برعهده دارند. پاره ای از آنان به هضم کردن کمک می‌کنند در حالیکه بعضی دیگر در فلج کردن طعمه کاربرد دارند. آنزیم‌های دیگری نیز در زهر مارها یافت شده و مورد خالص سازی قرار گرفته است، اما نقش دقیق همگی آنان هنوز به درستی مشخص نشده است.

مار افعی قفقازی گونه‌ای از افعی‌های زهردار هستند که عمدتاً در مناطق کوهستانی دیده می‌شوند. این مار از رده خزندگان (Reptilian)، زیر راسته مارها (Serpentes) و از خانواده افعی‌ها (Caucasian Pitviper) می‌باشد.

در سال ۲۰۰۶ برگس و همکارانش از نانوذرات کیتوزان پوشش‌دار شده با آلژینات برای بارگذاری اوالبومین (Ovalbumin) استفاده کردند. نتایج نشان داد که استفاده پوشش آلژینات سبب افزایش مقاومت نانوذرات در pH ۶/۵ و ۷/۴ در دمای ۳۷ °C شده و از رهائش یکجا (Burst release) که در نانوذرات کیتوزان بدون پوشش دیده می‌شود جلوگیری می‌کند. به علاوه در این تحقیق نشان داده شد که این نانوذرات با وجود بار منفی (حاصل از پوشش آلژینات) از پلاک پیر (Peyer's patches) عبور کرده و می‌توانند روش قابل اطمینانی برای واکسیناسیون موکوزی باشند (Borges et al., 2008).

روغنی) با سیستم‌های آنتی‌ژن رسانی جدید وجود دارند. ادجوانت‌ها مواد تقویت کننده و محرک پاسخ ایمنی می‌باشند که به خودی خود ایمنی‌زا نیستند و مقدار زیادی از آنتی‌ژن را جذب کرده به حالت غیر محلول در می‌آورند و آنتی‌ژن‌های غیر محلول بسیار آهسته فاکوسیت می‌شوند. در حالیکه آنتی‌ژن‌های محلول به آسانی توسط پروتازها تخریب می‌شوند، بنابراین یاورها باعث افزایش جذب آنتی‌ژن و نیز افزایش ماندگاری آن در بدن می‌شوند (Nafian et al., 2020). مکانیسم‌های احتمالی عمل ادجوانت‌ها شامل موارد زیر هستند:

الف- افزایش لنفوسیت‌های مسئول تولید آنتی‌بادی

ب- ایجاد شرایط مناسب برای پردازش آنتی‌ژن

ج- افزایش دوام آنتی‌ژن در بدن فرد ایمن شده

د- افزایش تولید و رها شدن آنتی‌بادی از سلول‌های مولد آنتی‌بادی (Nafian et al., 2020).

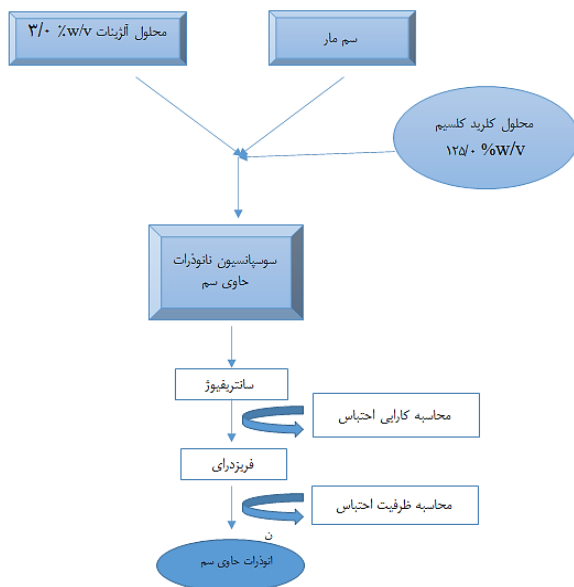
در دهه‌های اخیر استفاده از پلیمرهای طبیعی و سنتزی در تهیه داروها و همچنین به عنوان ادجوانت و حامل در واکسیناسیون گسترش بسیار یافته است. مهمترین ویژگی‌هایی که در انتخاب یک پلیمر مناسب باید مورد توجه قرار بگیرند شامل سمیت و حساسیت‌زایی پلیمر، امکان عبور دارو از ساختار پلیمر، اثر پلیمر بر پاسخ ایمنی، توانایی حفاظت دارو از تخریب، زیست سازگاری و زیست تخریب پذیر بودن پلیمر می‌باشند (Barbadilla Martín, 2017). از جمله معایب آنها گران بودن و محدودیت در حلالیت آنهاست. زیرا اغلب آنها در حلال‌های آلی حل می‌شوند. در مقابل مزیت استفاده از این پلیمرها تکرار پذیری آن هاست، به طوری که می‌توان آنها را به سرعت تخریب و مجدداً به وزن مولکولی و ترکیب پلیمری دلخواه تهیه نمود. نوع دیگری از پلیمرها پلیمرهای طبیعی هستند مانند نشاسته، کیتوزان، ژلاتین و آلژینات. مزایای این پلیمرها شامل قیمت کم، زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و حلالیت در آب است. کیتوزان و آلژینات پلیمرهای مخاط چسب هستند. این دسته از پلیمرها با افزایش زمان ماندگاری آنتی‌ژن در بافت هدف و با تاثیر بر اتصالات محکم بین یاخته‌ای سبب افزایش جذب و فراهمی زیستی واکسن‌ها می‌گردند (Barbadilla Martín, 2017).

آلژینات (Alginate) به عنوان یک جزء ساختاری در جلبک قهوه‌ای دریایی (Phaeophyceae) و نیز به عنوان یک پلی ساکارید کپسولی در برخی باکتری‌ها مانند (*Azotobacter vinelandii*) بطور فراوان یافت می‌شود (Fletcher et al., 1991). در حالیکه امکان تولید آلژینات از هر دو منبع باکتریایی و جلبک وجود دارد اما آلژینات‌هایی که بطور تجاری در دسترس هستند عموماً از جلبک تهیه می‌شود برای سنتز نانوذرات بیشتر از آلژینات موجود در جلبک‌های دریایی استفاده می‌شود. زیرا منبع باکتریایی به دلیل واحدهای ساختمانی سرشار از مانورونیک اسید خاصیت تشکیل ژل بسیار ضعیفی دارد و همچنین

در سال ۲۰۰۶ Ahmad و همکارانش نیز در تهیه نانوذرات حاوی چندین نوع داروی ضد سل از جنس پلیمر آلزینات با ویسکوزیته متوسط و وزن ملکولی کم با پوششی از پلیمر کیتوزان دریافتند که نانوذرات تهیه شده صرفه نظر از داروی محبوس شده، دارای کارایی و ظرفیت احتباس بین ۸۰-۹۰٪ می‌باشد (Ahmad et al., 2006).

کومار و همکارانش در سال ۲۰۱۵ از نانوذرات کیتوزان با وزن مولکولی کم و پوشش داز سدیم آلزینات برای واکنش رسانی خوراکی در موش استفاده کردند. نتایج برون تن این آزمایشات نشان دهنده ی رهایش آهسته واکسن و نتایج تست ELISA خون موش‌های دریافت کننده ی واکسن معرفی کننده روش مطمئن جدیدی در واکنش رسانی بود (Biswas et al., 2015).

در دهه اخیر دارورسانی با استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پیشرفت قابل توجهی داشته است. لذا در این تحقیق تهیه نانوذرات حاوی سم از پلیمر زیست تخریب آلزینات به منظور بهبود بخشیدن به سیستم آنتی ژن رسانی و افزایش کیفیت پادزهر هدف قرار گرفته است.



شکل ۱- طرح شماتیک از مراحل تهیه نانوذرات آلزینات حاوی سم

آماده‌سازی نمونه جهت بررسی مورفولوژی نانوذرات توسط SEM: جهت بررسی مورفولوژی نانوذرات حاوی سم، مقادیر بسیار اندکی از نانوذرات فریزدرای شده توسط سونیکاتور درون ۱ ml مقطر پراکنده شده و سپس مقدار بسیار اندکی از آن بر روی چسب مخصوص قرار داده شد و توسط دستگاه خلأ (SC004, Blazers, W.Germany) بوسیله کاتد طلا-پالادیوم پوشش داده شد و توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفتند.

طیف‌سنجی تبدیل فوریه FT-IR نانوذرات: جهت بررسی پیوندها و گروه‌های عاملی در نانوذرات فاقد سم و حاوی سم و مقایسه آنها با پیوندها و گروه‌های عاملی پلیمر آلزینات از روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه (FT-IR) استفاده گردید. بدین منظور، نمونه نانوذرات فاقد سم و همچنین نانوذرات حاوی سم با در نظر گرفتن کلیه شرایط بهینه ذکر شده در قسمت‌های قبل تهیه گردیده و پس از فریزدرای کردن برای انجام طیف‌سنجی آماده گردیدند. آماده کردن نمونه برای طیف‌سنجی مادون قرمز بدین صورت انجام گرفت که پودر آلزینات و نمونه فریزدرای شده هریک از نانوذرات به طور جداگانه با برومور پتاسیم پودری مخلوط شده و تحت فشار قرار داده شدند. برومور پتاسیم تحت فشار ذوب گشته و ترکیب مورد نظر را بصورت ماتریس در می‌آورد.

روش مطالعه

مواد: سم مار افعی قفقازی (*Agkistrodon halys*) از موسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه شد. رده سلولی فیبروبلاست پوست انسانی (HDF) از بانک سلولی موسسه سرم سازی رازی (ایران) تهیه شد. پنی سیلین (Penicilin) و استرپتومایسین (Streptomycine) از شرکت Invitrogen (آمریکا) خریداری شدند محیط کشت DMEM و سرم جنین گاوی (FCS: Fetal calf Serum) از شرکت Gibco-Invitrogen (آمریکا) خریداری شدند. کیت سنجش LDH از شرکت پارس آزمون خریداری شد. آلزینات سدیم و تریپسین (Trypsin-EDTA, 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium) از شرکت سیگما آلدریج (آمریکا) خریداری شدند.

روش مطالعه

تهیه محلول آلزینات: برای تهیه محلول ۰/۳٪ آلزینات، ۰/۳g آلزینات سدیم اندازه‌گیری و در ۱۰۰ ml آب مقطر حل شد و به مدت ۲۴ ساعت روی همزن مغناطیسی قرار داده شد و بخوبی همزده شد، سپس pH محلول حاصل در محدوده ۷/۷ تنظیم شد و در یخچال نگه داری گردید.

تهیه نانوذرات حاوی غلظت‌های مختلف سم مار افعی قفقازی: غلظت‌های مختلف سم (۱۰۰۰، ۷۵۰، ۶۰۰، ۵۰۰ μg/ml) در نظر گرفته شد. برای هر یک از غلظت‌های ذکر شده بدین ترتیب عمل شد که ۱۰ میلی‌لیتر از محلول آلزینات حاوی سم تهیه گردید و در حالیکه در حال هموژن شدن با همزن مغناطیسی با سرعت ۱۲۰۰ rpm بود، ۴ میلی‌لیتر از محلول کلرید کلسیم به

۴ میلی‌لیتر از محلول کلرید کلسیم به

کوماسی G-۲۵۰ قرار گرفت، سپس وزن مولکولی پروتئین‌ها نسبت به استاندارد مقایسه کرده و محاسبه شدند.

بررسی بقای سلولی با استفاده از روش MTT: تخمین درصد حیات سلولی با استفاده از پروتکل استاندارد روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت پلیت‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکترومتر خوانده شد. میانگین درصد زنده‌مانی سلول‌ها به منظور بررسی اثر نانوذرات حاوی سم بر روی سلول‌ها مقایسه شد و درصد مرگ سلول‌ها در برابر غلظت نانوذرات رسم شد. درصد مرگ سلولی به شرح زیر محاسبه شد (Adamian et al., 2021):

$$\% \text{ Cytotoxicity} = 1 - \left[\frac{(\text{OD extract treated} - \text{OD blank})}{(\text{OD control} - \text{OD blank})} \right] \times 100$$

آنالیزهای آماری: با توجه به اینکه گروه‌های مورد آزمایش، مستقل هستند از روش One-Way ANOVA داده‌ها مورد آنالیز قرار گرفت و برای مقایسه بین گروهی داده‌ها از تست Tukey استفاده شد و $P < 0.05$ اختلاف معنادار در نظر گرفته شده است.

نتایج

طیف‌سنجی FT-IR نانوذرات آلژینات حاوی سم: جهت بررسی پیوندها و گروه‌های عاملی ایجاد شده در نانوذرات فاقد سم و نانوذرات حاوی سم و مقایسه آنها با پیوندها و گروه‌های عاملی پلیمر آلژینات از روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه FT-IR استفاده گردید. بدین منظور، نمونه نانوذرات فاقد سم و همچنین نانوذرات حاوی سم تهیه گردیده و پس از فریز درای کردن و آماده‌سازی در یک نگاهدارنده در دستگاه طیف‌سنج قرار داده شدند. طیف‌های بدست آمده در شکل ۲ آمده است. عموماً در کلیه طیف‌های مادون قرمز محدوده $2000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات کششی گروه‌های OH و پیوندهای CH است. با توجه به طیف آلژینات سدیم محدوده $3300 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات کششی OH و باندهای هیدروژنی درون مولکولی است. با مقایسه طیف حاصل از آلژینات و نانوذرات فاقد سم آلژینات در این محدوده مشاهده می‌گردد که پیک ایجاد شده در طیف فاقد سم گسترده‌تر شده است. همچنین این پیک در طیف حاصل از نانوذرات حاوی سم نسبت به نانوذرات فاقد سم پهن‌تر شده است (شکل ۲).

پیک‌های ناحیه $1700 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات متقارن و نامتقارن گروه‌های C=O است. در طیف مربوط به آلژینات پیک ایجاد شده در حدود 1628 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی متقارن گروه‌های کربوکسیل می‌باشد. در مقایسه این پیک با طیف نانوذرات فاقد سم مشاهده می‌شود که این پیک گسترده‌تر شده است. همچنین پیک ذکر

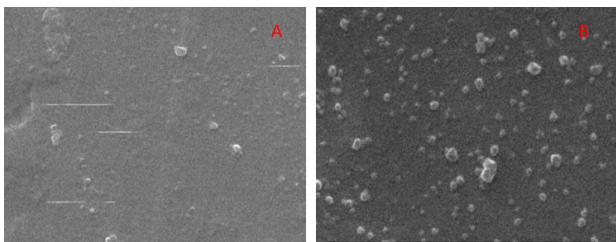
نمونه‌ها بصورت قرص KBr در یک نگاه دارنده در دستگاه طیف‌سنج قرار داده شدند و نتایج حاصل مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مطالعه تاثیر سرعت هموژنیزاسیون بر خصوصیات نانوذرات: پس از بدست آوردن غلظت‌های مناسب جهت تهیه نانوذرات، در مراحل مستقل محلول کلرید کلسیم به صورت قطره قطره به محلول آلژینات که در حال هموژن شدن با سرعت 1300 rpm ، 1200 ، 800 ، 600 بود، اضافه شد. در هر مرحله سوسپانسیون حاصل به مدت ۴۵ دقیقه هموژن شده و پس از آن سوسپانسیون حاوی نانوذرات به مدت ۴۵ دقیقه با سرعت 24000 rpm سانتریفیوژ گردید. رسوب ذرات پس از جمع‌آوری فریزدرای گردیده و از نظر مورفولوژی، توزیع اندازه ذرات و بازده وزنی بررسی شدند.

مطالعات برون تن روند آزادسازی سم از نانوذرات آلژینات: جهت مطالعه آزادسازی سم از نانوذرات آلژینات از بافر PBS با pH ۷/۴ استفاده گردید. بدین منظور نانوذرات خشک شده در دسیکاتور، به دقت به قسمت‌های ۰/۵ میلی گرم و درون لوله‌های در پیچ دار قرار داده شد. سپس به هر یک از لوله‌ها ۰/۵ میلی لیتر از بافر فسفات سالین افزوده شد و در دمای 37°C درون شیکر انکوباتور قرار داده شدند. پس از آن در زمان‌های ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۲۴، ۳۰، ۴۸، ۷۵ و ۹۶ ساعت نمونه‌گیری انجام گردید و در نهایت درصد آزاد سازی سم به صورت تجمعی محاسبه شد. جذب پروتئین حاصل از رهاسازی سم از نانوذرات، توسط دستگاه UV در محدوده جذب 591 nm اندازه‌گیری شد.

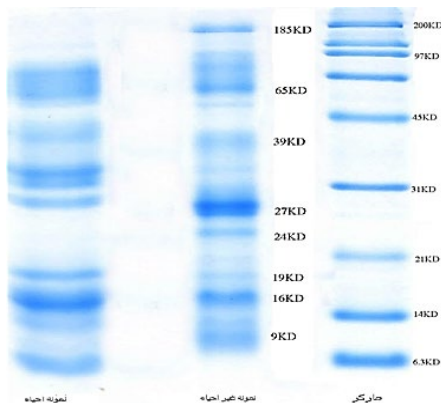
الکتروفورز (SDS-PAGE) سم مار افعی قفقازی: آماده‌سازی نمونه به این صورت انجام شد که نمونه و بافر نمونه (در داخل میکروتیوپ) به نسبت ۲:۱ به یکدیگر افزوده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در آب در حال جوش قرار گرفت. پس از تهیه ژل‌ها، ابتدا ژل جداکننده در فضای دو شیشه الکتروفورز که قبلاً آماده شده و با آب مقطر آزمایش شده بود، ریخته شده و روی آن با آب مقطر پوشانده شد. بعد از بسته شدن ژل و حذف آب موجود، ژل متراکم کننده ریخته شده و بلافاصله شانه داخل ژل قرار داده شد. بعد از بسته شدن ژل متراکم کننده، نمونه‌ها (مارکر به مقدار ۷ میکرولیتر و نمونه سم به مقدار ۳۰ میکرولیتر) داخل چاهک‌ها به آرامی ریخته و کل مجموعه داخل تانک بافر قرار گرفت. جریان برق با ولتاژ ۱۰۰ ولت و ۱۳ دقیقه برای ژل متراکم کننده و ۷۰ ولت و ۱۳۶ دقیقه برای ژل جداکننده آغاز شد. بعد از رسیدن نمونه‌ها به انتهای ژل، جریان برق قطع و ژل از فضای دو شیشه خارج گردید سپس ژل بالا بریده شد و به مدت ۲ ساعت داخل فیکساتور قرار داده شد. بعد از این مرحله ژل به مدت ۱۲ ساعت در داخل محلول رنگ

غلظت 0.125 mg/ml ، دارای متوسط اندازه 272 nm و توزیع اندازه ذرات (PDI) 0.359 بود. نانوذرات آلژینات حاوی سم با غلظت فوق دارای متوسط اندازه 169 nm و توزیع اندازه ذرات (PDI) 0.274 بودند. نانوذرات آلژینات حاوی سم با غلظت فوق در شرایط پایداری بعد از ۳ ماه دارای اندازه 237 nm و توزیع اندازه ذرات (PDI) 0.547 بودند. براساس مطالعات انجام شده در راستای اندازه‌گیری پتانسیل سطح نانوذرات شاهد، همچنین نانوذرات حاوی سم با غلظت $600 \mu\text{g/ml}$ مشاهده شد که پتانسیل سطح نانوذرات شاهد دارای بار سطحی در حدود 31.6 mv - و پتانسیل سطح نانوذرات حاوی سم دارای بار سطحی در حدود 29.4 mv - بودند.



شکل ۳- تصویر SEM نانوذرات آلژینات (A) و نانوذرات آلژینات حاوی سم (B)

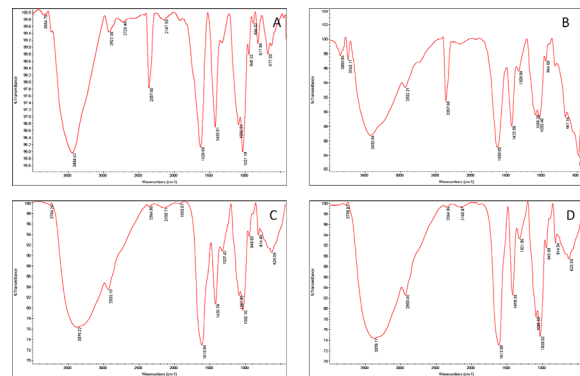
الکتروفورز SDS-PAGE سم مار افعی قفقازی: جهت
الکتروفورز SDS-PAGE از ژل 15% و 4% پلی آکریل آمید استفاده شد که بر اساس مارکر، سم مار تقریباً هشت قسمت با وزن‌های مولکولی در حدود $9, 16, 19, 24, 27, 39, 65$ و 185 کیلوالتون را نشان داد (شکل ۴). با توجه به مشخص بودن وزن مولکولی باندهای مارکر (پروتئین استاندارد)، با محاسبه دقیق میزان R_f (فاصله پیموده شدن هریک از 7 باند مارکر، نسبت به فاصله پیموده شده ی رنگ برموفنول بلو) از روی ژل (شکل ۴) و لگاریتم وزن مولکولی هریک از باندها جدول ۲ بدست آمد.



شکل ۴- الکتروفورز SDS-PAGE سم مار افعی قفقازی در شرایط احیایی و غیر احیایی

شده در طیف نانوذرات حاوی سم نسبت به نانوذرات فاقد سم، پهن تر شده است. علاوه بر این در نزدیکی 1420 cm^{-1} پیک ایجاد شده مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن گروه‌های COO^- است که این پیک نیز در طیف نانوذرات فاقد سم و حاوی سم قوی تر شده است. منطقه cm^{-1} $1400-1000$ مربوط به گروه‌های کربوکسیلات است. در طیف‌های موجود پیک مربوط به گروه‌های کربوکسیلات در حدود طول موج cm^{-1} 1300 می‌باشد که در این پیک نانوذرات فاقد سم و حاوی سم قوی تر شده است.

محدوده بین $1100-1000 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوندهای کششی متقارن C-O-C است. در مقایسه سه طیف موجود مشاهده می‌شود که تراکم این پیوندها در نانوذرات حاوی سم نسبت به پلیمر آلژینات و نانوذرات فاقد سم افزایش یافته است. با مقایسه این سه طیف مشاهده می‌شود که در شدت پیک‌های تشکیل شده در ناحیه‌های مختلف تغییراتی ایجاد شده است که نشان دهنده تغییرات پیوندها و گروه‌های عاملی است.

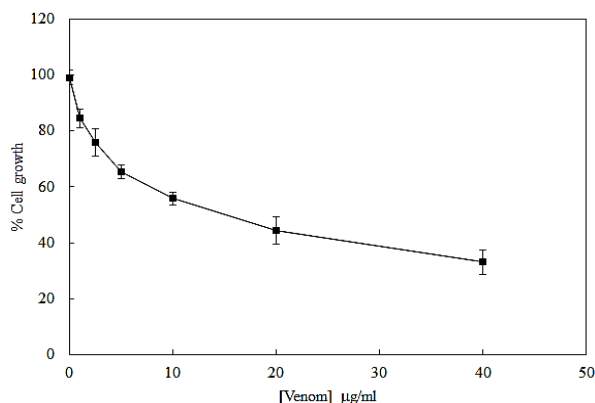


شکل ۲- طیف FT-IR پلیمر آلژینات سدیم (A)، نانوذرات پلیمر آلژینات سدیم (B)، نانوذرات آلژینات حاوی سم مار افعی قفقازی (Venom) (C) و نانوذرات آلژینات حاوی سم مار افعی قفقازی (Venom) $600 \mu\text{g/ml}$ (D) در شرایط پایداری بعد از سه ماه.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM نانوذرات آلژینات حاوی سم: پس از آنکه نانوذرات بارگیری شده تهیه شدند از لحاظ ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. شکل ۳ تصویر SEM گرفته شده از نانوذرات آلژینات با غلظت 0.3 mg/ml و کلرید کلسیم 0.125 mg/ml می‌باشد که دارای شکل کروی، سطح صاف و اندازه در حدود 118 نانومتر می‌باشد.

اندازه و پتانسیل سطح نانوذرات آلژینات حاوی سم: برای بررسی فراوانی و توزیع اندازه ذره‌ای، از پراش نور پویا (DLS) استفاده شد. همچنین با این روش فراوانی و توزیع اندازه ذره‌ای نانوذرات حاوی سم ارزیابی شد. نانوذرات آلژینات با غلظت 0.3 mg/ml و

مصرف شوند و همچنین تحریک کمتری در محل تزریق ایجاد کنند. خواص این نانوذرات به گونه ای است که با طراحی انواع مختلف آنها می توان نحوه برداشت آنتی ژن توسط سیستم ایمنی و پاسخ دلخواه را در بدن ایجاد نمود (Tokumitsu *et al.*, 1999). نانوذرات دارای کاربردهای مختلفی در پزشکی و دارورسانی می باشند. یکی از کاربردهای مهم نانوذرات، استفاده از آنها به عنوان حامل و ادجوانت در سیستم های آنتی ژن رسانی می باشد (Van der Lubben *et al.*, 2001).



نمودار ۲- مقایسه اثرات غلظت های مختلف نانوذرات آلژینات حاوی سم مار افعی قفقازی بر رده سلولی سرطانی کولون SW-480 ($P < 0.05$).

ادجوانت ها ترکیباتی هستند که به فرمولاسیون آنتی ژن ها در صنعت تولید پادزهر اضافه شده و پاسخ ایمنی را افزایش می دهند. این مواد امکان استفاده از دوز کمتر آنتی ژن به منظور ایجاد پاسخ ایمنی بالا را فراهم می کنند (Vila *et al.*, 2004). در حال حاضر راهبردهای صرفه جویی از آنتی ژن توسط همه تولیدکنندگان دنبال می شود. ادجوانت ها که امروزه به صورت سنتی استفاده می شوند دارای معایبی همچون عدم پایداری و تجزیه سریع پس از تزریق و همچنین دارای فرآیند تولید هزینه بر و وقت گیر می باشد (Wang *et al.*, 2009). به نظر می رسد نانوذرات بتوانند در آینده ای نه چندان دور جایگزین مناسبی به عنوان حامل و ادجوانت در سیستم آنتی ژن رسانی و صنعت تولید پادزهر و واکسن سازی باشند.

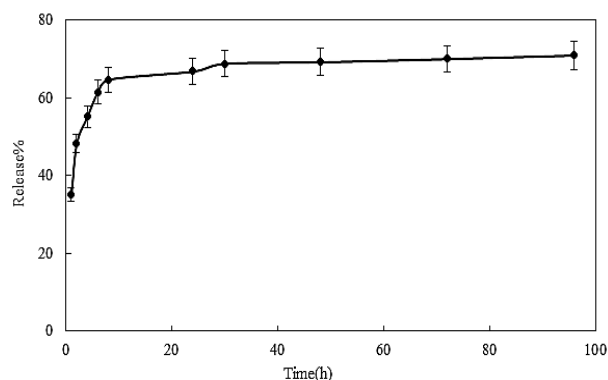
در این مطالعه نانوذرات آلژینات به منظور کاربرد به عنوان ادجوانت و حامل سم در تولید پادزهر سم مار افعی قفقازی تهیه گردید. نتایج بدست آمده نشان می دهد این نانوذرات دارای شکل کروی، اندازه و پتانسیل سطح مناسب می باشند. در سیستم های سنتی تولید پادزهر از امولسیون های W/O استفاده می شود که دارای میزان بارگیری پایین بوده و ماهیت روغنی سیستم موجب می شود مقداری از سم تلف شود. همچنین این مواد پایداری کمی دارند و سریع آنتی ژن را تخلیه می کنند از طرفی برای حفظ میزان آنتی ژن نیاز به تکرار تزریق دارند. از طرفی تهیه سم فرایندی خطرناک، هزینه بر و وقت گیر است. نتایج بارگیری

جدول ۲- R_f مربوط به هر یک از باندهای مارکر و محاسبه \log وزن مولکولی

D (mm)	R_f	M (KD)	$\log M$
۲۱	۰/۱۵۵	۲۰۰	۲/۳۰۱۳
۳۲	۰/۲۳۷	۹۷	۰/۹۸۶۷
۵۲	۰/۳۸۵	۴۵	۱/۶۵۳۲
۷۸	۰/۵۷۷	۳۱	۰/۴۹۱۳
۱۰۰	۰/۷۴۰	۲۱	۱/۳۲۲۲
۱۱۹	۰/۸۸۱	۱۴	۱/۱۴۶۱
۱۳۵	۱	۶/۳	۰/۷۹۹۳

مطالعات برون تن روند آزادسازی سم از نانوذرات آلژینات:

جهت مطالعه آزادسازی سم از نانوذرات آلژینات از بافر PBS با pH ۷/۴ استفاده گردید. پس از آن در زمان های ۱، ۲، ۴، ۸، ۲۴، ۳۰، ۴۸، ۷۵ و ۹۶ ساعت نمونه گیری انجام گردید و در نهایت درصد آزادسازی سم به صورت تجمعی محاسبه شد. نمودار ۱ آزادسازی سم مار افعی از نانوذرات را نشان می دهد (آزمایش ۳ بار تکرار شده است).



نمودار ۱- رهایش سم مار افعی قفقازی از نانوذرات آلژینات در شرایط *in vitro*

بررسی بقای سلولی با آزمون MTT: نتایج حاصل از آزمون MTT گویای عدم القای مرگ سلولی ناشی از تیمار نانوذرات آلژینات حاوی سم مار قفقازی در سلول های سرطانی کولون SW-480 می باشد. کاهش معنی دار درصد زندهمانی در محدوده غلظت های بالای ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر نشان داد (نمودار ۲).

بحث

به طور کلی می توان بیان کرد که سیستم دارورسانی نانوذره ای نسبت به سایر سیستم های ذره ای عملکرد بهتری در داخل بدن دارند. اندازه آنها این اجازه را می دهد که از طریق وریدی، عضلانی و زیرجلدی

نانوذرات آلزینات نشان می‌دهد که این نانوذرات دارای پتانسیل بالایی در بارگیری سم مار افعی قفقازی می‌باشند. در سال ۱۹۹۹ Ana Blandino و همکارانش، تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم آلزینات و کلسیم کلرید بر خصوصیات نانوذرات را بررسی کرده و دریافتند که با افزایش غلظت آلزینات ضخامت و انسجام ذرات کاهش می‌یابد. زیرا با افزایش تعداد واحدهای پلیمر در محلول جایگاه‌های لازم جهت باند شدن با کلسیم کلرید افزایش یافته و تکه‌های ژل مانند غلیظی ایجاد می‌شود. همچنین دریافتند که با افزایش غلظت کلسیم کلرید ضخامت لایه تشکیل شده در نانوذرات نیز افزایش می‌یابد (Blandino *et al.*, 1999).

Ganeshchandra و همکارانش در سال ۲۰۰۷، در تهیه نانوذرات آلزینات حاوی داروی gliclazide دریافتند که افزایش غلظت آلزینات و کلرید کلسیم باعث ایجاد توده‌های تجمع یافته‌ای از قطعات ژله‌ای می‌شود و همچنین با افزایش سرعت هموژنیزاسیون سایز نانوذرات کوچکتر شده و همچنین با افزایش زمان هموژنیزاسیون در تهیه نانوذرات از ۱۵ دقیقه به ۶۰ دقیقه، کاهش بسیار اندکی در سایز نانوذرات ایجاد شده که قابل اغماض می‌باشد. در حالیکه هموژنیزاسیون بیشتر از ۶۰ دقیقه هیچ گونه تغییری در شکل و اندازه ذرات ایجاد نمی‌کند که با نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر همخوانی دارد (Sonavane and Devarajan, 2007).

در مطالعه حاضر نیز با افزایش زمان هموژنیزاسیون تا ۴۵ دقیقه، شکی ذرات منظم‌تر شده و اندازه ذرات کوچکتر می‌شوند در حالیکه بین شکل و اندازه ذرات پس از ۴۵ و ۶۰ دقیقه هموزن شدن تفاوتی مشاهده نشد. در سال ۲۰۱۰ محمدپور و همکارانش در مؤسسه تحقیقات و سرم سازی رازی نانوذرات کیتوزان حاوی سم مار کبری را تهیه و ارزیابی کردند. در این تحقیق از کیتوزان با وزن مولکولی پایین و بالا جهت تهیه نانوذرات استفاده شد. اندازه نانوذرات بدست آمده در این پژوهش بین ۱۵۰-۱۲۰ nm گزارش شده است (Mohammadpourounighi *et al.*, 2010). در سال ۲۰۱۵ محمدپور و همکارانش روی تهیه نانوذرات کیتوزان حاوی زهر مار جعفری در مقیاس آزمایشگاهی کار کردند. در این پژوهش از کیتوزان با وزن مولکولی پایین استفاده شده بود. نانوذرات کیتوزان حاوی سم مار با روش ژلاسیون یونی تهیه شد. اندازه نانوذرات کیتوزان و نانوذرات حاوی سم بترتیب ۸۹ nm و ۱۱۶ و غلظت بهینه سم بارگیری شده در آنها ۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ بود (poMohammadur Dounighi *et al.*, 2015). حقیقی دیگر محمدپور و همکارانش در سال ۲۰۱۳ از نانوذرات آلزینات ساخته شده با روش ژل شدن یونی استفاده کردند و نانوذراتی با اندازه میانگین مطلوب تهیه کردند. آزمایش نانوذرات حاصل بر روی خوکیچه هندی نشان داد که ایمنی هومورال بهتری نسبت به واکسن سنتی ایجاد می‌شود (Sarei *et al.*, 2013).

در سال ۲۰۱۳ محمدپور و همکارانش در مؤسسه تحقیقات سرم و واکسن رازی از نانوذرات آلزینات حاوی این پپتید برای آزمایشات برون تن روی سلول‌های HEp-2 استفاده کردند؛ نانوذرات حاصل از این آزمایش ظرفیت بارگیری بالا و رهايش آهسته را نشان دادند که به طور مؤثری تکثیر رده سلولی HEp-2 در محیط برون تن را متوقف کرد و ممکن است بتوان از آن به عنوان ماده‌ای ارزشمند در جهت مقابله با سرطان در انسان نام برد (Borumand, 2013). در تحقیقی دیگر در سال ۲۰۱۳ ای.پی.بگر و همکارانش از نانوذرات کیتوزان پوشش دار شده با آلزینات برای دارورسانی دهانی اناکساپارین (Enoxaparin) استفاده کردند. این محققین نشان دادند پوشش‌دار شدن نانوذرات با پلیمر آلزینات اندازه ذرات تهیه شده به روش ژل شدن یونی را از ۲۱۳ به ۳۵۵ nm افزایش می‌دهد. نتایج نشان داد پوشش آلزینات پروفایل رهايش این دارو و دسترسی زیستی آن را بهبود می‌بخشد (Bagre *et al.*, 2013).

در فرآیند تولید پادزهر آهسته رهش بودن آنتی‌ژن (سم مار) از نانوذره به منظور افزایش تحریک سیستم ایمنی حیوان و در نتیجه افزایش تولید پادزهر حائز اهمیت می‌باشد. نتایج میزان آزادسازی سم از نانوذرات آلزینات نشان می‌دهد که این نانوذرات مزیت بالاتری نسبت به سیستم‌های سنتی دارند. همچنین نتایج مربوط به بقای سلولی نیز نشان داد نانوذرات در غلظت‌های پایین غیر سمی بوده و جهت استفاده در مصارف پزشکی بسیار مفید است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش از نانوذرات آلزینات حامل سم مار افعی قفقازی با خصوصیات مطلوب بعنوان حامل یا ادجوانت (سیستم انتقال ژن) تهیه شده است. با توجه به نتایج بدست آمده از میزان بارگیری مناسب توسط نانوذرات آلزینات و همچنین کمیاب بودن سم مار افعی قفقازی و تلف شدن کمتر سم نسبت به روش‌های سنتی، آهسته رهش بودن (که فاکتوری مهم در ایمنی‌زایی بشمار می‌رود) و همچنین تکرر تزریق کمتر به خاطر حفظ میزان دوز سم و عوارض جانبی کمتر برای حیوان و همچنین سادگی تولید نانوذرات و کاهش هزینه، این نانوذرات می‌توانند کاندید مناسبی برای جایگزینی سیستم‌های سنتی باشند. همچنین از مزایای دیگر این روش می‌توان به حفظ شدن فعالیت بیولوژیکی سم در حد قابل قبول اشاره کرد که در سیستم انتقال آنتی‌ژن و صنعت تولید پادزهر بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

تقدیر و تشکر

از حمایت مالی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

مراجع

- Adamian, M., Hekmat, A. and Hajebrahimi, Z. 2021. The impacts of simulated microgravity on the cell viability and claudin-1 and claudin-3 expression of mcf-7 breast cancer cells. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 32(2): 105-114.
- Ahmad, Z., Pandey, R., Sharma, S. and Khuller, G. 2006. Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: Formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potential. *Indian journal of chest diseases and allied sciences*, 48(3): 171.
- Bagre, A.P., Jain ,K. and Jain, N.K. 2013. Alginate coated chitosan core shell nanoparticles for oral delivery of enoxaparin: In vitro and in vivo assessment. *International journal of pharmaceutics*, 456(1): 31-40.
- Barbadilla Martín, M. 2017. Utilización de quitosano en sistemas gastrorretentivos.
- Biswas, S., Chattopadhyay, M., Sen, K.K. and Saha, M.K. 2015. Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice. *Carbohydrate polymers*, ۱۲۱: ۴۰۳-۴۱۰.
- Blandino, A., Macias, M. and Cantero, D. 1999. Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and cacl2 concentration on gelation kinetics. *Journal of bioscience and bioengineering*, 88(6): 686-689.
- Bon, C. 1996. The serum-therapie was discovered 100 years ago. *Toxicon*, 2(34): 142-143.
- Borges, O., Cordeiro-da-Silva, A., Tavares, J., Santarém, N., de Sousa, A., Borchard, G. and Junginger, H.E. 2008. Immune response by nasal delivery of hepatitis b surface antigen and codelivery of a cpg odn in alginate coated chitosan nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(2): 405-416.
- Borumand, M.R. 2013. Preparation and characterization of sodium alginate nanoparticles containing icd-85 (venom derived peptides). *International journal of innovation and applied studies*, 4(3): 534-542.
- Fletcher, J.E., Jiang, M.-S., Gong, Q.-H., Yudkowsky, M.L. and Wieland, S.J. 1991. Effects of a cardiotoxin from naja naja kaouthia venom on skeletal muscle: Involvement of calcium-induced calcium release, sodium ion currents and phospholipases a2 and c. *Toxicon*, 29(12): 1489-1500.
- Freire-Maia, L., Campos, J. and Amaral, C. 1994. Approaches to the treatment of scorpion envenoming. *Toxicon*, 32(9): 1009-1014.
- Mohammadpourounghi, N., Behfar, A., Ezabadi, A., Zolfagharian, H. and Heydari, M. 2010. Preparation of chitosan nanoparticles containing naja naja oxiana snake venom. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1): 137-143.
- Nafian, F., Nafian, S. and Kamali Doust Azad, B. 2020. Regulatory and biosafety challenges for vaccines. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 14(1): 17-29.
- poMohammadur Dounighi, N., Mehrabi, M., Avadi, M., Zolfagharian, H. and Rezayat, M. 2015. Preparation, characterization and stability investigation of chitosan nanoparticles loaded with the echis carinatus snake venom as a novel delivery system. *Archives of Razi Institute*, 70(4): 269-277.
- Sarei, F., Dounighi, N.M., Zolfagharian, H., Khaki, P. and Bidhendi, S.M. 2013. Alginate nanoparticles as a promising adjuvant and vaccine delivery system. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(4): 442.
- Sonavane, G.S. and Devarajan, P.V. 2007. Preparation of alginate nanoparticles using eudragit e100 as a new complexing agent: Development, in-vitro, and in-vivo evaluation. *Journal of biomedical nanotechnology*, 3(2): 160-169.
- Tokumitsu, H., Ichikawa, H. and Fukumori, Y. 1999. Chitosan-gadopentetic acid complex nanoparticles for gadolinium neutron-capture therapy of cancer: Preparation by novel emulsion-droplet coalescence technique and characterization. *Pharmaceutical research*, 16(12): 1830-1835.
- Van der Lubben, I., Verhoef, J., Borchard, G. and Junginger, H. 2001. Chitosan for mucosal vaccination. *Advanced drug delivery reviews*, 52: ۱۳۹-۱۴۴.
- Vila, A., Sánchez, A., Janes, K., Behrens, I., Kissel, T., Jato, J.L.V. and Alonso, M.J. 2004. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *European Journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, ۱۲۳-۱۳۱: (۱)۵۷.
- Wang, R., Cai, J., Huang, Y., Xu, D., Sang, H. and Yan, G. 2009. Novel recombinant fibrinogenase of agkistrodon acutus venom protects against lps-induced dic. *Thrombosis research*, 123(6): 919-924.

Synthesis of sodium alginate nanoparticles containing *Agkistrodon halys* snake venom and evaluation of biological activity and survival of colon cancer cells (SW-480)

Sahar Salmanzadeh Zehkesh¹ and Naser Mohammadpour Donighi^{1*}

¹ Department of Venomous Animal, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

*Correspondence to Naser Mohammadpour Donighi, Ph.D., nasser_mohammadpour@yahoo.com

Received 20th April 2021 Revised 1 10th June 2021 Accepted 15th August 2021

Abstract

Introduction and Aim: Alginate nanoparticles have been used in novel drug delivery systems due to marvelous features including biocompatibility, biodegradable, mucoadhesive, and non-toxic. At present various types of adjuvants are used against snake venom, as a solution, suspension, or emulsion systems, which are used in different centers. The purpose of this study is to design a novel type of antigen delivery system as an adjuvant from alginate nanoparticles.

Methods: Alginate nanoparticles were prepared based on the ionic gelation process. The nanoparticles' particle size, morphology, zeta potential, *in vitro* release behavior, and structure of nanoparticles contained venom were analyzed by SEM, DLS, and FT-IR spectroscopy. Cell viability of SW-480 cells was measured using an MTT assay.

Results: The particles were spherical. The optimum particles size of alginate and venom-loaded nanoparticles were 118 and 169 nm, respectively. Viability significantly decreased in cells exposed to upper 20 µg/ml o ($P<0.05$).

Conclusion: Our results suggested that alginate nanoparticles, which were prepared in our study possibly, could be used as an alternative for traditional adjuvant systems.

Keywords: Alginate nanoparticles, the venom of *Agkistrodon halys* snake, Adjuvants, colon cancer cells (SW-480)