



مقاله پژوهشی

نقش نوع پوشش نانوذرات نقره در دارورسانی کارا: برهمکنش با پروتئین سرم آلبومین انسانی

آزاده حکمت^{*}، زهرا روشنی

گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۱/۱۲

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۹/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از نانو ذرات نقره (AgNPs) در نانوپزشکی و داروسازی بسیار متداول شده است. نانوذرات نقره از طرق مختلف سنتز می‌شوند. میزان اتصال دارو به پروتئین سرم آلبومین انسانی (HSA)، به‌عنوان فراوان‌ترین پروتئین در سیستم گردش خون، در غلظت درمانی و میزان دسترسی بافت هدف به دارو مؤثر است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر نوع پوشش مورد استفاده در سنتز AgNPs بر میزان برهمکنش این نانوذرات با HSA است.

مواد و روش‌ها: از طیف‌سنجی فلورسانس، طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD) و آنالیز پتانسیل زتا جهت بررسی تغییرات ایجاد شده بر ساختار HSA در هنگام افزودن نانوذرات نقره با ماتریس پراکنده اتیلن گلیکول، نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات و نانوذرات نقره بدون پوشش استفاده گردید.

نتایج: خاموشی نشر فلورسانس نشان داد نانوذرات نقره حاوی ماتریس پراکنده اتیلن گلیکول با ثابت اتصال (K_d) بالاتر ($56 \times 10^{-4} M^{-1}$) در مقایسه با دو نوع نانوذره دیگر با HSA برهمکنش می‌دهند. مطالعات CD نشانگر کاهش محتوای آلفا هلیکس پروتئین به‌ویژه پس از افزودن نانوذرات نقره حاوی ماتریس پراکنده اتیلن گلیکول (از $51/45\%$ به $41/71\%$) است. آنالیز پتانسیل زتا بیانگر کاهش بار سطحی HSA به‌ویژه پس از افزودن نانوذرات نقره حاوی ماتریس پراکنده اتیلن گلیکول از $-16/73 mV$ به $-11/79 mV$ است.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد نانوذرات نقره حاوی ماتریس پراکنده اتیلن گلیکول نسبت به دو نوع نانوذره دیگر برهمکنش قوی‌تری با HSA دارند؛ بنابراین نوع پوشش انتخابی در سنتز نانوذرات نقره، بر میزان برهمکنش آن‌ها با HSA و در نتیجه انتقال و پخش آن‌ها در خون تأثیرگذار است.

کلمات کلیدی: پروتئین سرم آلبومین انسانی (HSA)، نانوذرات نقره، سنتز

مقدمه

محصول صنعتی شامل نانو ذرات نقره هستند. به‌عنوان مثال در بسته‌بندی محصولات غذایی و مکمل‌های غذایی، صنعت نساجی، صنایع الکترونیک، وسایل آرایشی و بهداشتی، ضد عفونی‌کننده‌های آب و اسپری‌های خانگی از نانو نقره استفاده می‌شود (۱). نانوذرات نقره همچنین نقش ویژه‌ای در درمان سرطان دارند. مطالعات پیشین نشان داده است نانوذرات نقره (با ابعاد کوچک) می‌تواند به درون سلول سرطانی نفوذ کنند و موجب القای آپاپتوز در آن‌ها گردند (۲). همچنین نانوذرات نقره می‌توانند با بیوماکرومولکول‌ها (به‌ویژه پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک) برهمکنش دهند و موجب تغییرات ساختاری در آن‌ها گردند (۳-۵).

پروتئین سرم آلبومین انسانی (HSA) شامل ۳ دومین هومولوگ، تک رشته، قلبی شکل، با ۵۸۵ اسید آمینه و وزن مولکولی ۶۷/۵ کیلو دالتون است که حفظ فشار انکوتیک، حفظ

گسترش فناوری نانو در دهه اخیر موجب پیشرفت شگرفی در صنایع مختلف شده است. نانوذرات به دلیل ویژگی‌های منحصر به فردشان از جمله افزایش نسبت سطح به حجم، زیست‌سازگاری، پایداری شیمیایی و زیستی بالا در صنایع دارویی، پزشکی و محیط‌زیست استفاده می‌شوند. در میان نانوذرات فلزی، نانوذرات نقره (AgNPs) به علت خواص ویژه‌شان توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است. نانوذرات نقره به دلیل دارا بودن خواص ضد میکروبی خود جهت درمان زخم‌ها، سوختگی‌ها و عفونت‌های میکروبی به کار می‌روند. به عبارت دیگر فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره علت اصلی گسترش استعمال آن‌ها در صنایع مختلف است. بیش از ۸۰۰

*نویسنده مسئول: آزاده حکمت، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه

Email: hekmat@ut.ac.ir

آزاد اسلامی، تهران، ایران

https://orcid.org/0000-0003-0123-1575

نانوداروها پس از ورود به سیستم خون با احتمال بالا با پروتئین‌های خون به‌ویژه HSA برهمکنش خواهند داشت. لذا بررسی مقدار و نوع این برهمکنش‌ها با این پروتئین حیاتی خون ضروری است زیرا اگر میزان اتصال نانوداروها به این پروتئین زیاد باشد نه‌تنها موجب تغییر ساختار این پروتئین و تغییر اعمال آن می‌شود بلکه میزان دسترسی بافت‌های هدف به دارو یا نانوذرات دارویی کاهش می‌یابد. از سوی دیگر اگر مقدار کمی از نانوداروها به پروتئین‌های خون اتصال یابد امکان سمیت دارویی بسیار بالا است. لذا میزان برهمکنش نانوداروها با این پروتئین از نظر فارماکوکنتیکی بسیار مهم است. از سوی دیگر نوع پوشش نانوذرات می‌تواند در میزان این برهمکنش مؤثر باشد، لذا انجام مطالعاتی که تأثیر پوشش نانوذرات را بر میزان برهمکنش با پروتئین‌های خون به‌ویژه HSA بررسی کند در صنایع دارویی و زیست‌پزشکی لازم و ضروری است. در این مطالعه به مقایسه سه نوع نانوذرات نقره متداول با ابعاد ۱۰ نانومتر بر روی ساختار پروتئین سرم آلبومین انسانی با استفاده از تکنیک‌های طیف‌سنجی پرداخته شد. این مطالعه می‌تواند اطلاعات مهم و کاربردی در طراحی نانوداروها در اختیار متخصصین قرار دهد.

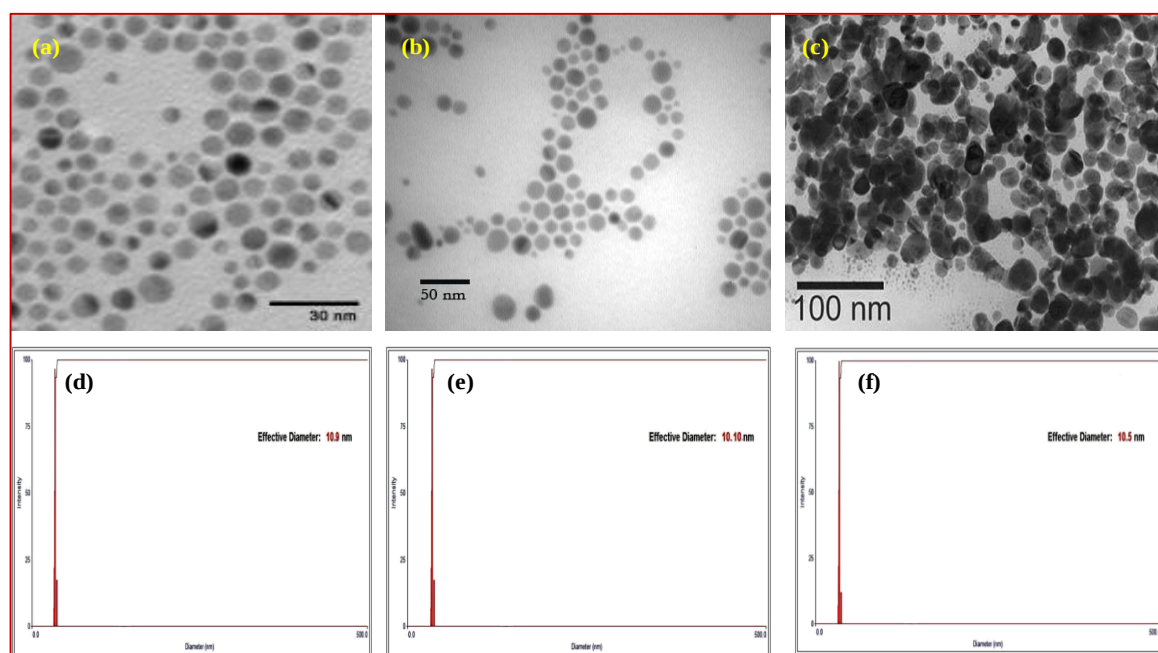
مواد و روش‌ها

مواد

پروتئین سرم آلبومین انسانی (به‌صورت پودر لیوفیلیزه و فاقد چربی) و نانوذرات نقره (با اندازه ۱۰ نانومتر، کروی شکل، دارای سدیم سیترات به‌عنوان پایدارکننده، ۰/۰۲ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر بافر آبی و دانسیته ۰/۹۹۷ گرم بر میلی‌لیتر) (شکل ۱a و ۱d) از شرکت سیگما آلدْرِیج (آمریکا) تهیه شدند. نانوذرات نقره (با اندازه ۱۰ نانومتر به حالت کلئیدی و به شکل کروی حلال در آب) (شکل ۱b و ۱e) از شرکت نانو پارمیس فناوری، پارک علم و فناوری دانشگاه تهران (ایران) و نانوذرات نقره (با اندازه ۵ تا ۱۰ نانومتر، به شکل مایع و ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول با ۸-۵ pH) (شکل ۱c و ۱e) از شرکت بیوسرا (کره جنوبی) خریداری شدند. Tris hydroxymethyl aminomethane (Tris-base) از شرکت سیناژن (ایران) خریداری گردید. تأیید اندازه نانوذرات با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری پراکندگی نور پویا (DLS) Brookhaven Instruments Corporation (ساخت آمریکا) انجام شد. تمام آزمایش‌ها در بافر Tris-base ۰/۱ مولار با pH ۷/۴ انجام شد. آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

pH خون و برقراری تعادل دمایی در مایعات بدن از جمله وظایف اصلی این پروتئین است. این پروتئین از سلول‌های کبدی ترشح می‌شود. سرم آلبومین فراوان‌ترین پروتئین در سیستم گردش خون (حدود ۶۰ درصد پروتئین‌های پلاسما) که مسئولیت نقل‌وانتقال مواد، توزیع و متابولیسم بسیاری از لیگاندها همچون (اسیدهای چرب، آمینواسیدها و داروها) که از طریق اگزوز و اندوز وارد و یا خارج از سلول می‌شوند را بر عهده دارند. هنگامی که نانوذرات به محیط مایع بیوماکرومولکول‌ها افزوده می‌شوند احتمال جفت شدن آن‌ها با بیوماکرومولکول‌ها (به‌طور ویژه پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک) افزایش می‌یابد. به همین علت مطالعات بسیاری در زمینه نحوه اندرکنش نانوذرات با ماکرومولکول‌های حیاتی انجام پذیرفته است (۶).

روش‌های متعددی جهت سنتز نانوذرات نقره وجود دارد. یکی از روش‌های تولید نانوذرات نقره روش احیای شیمیایی است که احیاکننده یکی از ارکان اصلی تولید نانوذرات در این روش است. احیاکننده، الکترون موردنیاز برای تبدیل یون نقره به فلز نقره را مهیا می‌کند. احیاکننده می‌تواند یک عامل شیمیایی، زیست‌ماده استخراجی گیاهی و یا حاصل از روش‌های پرتو تابشی باشد که یون‌های لازم برای احیای یون نقره به فلز نقره را فراهم می‌آورد (۷). سدیم بوروهیدرید، هیدرازین، اسکوربیک اسید، سیترات سدیم، فرمالدئید و لیگاندهای کمپلکس‌کننده آنیونی از جمله عوامل شیمیایی احیا هستند (۸-۱۰). اخیراً از اتیلن گلیکول و گلیسرین نیز به‌عنوان حلال استفاده شده است و این دو عامل به‌طور هم‌زمان وظیفه احیا را انجام می‌دهند (۱۱). سیترات سدیم با فرمول شیمیایی $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ شناخته می‌شود. این نمک اندکی شور و ترش‌مزه است. به همین دلیل سیترات‌های فلزی قلیایی و قلیایی خاک (برای مثال سیترات سدیم و سیترات کلسیم) معمولاً نمک ترش نامیده می‌شوند. سدیم سیترات نمک آلی مهمی در بیوتکنولوژی غذایی، داروسازی و کشاورزی است (۱۲). اتیلن گلیکول زیست‌سازگار، غیر سمی و زیست‌تخریب‌پذیر است که جهت استفاده در مواد غذایی و دارویی مورد تأیید سازمان غذا و دارو (FDA) است. این ترکیب به‌منظور آماده‌سازی میکرو و نانوذرات برای پوشش دهی آن‌ها استفاده شده و تا به امروز مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر این پلیمر اتیلن گلیکول توانایی بالایی در بارگذاری بالای دارو، حفاظت از ساختارهای کپسوله‌کننده و آنالیت درون آن‌ها و حفاظت از خاصیت نانوذرات مغناطیسی را دارا است (۱۳).



شکل ۱- تصاویر TEM برگرفته از شرکت‌های سازنده نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات (a)، نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه (b) و نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول (c) و طیف‌های DLS نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات (d)، نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه (e) و نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول (f).

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{(Ab_{ex} + Ab_{em}) / 2}$$

که در این معادله F_{corr} و F_{obs} بیانگر شدت نشر فلورسانس مشاهده شده و شدت نشر فلورسانس تصحیح شده است. Ab_{ex} و Ab_{em} بیانگر جذب محلول در طول موج‌های تحریک و نشر است.

مطالعات طیف‌سنجی دورنگ نمای دورانی (CD)

دورنگ نمای دورانی نوعی طیف‌سنجی است که برهم‌کنش مولکول‌ها را با نور قطبیده دایره‌ای چپ‌گرد و راست‌گرد اندازه‌گیری می‌کند. جهت مطالعه تغییرات در ساختار HSA حضور نانوذرات نقره طیف‌های CD با استفاده از طیف‌سنج دورنگ‌نمایی دورانی Model 215، Aviv، (ساخت آمریکا) ثبت شد. ابتدا طیف CD نمونه HSA (۳/۷۶ میکرومولار) مورد بررسی قرار گرفت و سپس طیف‌های CD پس از افزودن هر سه نوع نانوذرات نقره (۲۱۴ میکرومولار) در محدوده طول موج ۲۰۰ تا ۲۵۰ نانومتر با استفاده از کووت کوارتز، طول مسیر ۰/۱ سانتی‌متری، رزولوشن ۰/۲ نانومتر و سرعت اسکن ۲۰ نانومتر در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و بافر Tris-base ۰/۱ مولار با pH ۷/۴ ثبت شد. هدف از آنالیز فوق دسترسی به میزان تغییر ساختارهای دوم منظم پروتئین در حضور نانوذرات نقره است. از آنجاکه چرخش نوری توسط مولکول‌های مواد فعال ایجاد

مطالعات طیف‌سنجی نشر فلورسانس

اندازه‌گیری شدت نشر فلورسانس ذاتی تریپتوفان HSA، به‌منظور مطالعه تأثیر نوع پوششی انتخابی در هنگام سنتز نانوذرات نقره در غلظت‌های مختلف بر ساختار پروتئین سرم آلبومین انسانی مورد بررسی قرار گرفت. نشر فلورسانس با استفاده از اسپکتروفلومتر فلورسانس مدل هیتاچی MPF-7 (ساخت آمریکا) بررسی شد. جهت کنترل دما در طی هر آزمایش، از حمام مدل Protherms NTB-211 استفاده شد. طول موج تحریک و نشر در تمام طول آزمایش‌ها به ترتیب ۲۹۵ و ۳۴۸ نانومتر تنظیم شد. غلظت نمونه HSA ۳/۷۶ میکرومولار تعیین شد. ابتدا طیف فلورسانس نمونه HSA مورد بررسی قرار گرفت سپس نشر فلورسانس نمونه HSA پس از افزودن غلظت‌های مختلف هر سه نوع نانوذرات نقره (۲۱۴-۱۷ میکرومولار) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ثبت گردید. ضخامت کووت‌های کوارتز در آزمایش‌ها ۱ سانتی‌متر و پهنای شکاف مورد استفاده در تحریک و نشر به ترتیب ۵ و ۱۰ نانومتر تنظیم گردید. جذب اشعه توسط خاموش‌کننده موجب کاهش سیگنال تهیج و نشر (فیلتراسیون داخلی) می‌شود. جهت تصحیح اثر فیلتراسیون داخلی از معادله (۱) استفاده شد:

نمونه‌های HSA (۳/۷۶ میکرومولار) در حضور و عدم حضور هر سه نوع نانوذرات نقره (۲۱۴ میکرومولار) به‌وسیله دستگاه Zetasizer Nano-ZS مدل MALVERN (ساخت انگلیس) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد.

نتایج

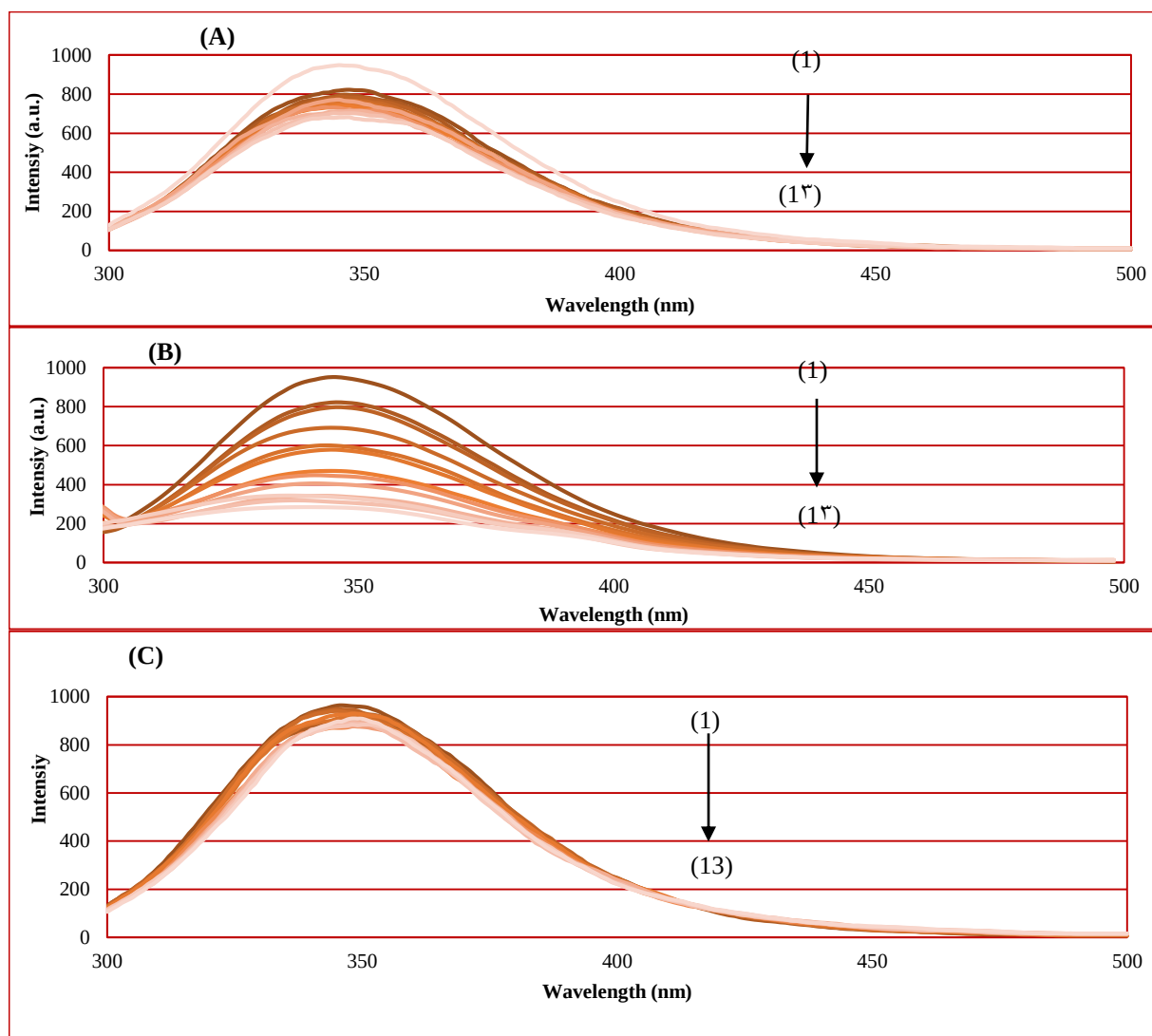
مطالعات نشر فلورسانس

از آنجاکه فلورسانس یک تکنیک بسیار قوی برای مطالعه ساختار، دینامیک و خصوصیات پروتئین موجود در محلول است، لذا با کمک تکنیک فلورسانس مطالعات ساختاری تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره با پوشش‌های مختلف بر HSA

می‌شود، میزان چرخش بستگی به تعداد مولکول‌هایی دارد که در مسیر نور قرار می‌گیرند، بنابراین مقدار چرخش، به طول مسیر عبور نور و غلظت محلول بستگی دارد. بدین علت نتایج برحسب بیضی‌واری مولی ($\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) ارائه شد. در ادامه میزان تغییر ساختمان دوم پروتئین در حضور نانوذرات نقره با استفاده از نرم‌افزار CDNN محاسبه شد.

مطالعات پتانسیل زتا (ζ)

اختلاف پتانسیل بین آخرین لایه محلول دربرگیرنده ذرات کلئوئید و اولین لایه غیر متحرک از حلال اطراف ذرات کلئوئید را پتانسیل الکتروستاتیک یا پتانسیل زتا می‌نامند. پتانسیل زتا، مقدار دافعه بین ذره مجاور را نشان می‌دهد پتانسیل زتا



نمودار ۱- تغییرات در نشر HSA با افزایش غلظت (A) نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه، (B) نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات و (C) نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد. (۱) نشر HSA و (۲-۱۳) خاموشی نشر با افزایش غلظت نانوذرات نقره (۲۱۴-۱۷ میکرومولار)

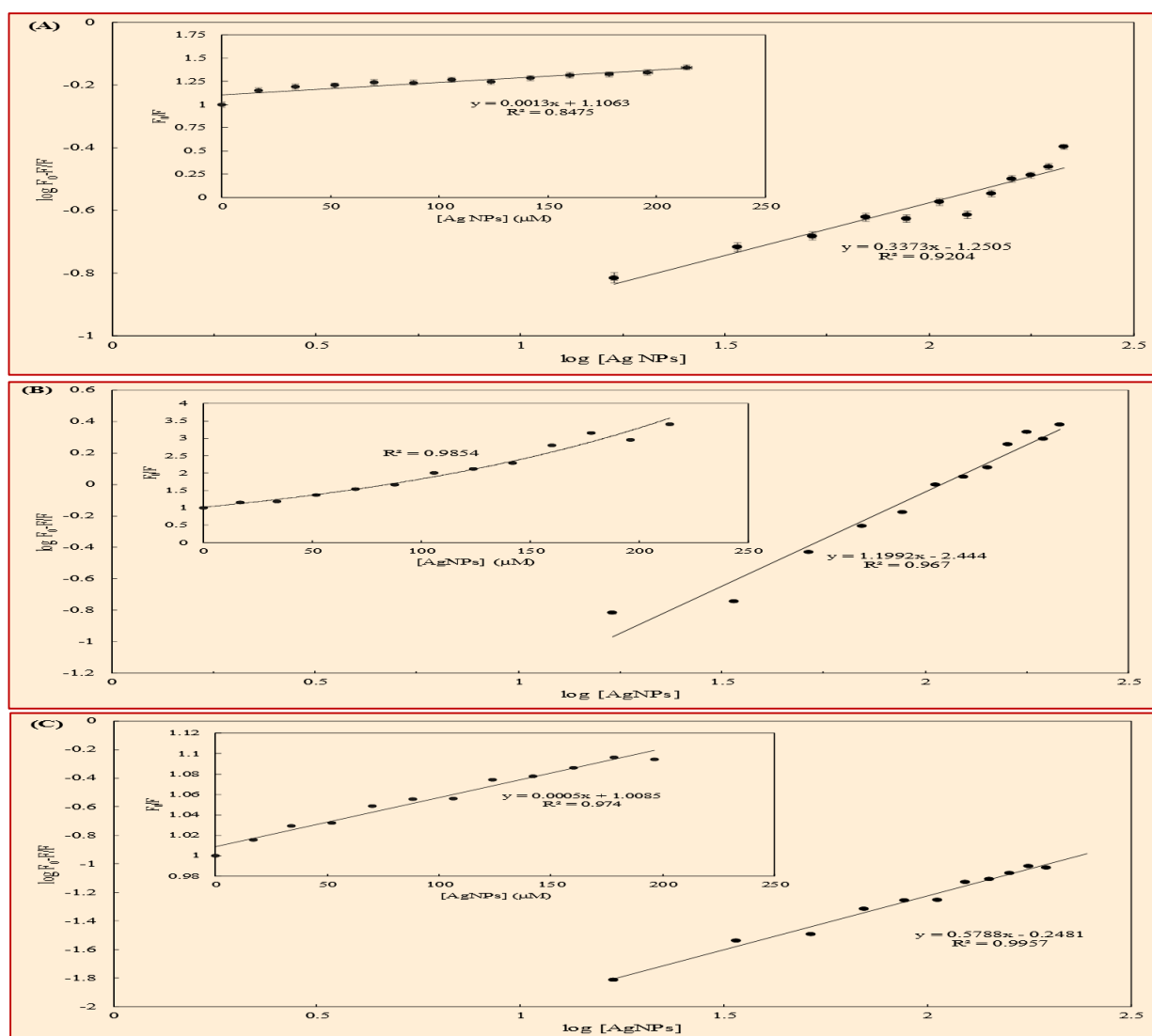
طول موج بیشینه به سمت طول موج های کمتر (blue shift) مشاهده می شود. واضح است که کاهش نشر فلورسانس (خاموشی فلورسانس)، ناشی از کاهش قرارگیری سطح رزیدو Trp در معرض حلال قطبی است (۱۵).

تعیین پارامترهای اتصال

هنگامی که در محیط مولکول های تحریک شده حضور داشته باشند بسیاری از اتفاقات بین مولکول و محیط (حلال) روی می دهد که موجب تغییر در مشاهده نشر فلورسانس می شود. طبق گزارش ها موارد بسیاری سبب کاهش شدت فلورسانس می گردد از آن جمله، انتقال انرژی، انتقال بار، برخورد مولکول ها

انجام یافت. فلورسانس ذاتی HSA تنها توسط Trp ایجاد می شود. HSA تنها یک اسید آمینه (رزیدو) Trp در موقعیت ۲۱۴ دارد (۱۴). هرگونه تغییر در قطبیت اطراف Trp را می توان با تغییر در حداکثر قله نشر فلورسانس ارزیابی نمود (۱۴).

نمودار ۱ تغییرات در نشر HSA با افزایش غلظت نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه، نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات و نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول را نشان می دهد. همان طور که مشاهده می گردد با افزایش غلظت هر سه نوع نانوذرات نقره شدت نشر HSA در طول موج ۳۴۸ نانومتر کاهش یافت. این در حالی است که جابجایی اندکی در



نمودار ۲- نمودارهای $\log \frac{F_0 - F}{F}$ در مقابل غلظت برای تعیین مقادیر ثابت اتصال، نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه (A)، نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات (B) و نانوذرات نقره ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول (C) متصل شده به HSA در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد. نمودارهای الحاقی: نمودار F_0/F در مقابل غلظت نانوذرات نقره

در مرحله بعد پارامترهای اتصال در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از رابطه مدیفای شده استرن ولمر (معادله ۳) تعیین شدند (۲).

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_A + n \log [Q]$$

در معادله فوق K_A ثابت اتصال ایجاد کمپلکس و n تعداد لیگندهای اتصال است. مقدار n برای شناخت تعداد جایگاه‌های پیوندی مفید است.

در مرحله بعد با استفاده از ثابت‌های اتصال به‌دست‌آمده و معادله ۴ مقدار انرژی آزاد گیبس (ΔG°) اتصال نانوذرات نقره به HSA محاسبه شد (۶).

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

در رابطه فوق R ثابت عمومی گازها و T دمای مطلق است. مقادیر پارامترهای ترمودینامیکی مربوطه در جدول ۱ مرتب‌شده‌اند. مقدار ΔG° اتصال منفی به‌دست‌آمده بیانگر خودبه‌خودی بودن فرآیند اتصال نانوذرات نقره به HSA است (۱۷).

و یا ایجاد یک کمپلکس در حالت پایه را می‌توان نام برد. به کاهش در شدت نشر فلورسانس پدیده فرونشانی یا خاموشی (Quenching) گفته می‌شود (۱۶). جهت یافتن پارامترها و مکانیسم دخیل در پدیده خاموشی از معادله استرن-ولمر استفاده گردید (معادله ۲):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

در معادله فوق F_0 و F به ترتیب بیانگر نشر فلورسانس HSA در غیاب و حضور هر سه نوع نانوذرات نقره است. K_{SV} ثابت استرن-ولمر و $[Q]$ غلظت کل خاموش‌کننده (نانوذرات نقره) را نشان می‌دهد. τ_0 نیمه‌عمر فلوروفور و k_q ثابت سرعت خاموشی بیوماکرومولکول است. نمودار ۲ نمودار استرن-ولمر یا میزان $\frac{F_0}{F}$ در مقابل غلظت خاموش‌کننده (نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه، نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات و نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول) را نشان می‌دهد.

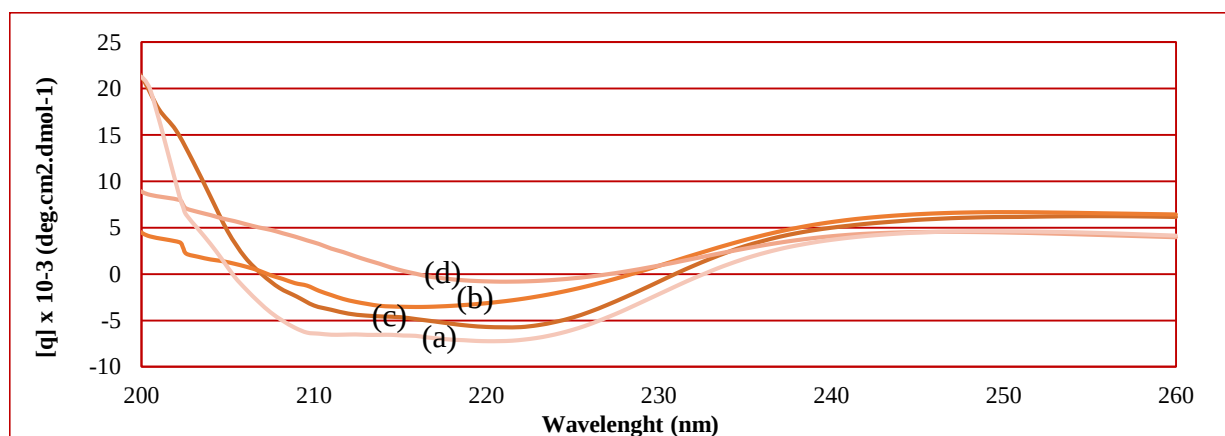
جدول ۱- پارامترهای ترمودینامیکی و اتصال نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه، نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات و نانوذرات نقره ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول متصل شده به HSA در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

	$K_A (M^{-1})$	n	$K_q (M^{-1}S^{-1})$	$K_{SV} (M^{-1})$	$\Delta G^\circ (kJ mol^{-1})$
نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه	$5/6 \times 10^4$	۰/۴۴	$5/9 \times 10^{10}$	13×10^2	-۲۸/۱۹
نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات	36×10^2	۱/۱۹	-	-	-۲۱/۱۱
نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول	56×10^4	۰/۶	$2/27 \times 10^{10}$	5×10^2	-۳۴/۱۲

مطالعات طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD)

از آنجاکه طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی، اطلاعات بسیار مفیدی درباره تغییرات ساختاری پروتئین‌ها در نتیجه تغییر شرایط آزمایش مانند اتصال لیگاند، pH، دما و غیره می‌دهد، در این بخش از مطالعه تغییرات ایجادشده در ساختار دوم پروتئین در حضور هر سه نوع نانوذرات نقره بررسی شد. همان‌طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود HSA بدون حضور نانوذرات نقره دو قله منفی در طول موج‌های ۲۰۸ نانومتر و ۲۲۲ نانومتر دارد که مشخص‌کننده ساختار آلفا هلیکس پروتئین است (۶). همان‌گونه

همان‌گونه که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود نمودارهای $\frac{F_0}{F}$ علیه نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول و نانوذرات نقره بدون پوشش به‌صورت خط راست است. با استفاده از معادله ۲ مقدار k_q به دست آمد (جدول ۱). همان‌گونه که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود نمودارهای $\frac{F_0}{F}$ علیه نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات به‌صورت انحراف مثبت از خط راست شد.



نمودار ۳- طیف CD مربوط به HSA در غیاب (a) و حضور نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه (b)، نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات (c) و نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول (d) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

جدول ۲- محتوای ساختار دوم HSA در غیاب و حضور نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه، نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات و نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

درصد پیچ نامنظم	درصد صفحات بتا	درصد مارپیچ آلفا	
۲۲/۸۳	۲۵/۷۲	۵۱/۴۵	HSA
۲۷/۲۵	۲۸/۱۱	۴۴/۶۴	HSA + نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه
۲۵/۴۷	۲۷/۴۵	۴۷/۰۸	HSA + نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات
۲۸/۱۹	۳۰/۱۰	۴۱/۷۱	HSA + نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول

جدول ۳- تغییرات پتانسیل زتا HSA در غیاب و حضور نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه، نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات و نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

پتانسیل زتا (mV)	
-۱۶/۷۳	HSA
-۱۴/۵۵	نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه + HSA
-۱۳/۹۰	نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات + HSA
-۱۱/۷۹	نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول + HSA

مطالعات پتانسیل زتا

پتانسیل زتا، مقدار دافعه بین ذره مجاور را نشان می‌دهد. جدول ۳ پتانسیل زتا HSA را در غیاب و حضور هر سه نوع نانوذرات نقره را نشان می‌دهد. میزان پتانسیل زتا در HSA برابر با $-16/73$ mV است. این مقدار با مطالعات پیشین تطابق دارد (۶، ۱۸). نتایج حاصل از مطالعه پتانسیل زتا نشان می‌دهد در حضور نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات میزان بار سطحی کاهش ($-13/90$ mV) می‌یابد این حالت بیانگر تغییر

که مشاهده می‌شود در حضور نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول، ساختار HSA در مقایسه با دو نوع دیگر نانوذرات نقره تغییر محسوس‌تری از خود نشان داده است. در مرحله بعد با استفاده از نرم‌افزار CDNN درصد محتوای صفحات بتا و آلفا هلیکس HSA در حضور و عدم حضور هر سه نوع نانوذرات نقره محاسبه گردید. این نتایج در جدول ۲ گردآوری گردیده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود در حضور هر سه نوع نانوذرات نقره محتوای آلفاهلیکس کاهش یافته است.

طراحی دارو به کار می‌برند. تکنیک‌هایی مانند طیف‌سنجی جذب UV-Vis، طیف‌سنجی فلورسانس و CD می‌تواند به مطالعه تعامل بین مولکول‌های کوچک و پروتئین‌ها کمک شایانی می‌کنند. در این مطالعه با استفاده از تکنیک‌های طیف‌سنجی به بررسی تأثیر نوع پوشش نانوذرات نقره در هنگام اتصال به HSA و تأثیر نوع پوشش نانوذرات نقره با اندازه یکسان در ایجاد تغییرات ساختاری در پروتئین در شرایط *in vitro* پرداخته شد. طیف‌سنجی فلورسانس یک تکنیک بسیار قوی برای مطالعه ساختار و خصوصیات ماکرومولکول‌های موجود در محلول است، لذا در این مطالعه با کمک تکنیک طیف‌سنجی فلورسانس مطالعه اتصال نانوذرات نقره به پروتئین HSA انجام شد. پروتئین‌ها به دلیل حضور آمینواسیدهای تریپتوفان، تیروزین و فنیل‌آلانین (فلوروفور) دارای نشر فلورسانس ذاتی هستند. پروتئین سرم آلبومین انسانی تک زنجیره، با ۵۸۵ اسیدآمینه و ۱۷ پیوند دی سولفیدی است و تنها دارای یک تریپتوفان (تریپتوفان ۲۱۴) است. فلورسانس ذاتی پروتئین سرم آلبومین انسانی اساساً از باقیمانده‌های (رزیدوهای) تریپتوفان، تیروزین و فنیل‌آلانین ایجاد می‌شود. از آنجاکه فلورسانس اسیدآمینه فنیل‌آلانین بسیار کم و فلورسانس تیروزین نیز تقریباً هنگامی که این اسیدآمینه یونیزه می‌شود و یا نزدیک یک گروه آمینو یا کربوکسیل تریپتوفان است خاموش می‌شود، پس فقط باقی‌مانده تریپتوفان ۲۱۴ حساس به لیگاندی است که متصل می‌شود؛ بنابراین شدت فلورسانس فقط به باقی‌مانده تریپتوفان ۲۱۴ نسبت داده می‌شود. اسیدآمینه تریپتوفان در پروتئین سرم آلبومین انسانی در نزدیکی سطح پروتئین، در مارپیچ ۲ از زیر دمین IIA قرار دارد (۱۴). شکل ۱ کاهش شدت بیشینه نشر فلورسانس HSA همراه با اندکی جابجایی به سمت چپ (طول موج پایین‌تر) با افزایش غلظت هر سه نوع نانوذرات نقره را نشان می‌دهد. قابل توجه است که تغییر در حداکثر طول موج نشر به دلیل تغییرات قطبیت در اطراف دنباله‌های کروموفور است و انتقال به سمت طول موج‌های بالاتر نشان‌دهنده این است که به‌طور متوسط زیر واحد تریپتوفان، بیشتر در معرض حلال قرار گرفته است، درحالی‌که انتقال به سمت طول موج‌های پایین‌تر نتیجه انتقال زیرواحدهای تریپتوفان به محیط آبریزتر است (۱۵، ۲۰)؛ بنابراین در مطالعه حاضر انتقال به سمت طول موج پایین‌تر در بیشینه طول موج نشر می‌تواند ناشی از تغییر کوچک در محیط اطراف تریپتوفان پروتئین باشد این نتایج با مشاهدات Voicescu و همکاران (۲۱)

ساختار HSA است. در حضور نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول بار سطحی کاهش بیشتری می‌یابد ($11/79 \text{ mV}$) و در حضور نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه میزان تغییر بار کمتر مشاهده می‌گردد ($14/55 \text{ mV}$).

بحث

مطالعات اخیر نشان داده است که نانوذرات نقره می‌توانند به‌عنوان یک نانودارو مورد استفاده قرار گیرند، علاوه بر این می‌توانند تشکیل کلنی باکتری‌ها بر روی سطوح مختلف را مهار کنند و همچنین تأثیرات مفیدی در بهبود و ترمیم زخم داشته باشند. همچنین نشان داده شده است که نانوذرات نقره می‌توانند در درمان ایدز، ویروس‌ها و به‌ویژه سرطان نقش مؤثری ایفا نمایند (۲). کاربردهای خاص و ویژگی‌های نانوذرات نقره وابسته به اندازه، شکل و روش سنتز آن‌ها دارد. روش‌های مختلفی برای سنتز نانوذرات نقره ارائه شده است. چالش اصلی در سنتز و تولید نانوذرات نقره، کنترل خصوصیات فیزیکی آن‌ها از جمله توزیع یکنواخت اندازه ذرات، شکل یکسان، پوشش نانوذرات یا عامل تثبیت‌کننده، ترکیب شیمیایی و ساختار کریستالی آن‌ها است. روش‌های مختلف سنتز نانوذرات را می‌توان بر اساس واکنش‌دهنده‌ها و شرایط واکنش، سنتز بالا-پایین یا پایین-بالا، سنتز سبز یا سنتز غیر سبز، سنتز به روش‌های مرسوم (مانند استفاده از سیترات، سیکلودکسترین و بروهیدرید) یا سنتز به روش‌های غیرمعارف (مانند استفاده از لیزر، خلأ و رادیوکاتالیز) دسته‌بندی نمود. احیای شیمیایی توسط مواد احیاکننده معدنی و آلی یکی از متداول‌ترین روش‌ها در سنتز نانوذرات نقره است. به‌طور کلی، داروهای احیاکننده مختلف مانند سدیم سیترات، آسکوربات و سدیم بروهیدرید جهت احیای یون‌های نقره در محلول‌های آبی و غیرآبی به کار می‌روند (۱۹).

پس از ورود داروها به درون خون، آن‌ها از طریق HSA جمع‌آوری شده و به قسمت‌های مختلف بدن حمل می‌شوند. جذب، توزیع، متابولیسم، دفع و سمیت داروها می‌تواند در نتیجه اتصال آن‌ها به HSA به میزان قابل توجهی تغییر کند. در نتیجه، HSA به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان یک پروتئین مدل در ارزیابی اثر متقابل پروتئین و دارو مورد استفاده قرار می‌گیرد. میزان اتصال نانوذرات یا نانوداروها به HSA بر میزان دسترسی بافت‌های هدف به دارو یا نانوذرات مؤثر است. در نتیجه، بسیاری از شرکت‌های دارویی مطالعه اتصال دارو با HSA را به‌عنوان اولین مرحله

شد. جهت یافتن پارامترها و مکانیسم دخیل در پدیده خاموشی

از معادله استرن-ولمر استفاده شد. نمودار $\frac{F_0}{F}$ علیه نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول به صورت خط راست شد. به عبارت دیگر اتصال نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول به HSA موجب خاموشی فلوروفور می گردد و در این پدیده سهم خاموشی، مخلوطی از خاموشی استاتیک و خاموشی دینامیک است. جهت نتیجه گیری بهتر مقدار k_q از طریق معادله ۲ محاسبه گردید. از آنجا که مقدار k_q محاسبه شده برای نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول بیشتر از مقدار محدودکننده $M^{-1}S^{-1} \times 10^4$ است (۲۳)، بنابراین خاموشی نشر فلورسانس HSA در حضور نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول از نوع استاتیک (از طریق ایجاد کمپلکس حالت

پایه) است (جدول ۱). نمودار $\frac{F_0}{F}$ علیه نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه نیز به صورت خط راست شد. به عبارت دیگر اتصال نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه به HSA موجب خاموشی فلوروفور می گردد و در این پدیده سهم خاموشی، مخلوطی از خاموشی استاتیک و خاموشی دینامیک است. از آنجا که مقدار k_q محاسبه شده برای نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه نیز بیشتر از مقدار محدودکننده $M^{-1}S^{-1} \times 10^4$ است (۲۳)، بنابراین خاموشی نشر فلورسانس HSA در حضور نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه نیز از نوع استاتیک است (جدول ۱). نمودار $\frac{F_0}{F}$ علیه نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات به صورت انحراف مثبت از خط راست شد. به عبارت دیگر اتصال نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات موجب خاموشی فلوروفور می گردد و در این پدیده سهم تشکیل کمپلکس غیر فلورسانس (خاموشی استاتیک) بیش از خاموشی دینامیک است (۲۳).

از آنجا که خاموشی برای هر سه نوع نانوذرات نقره از نوع استاتیک تشخیص داده شد، پارامترهای اتصال با استفاده از رابطه مدیفای شده استرن-ولمر تعیین شدند. مقادیر n و ثابت اتصال نانوذرات نقره مختلف به مولکول HSA متفاوت بوده و مقدار ثابت اتصال برای نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول (M^{-1}) 36×10^4 بیشتر از دو نانوذره نقره (M^{-1}) 56×10^4 برای نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات و $5/6 \times 10^4 M^{-1}$ برای

که نشان دادند نانوذرات نقره با کاهنده سدیم بروهیدراید و اندازه ۴ تا ۲۰ نانومتر می تواند موجب کاهش نشر بیشینه پروتئین سرم آلبومین با اندکی جابجایی به سمت راست گردد، مطابقت دارد. مطالعات Zhao و همکاران (۲۲) نشان داد که افزودن Ag^+ به پروتئین سرم آلبومین موجب کاهش نشر فلورسانس پروتئین می گردد. آن ها بیان کردند که اگر مولکولی کوچک بتواند نشر فلورسانس اسیدآمینه تریپتوفان را خاموش کند، تریپتوفان در نزدیک محل اتصال قرار دارد؛ بنابراین کاهش نشر مشاهده شده در مطالعه خود را ناشی از اتصال Ag^+ به پروتئین سرم آلبومین گزارش کردند (۲۲)؛ بنابراین می توان این گونه نتیجه گرفت که کاهش نشر فلورسانس در مطالعه حاضر نیز ناشی از اتصال نانوذرات به HSA در نزدیکی اسیدآمینه تریپتوفان است.

با آنالیز تغییرات در نشر فلورسانس می توان اطلاعاتی درباره تأثیر برخورد مولکول تحریک شده با محیط اطراف به دست آورد. شدت نشر فلورسانس یک مولکول می تواند تحت تأثیر انواع برهمکنش ها کاهش یابد. این برهمکنش ها، شامل برهمکنش های حالت تحریک شده (excited - state)، آرایش دوباره مولکولی، انتقال انرژی، ایجاد کمپلکس های حالت پایه (ground-state) و خاموشی تصادفی (Collisional) می باشند. به چنین کاهش در شدت نشر فلورسانس پدیده فرونشانی یا خاموشی (Quenching) گفته می شود. برخی مقالات پدیده خاموشی در نشر فلورسانس را به دودسته بزرگ خاموشی دینامیک و خاموشی استاتیک تقسیم بندی می کنند. اساس تقسیم بندی فوق، چگونگی رابطه بین شدت نشر فلورسانس و غلظت خاموش کننده است که آیا کاملاً با معادله استرن - ولمر همخوانی دارد (خاموشی دینامیک) یا ندارد (خاموشی استاتیک). پدیده خاموشی دینامیک زمانی اتفاق می افتد که یک اتم یا مولکول با فلوروفور در حالت تهیجی، برخورد نموده و سبب بازگشت فلوروفور به حالت پایه، بدون انتشار گردد. پدیده خاموشی استاتیک زمانی اتفاق می افتد که فلوروفور با مولکول دیگری کمپلکس ایجاد نماید و بازگشت به حالت پایه برای فلوروفور فاقد هرگونه انتشار باشد. در این حالت وابستگی میزان نشر به عنوان تابعی از غلظت خاموش کننده است (۲، ۱۴، ۱۷). در مطالعه حاضر هر سه نوع نانوذرات نقره قادر به کاهش شدت نشر فلورسانس HSA بوده اند یا به عبارت دیگر هر سه نوع نانوذرات نقره فوق به عنوان خاموش کننده نشر فلورسانس HSA عمل کرده اند که جداگانه مکانیسم خاموشی هر یک بحث خواهد

نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه) به دست آمد. به عبارت دیگر نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول تمایل بیشتری به اتصال با HSA نسبت به نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات و نانوذرات بدون پوشش ویژه دارند. بر طبق جدول ۱ مقدار ΔG° اتصال برای هر سه نوع نانوذرات نقره منفی به دست آمد که بیانگر خودبه خودی بودن فرآیند اتصال نانوذرات نقره با HSA است (۱۷). همان گونه که در جدول ۱ مشاهده می شود مقدار ΔG° برای نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول ($-28/19 \text{ kJ mol}^{-1}$) نسبت به دو نانوذره نقره دیگر بیشتر است که دلیل بر ایجاد کمپلکس قوی تر این نوع نانوذره نقره با HSA است (۲۴).

به کمک طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی می توان ساختمان فضایی ماکرومولکول ها را در محلول ها و همچنین برهمکنش های ماکرومولکولی را مطالعه نمود. طیف های CD در ناحیه far-UV جهت مطالعه تعیین ساختار دوم استفاده می شود که این طیف ها ناشی از جذب پیوند پپتیدی پروتئین می باشند. مقدار بیضی واری مولی در ۲۲۲ نانومتر و ۲۰۸ نانومتر یا نسبت این دو برای تعیین میزان مارپیچ آلفا و مقدار بیضی واری مولی در ۲۱۷ نانومتر به عنوان شاخصی برای میزان صفحات بتای موجود در پروتئین استفاده می گردد (۱۴). همان طور که در نمودار ۳ قابل مشاهده است، طیف CD به دست آمده برای HSA دو قله منفی در حدود طول موج های ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر را نشان می دهد. همان گونه که ذکر شد طیف CD پروتئین های دارای ساختار غالب آلفا هلیکس دارای دو قله منفی در حدود طول موج های ۲۰۸ نانومتر و ۲۲۲ نانومتر است. انرژی و شدت این قله ها مربوط به زوایای پیوند پپتیدی (Ψ و Φ) است؛ بنابراین بر طبق مطالعات حاضر پروتئین سرم آلبومین انسانی دارای درصد بالایی از آلفا هلیکس در ساختار دوم خود است (۵۱/۴۵٪). این نتیجه با مطالعات پیشین مبنی بر آلفا هلیکس بودن HSA تطابق دارد (۱۴، ۲۲). درصد ساختارهای دوم HSA توسط نرم افزار CDNN محاسبه گردید. نتایج جدول ۲ نشان می دهد که در اثر میانکشی نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول با HSA ناپایداری در ساختار دوم پروتئین روی می دهد و محتوای آلفا هلیکس از ۵۱/۴۵٪ به ۴۱/۷۱٪ کاهش می یابد. محتوای آلفا هلیکس ساختار دوم پروتئین در اثر میانکشی با نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه نیز از ۵۱/۴۵٪ به ۴۴/۶۴٪ کاهش یافت و محتوای رندوم کوئل و صفحات بتا افزایش یافت. Wang و همکاران (۲۵) و Fu و

همکاران (۲۶) گزارش کرده اند هنگامی که میزان بیضی واری HSA پس از افزودن لیگاند تا حدی کاهش یابد، نشان دهنده از دست رفتن برخی از ساختارهای آلفا هلیکسی پروتئین است. همچنین این کاهش درصد در ساختار آلفا هلیکس نشان می دهد لیگاند قادر است با باقی مانده اسید آمینه های زنجیره پلی پپتید HSA برهمکنش دهد و شبکه پیوند هیدروژن را تا حدودی از بین ببرد. همچنین در مطالعه ای دیگر نشان داده شد که قله منفی در حدود طول موج ۲۲۲ نانومتر با میزان پیوندهای هیدروژنی ساختار آلفا هلیکس ارتباط دارد (۲۷)؛ بنابراین بر پایه این گزارش ها در حضور نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول و نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه میزان پیوندهای هیدروژنی در پروتئین کاهش یافته است و این کاهش می تواند در نتیجه شکسته شدن و حذف برخی از پیوندهای هیدروژنی و تشکیل پیوندهای هیدروژنی جدید با ساماندهی کمتر (تشکیل صفحات بتا و رندوم کوئل) باشد که این امر موجب تغییر محتوای ساختار دوم پروتئین و کاهش پیوند هیدروژنی گردیده است. محتوای آلفا هلیکس پروتئین در حضور نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات نیز از ۵۱/۴۵٪ به ۴۷/۰۸٪ کاهش می یابد؛ اما ذکر این نکته حائز اهمیت است که تغییرات ساختار دوم در حضور هر سه نوع نانوذرات نقره بسیار چشمگیر نیست و باعث تغییرات اساسی در ساختار دوم پروتئین نشده اند. به عبارت دیگر اتصال نانوذرات نقره مورد مطالعه در این پژوهش تغییرات در سطح ساختار سوم پروتئین ایجاد می کنند اما موجب تغییر در ساختار دوم پروتئین نمی شوند.

در اتصال لیگاند به پروتئین چهار نوع برهمکنش غیر کووالانسی شامل پیوندهای هیدروژنی، نیروی واندروالسی، میان کنش های هیدروفوبی و الکتروستاتیک می توانند دخیل باشند. مطالعه انجام شده توسط Ragi و همکاران نشان داد در حضور اتیلن گلیکول تغییرات ساختاری در ساختار دوم HSA ایجاد می شود و محتوای صفحات بتا در HSA افزایش می یابد. همچنین آن ها گزارش کردند که اتیلن گلیکول از طریق پیوند هیدروژنی به HSA متصل می شود (۲۸)؛ بنابراین از آنجاکه تغییرات مشاهده شده توسط اتیلن گلیکول بر ساختار HSA با تغییرات مشاهده شده در ساختار HSA در حضور نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول تطابق دارد، می توان نتیجه گرفت که پوشش اتیلن گلیکول بر میزان برهمکنش نانوذرات نقره و ایجاد تغییرات ساختاری در پروتئین سرم آلبومین انسانی

بیشتری ایجاد می‌کنند و نانوذرات نقره با پوشش سیترات سمیت کمتری را در این شرایط از خود نشان می‌دهند. این نتایج کاملاً با نتایج *in vitro* به دست آمده در این مطالعه تطابق دارد؛ بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول نسبت به نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات و نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه با HSA برهمکنش قوی‌تری دارند. این پژوهش می‌تواند اطلاعات مناسبی را برای درک مکانیسم دخیل در اتصال نانوذرات نقره با پوشش‌های مختلف با HSA در اختیار محققین و فعالان در حوزه دارورسانی بگذارد. همچنین تأثیر نوع پوشش انتخابی در هنگام سنتز نانوذرات نقره را در میزان انتقال و پخش نانوذرات نقره در سیستم خون نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش برهمکنش نانوذرات نقره با سه پوشش متفاوت با اندازه متوسط ۱۰ نانومتر با HSA بررسی گردید. نتایج این مطالعه نشان داد نانوذرات نقره حاوی ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول تمایل بیشتری برای اتصال با HSA دارند. مقدار ΔG° منفی بیانگر خودبه‌خودی بودن فرآیند اتصال نانوذرات نقره با هر سه نوع پوشش با HSA است. مطالعات طیف‌سنجی CD نشان داد در حضور نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول محتوای آلفا هلیکس نسبت به دو نوع دیگر نانوذرات نقره (نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات و نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه) کاهش بیشتری می‌یابد؛ بنابراین نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول و بعداز آن نانوذرات نقره بدون پوشش با HSA برهمکنش قوی دارند و نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات نسبت به دو نوع نانوذرات نقره اتصال ضعیف‌تر با HSA دارند. نتایج این مطالعه بیانگر تأثیر نوع روش احیایی و پوشش انتخابی در هنگام سنتز نانوذرات نقره در میزان برهمکنش نانوذرات با ماکرومولکول‌های حیاتی است و توجه به این نکته در طراحی نانوداروها بسیار حائز اهمیت است.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر به‌عنوان بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد زهرا روشنی، توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات در تاریخ ۱۳۹۶/۲/۳۱ (جلسه شورا ۱۴۲۴۲) تصویب شده است که بدین‌وسیله از همکاری کارشناسان آزمایشگاه‌های زیست‌شناسی

تأثیرگذار است. مطالعه Dong و همکاران (۲۹) در سال ۲۰۱۲ نشان داد پروتئین سرم آلبومین گاوی به‌خوبی جذب سدیم سیترات می‌شود و پروتئین در این شرایط تغییرات ساختاری شاخصی نشان نمی‌دهد. این مشاهده نیز با نتایج این پژوهش منطبق است و بیانگر تأثیر اندک پوشش سیترات سدیم بر میزان برهمکنش نانوذرات نقره و ایجاد تغییرات ساختاری در پروتئین سرم آلبومین انسانی است.

پتانسیل الکتروستاتیک یا پتانسیل زتا اختلاف‌پتانسیل بین آخرین لایه محلول دربرگیرنده ذرات کلئید و اولین لایه غیر متحرک از حلال اطراف ذرات کلئید است. پتانسیل زتا، مقدار دافعه بین ذره مجاور را نشان می‌دهد. میزان پتانسیل زتا اندازه‌گیری شده در HSA برابر با $-16/73 \text{ mV}$ به دست آمد که با عدد گزارش شده در مطالعات پیشین تطابق دارد (۶، ۱۸). کاهش پتانسیل زتا HSA در حضور نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول از $-16/73 \text{ mV}$ به $-11/79 \text{ mV}$ احتمالاً به علت ایجاد برهمکنش غیر کووالانسی و از نوع هیدروژنی با زنجیره جانبی اسیدهای آمینه پروتئین است (۲۸). کاهش پتانسیل زتا HSA در حضور نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات از $-16/73 \text{ mV}$ به $-13/90 \text{ mV}$ احتمالاً به علت وجود جفت یون سیترات سدیم و ایجاد پیوند الکترواستاتیک با پروتئین است، البته از برهمکنش‌های هیدروفوبی نمی‌توان چشم‌پوشی کرد. پروتئین HSA دارای ۵۹ اسیدآمینه لیزین و ۲۴ اسیدآمینه آرژنین است و اکثر اسیدهای آمینه‌های لیزین بر سطح این پروتئین قرار دارند (۳۰). این زنجیره‌های جانبی باردار در اسیدهای آمینه می‌توانند با گروه‌های باردار برهمکنش الکترواستاتیک ایجاد نمایند. برهمکنش الکترواستاتیک می‌تواند منجر به شکل‌گیری ساختارهای جدید با ویژگی‌های جدید گردد. Roy و Das (۳۱) نشان دادند برهمکنش بین نانوذرات نقره با سرم آلبومین گاوی از طریق برهم‌کنش‌های هیدروفوب و الکتروستاتیک انجام می‌شود؛ بنابراین نوع پوشش نانوذرات نقره در نوع برهمکنش و میزان اتصال نانوذرات نقره با HSA مؤثر است، به عبارت دیگر برهمکنش نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول با HSA احتمالاً از نوع برهم‌کنش‌های هیدروژنی و نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات احتمالاً از نوع هیدروفوب و الکتروستاتیک است.

مطالعه Navarro و همکاران (۳۲) در شرایط *in vivo* نشان داد نانوذرات نقره با پوشش اتیلن گلیکول در غلظت بالا سمیت

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

و شیمی فیزیک مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات در پیشبرد این پژوهش تشکر می‌گردد.

References

1. Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol. Lett.* 2008;176(1):1-12.
2. Hekmat A, Saboury AA, Divsalar A. The effects of silver nanoparticles and doxorubicin combination on DNA structure and its antiproliferative effect against T47D and MCF7 cell lines. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2012;8(6):968-82.
3. Fillafer C, Friedl DS, Ilyes AK, Wirth M, Gabor F. Bionanoprobes to study particle-cell interactions. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2009;9(5):3239-45.
4. Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LW, Nie S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nature biotechnology.* 2004;22(8):969-76.
5. De M, Ghosh PS, Rotello VM. Applications of nanoparticles in biology. *Adv. Mater.* 2008;20(22):4225-41.
6. Hekmat A, Hajebrabimi Z, Motamedzade A. Structural Changes of Human Serum Albumin (HSA) in Simulated Microgravity. *Protein Pept Lett.* 2017;24(11):1030-9.
7. Tolaymat TM, El Badawy AM, Genaidy A, Scheckel KG, Luxton TP, Suidan M. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Sci. Total Environ.* 2010;408(5):999-1006.
8. Ajitha B, Divya A, Harish G, Sreedhara Reddy P. The influence of silver precursor concentration on size of silver nanoparticles grown by soft chemical route. *Res J Physical Sci.* 2013;1(7):11-4.
9. Li L, Sun J, Li X, Zhang Y, Wang Z, Wang C, et al. Controllable synthesis of monodispersed silver nanoparticles as standards for quantitative assessment of their cytotoxicity. *Biomaterials.* 2012;33(6):1714-21.
10. Chou K-S, Lai Y-S. Effect of polyvinyl pyrrolidone molecular weights on the formation of nanosized silver colloids. *Mater. Chem. Phys.* 2004;83(1):82-8.
11. Ajitha B, Divya A, Kumar KS, Reddy PS, editors. Synthesis of silver nanoparticles by soft chemical method: Effect of reducing agent concentration. *International Conference on Advanced Nanomaterials & Emerging Engineering Technologies*; 2013: IEEE.
12. Rowe RC, Sheskey P, Quinn ME. Handbook of pharmaceutical excipients. 6th ed. London:Libros Digitales-Pharmaceutical Press; 2009. P. 640-643.
13. Kora AJ, Rastogi L. Enhancement of antibacterial activity of capped silver nanoparticles in combination with antibiotics, on model gram-negative and gram-positive bacteria. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2013;2013:1-7.
14. Amani N, Reza Saberi M, Khan Chamani J. Investigation by fluorescence spectroscopy, resonance rayleigh scattering and zeta potential approaches of the separate and simultaneous binding effect of paclitaxel and estradiol with human serum albumin. *Protein Pept. Lett.* 2011;18(9):935-51.
15. Varlan A, Hillebrand M. Bovine and human serum albumin interactions with 3-carboxyphenoxathiin studied by fluorescence and circular dichroism spectroscopy. *Molecules.* 2010;15(6):3905-19.
16. Hekmat A, Hajebrabimi Z, Motamedzade A. Structural Changes of Human Serum Albumin (HSA) in Simulated Microgravity. *Protein Pept. Lett.* 2017;24(11):1030-9.
17. Pashah Z, Hekmat A, Hesami Tackallou S. Structural effects of Diamond nanoparticles and Paclitaxel combination on calf thymus DNA. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2019;38(4):249-78.
18. Hosainzadeh A, Gharanfoli M, Saberi MR, Chamani J. Probing the interaction of human serum albumin with bilirubin in the presence of aspirin by multi-spectroscopic, molecular modeling and zeta potential techniques: Insight on binary and ternary systems. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2012;29(5):1013-50.



19. Güzel R, Erdal G. Silver Nanoparticles-Fabrication, Characterization and Applications. 1st ed. London: IntechOpen; 2018. P. 3-21.
20. Gebregeorgis A, Bhan C, Wilson O, Raghavan D. Characterization of silver/bovine serum albumin (Ag/BSA) nanoparticles structure: morphological, compositional, and interaction studies. *J. Colloid Interface Sci.* 2013;389(1):31-41.
21. Voicescu M, Ionescu S, Angelescu DG. Spectroscopic and coarse-grained simulation studies of the BSA and HSA protein adsorption on silver nanoparticles. *J Nanopart. Res.* 2012;14(10):1-13.
22. Zhao X, Liu R, Teng Y, Liu X. The interaction between Ag⁺ and bovine serum albumin: a spectroscopic investigation. *Science of the Total Environment.* 2011;409(5):892-7.
23. Huang S, Qiu H, Lu S, Zhu F, Xiao Q. Study on the molecular interaction of graphene quantum dots with human serum albumin: combined spectroscopic and electrochemical approaches. *J Hazard Mater.* 2015;285:18-26.
24. Shamsi A, Ahmed A, Bano B. Probing the interaction of anticancer drug temsirolimus with human serum albumin: Molecular docking and spectroscopic insight. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2018;36(6):1479-89.
25. Wang Y, Wang X, Wang J, Zhao Y, He W, Guo Z. Noncovalent interactions between a trinuclear monofunctional platinum complex and human serum albumin. *Inorg. Chem.* 2011;50(24):12661-68.
26. Fu X-B, Liu D-D, Lin Y, Hu W, Mao Z-W, Le X-Y. Water-soluble DNA minor groove binders as potential chemotherapeutic agents: synthesis, characterization, DNA binding and cleavage, antioxidation, cytotoxicity and HSA interactions. *Dalton Trans.* 2014;43(23):8721-37.
27. Corrêa DH, Ramos CH. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *Afr. J. Biochem. Res.* 2009;3(5):164-73.
28. Ragi C, Sedaghat-Herati M, Ouameur AA, Tajmir-Riahi H. The effects of poly (ethylene glycol) on the solution structure of human serum albumin. *Biopolymers.* 2005;78(5):231-6.
29. Dong Y-l, Ren C, Zhang Z-y, Chen X. Protein adsorption on citrate modified magnetic nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2012;12(3):2598-606.
30. Temple A, Yen TY, Gronert S. Identification of specific protein carbonylation sites in model oxidations of human serum albumin. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2006;17(8):1172-80.
31. Roy S, Das TK. Spectroscopic studies of interaction between biologically synthesized silver nanoparticles and bovine serum albumin. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014;14(7):4899-905.
32. Navarro E, Wagner B, Odzak N, Sigg L, Behra R. Effects of differently coated silver nanoparticles on the photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* 2015;49(13):8041-7.



Original Article

The Effects of Silver Nanoparticles Coatings in Effective Drug Delivery: Human Serum Albumin Interaction

Hekmat A*, Roshani Z

Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 17 Dec 2019

Accepted: 31 Mar 2020

Abstract

Background & Objective: Silver nanoparticles (AgNPs) are increasingly used in nanomedicine and pharmacy due to their valuable properties. AgNPs are synthesized in various ways. The amount of drug binding to Human Serum Albumin (HSA) as the most abundant protein in the circulatory system would affect the drug's therapeutic concentration and its availability for intracellular targets. Thus, the purpose of this study was to investigate the effect of coating in the synthesis of AgNPs on their ability to interact with HSA.

Materials & Methods: Fluorescence emission spectroscopy, circular dichroism (CD) spectroscopy, and Zeta potential analysis were used to study the structural effects of HSA after interaction with AgNPs with *ethylene glycol dispersion matrix*. AgNPs contains sodium citrate stabilizer and uncoated AgNPs.

Results: The fluorescence quenching indicated that AgNPs with *ethylene glycol dispersion matrix* interacted with HSA with a higher binding constant value compared with two other AgNPs. The CD spectra indicated a reduction in α -helix content of HSA especially after the addition of AgNPs with *ethylene glycol dispersion matrix* (from 51.45% to 41.71%). The zeta potential analysis showed that the surface charge of HSA was reduced especially after the addition of AgNPs with ethylene glycol dispersion matrix (from -16.73 mV to -11.79 mV).

Conclusion: This study showed that AgNPs with ethylene glycol dispersion matrix interact with HSA more strongly compared with two other AgNPs. This study indicated that the type of coating of AgNPs affects the HSA interaction and consequently affects the nanoparticles transportation and distribution in the blood.

Keywords: Human Serum Albumin (HSA), Silver nanoparticles, Synthesis

*Corresponding Author: Hekmat Azadeh, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Email: hekmat@ut.ac.ir

<https://orcid.org/0000-0003-0123-1575>