

Effects of PEGylated Silver Nanoparticles on the Structure, Function, and Concentrations of Different Forms of Hemoglobin

Samane Zolghadri Jahromi ^{1,*}, Ali Akbar Saboury ²

1. Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

2. Institute Of Biophysics and Biochemistry, Tehran University

(Received: 2017/02/11

Accept: 2018/05/12)

Abstract

Background: The material is always covered by proteins immediately upon contact with a physiological environment. Hemoglobin (Hb) is one of the major blood proteins. Due to the entry of substances into blood, hemoglobin may interact with them. The interaction between Hemoglobin and ligands such as nanoparticles is very important and may cause structural and functional changes on Hemoglobin. According to the recent studies, PEG (poly ethylene glycol) coated nanoparticles have better biocompatibility compared with non-coated nanoparticles, thus the present study was conducted to investigate the interaction of PEG-silver nanoparticles with hemoglobin.

Materials and Methods: In the present experimental study, various spectroscopic methods, including UV Visible, fluorescence, and Circular Dichroism (CD), were used to evaluate the interaction of silver nanoparticles with polyethylene glycol coating and hemoglobin. Using these methods, the effects of nanoparticles on the second structure and variations in the alpha helix and beta sheets of the protein, as well as changes in the third structure, and thus the change in the protein function, were investigated.

Results: The results of fluorescence spectroscopy and UV/Vis absorption spectroscopy indicated that the structure of the Trp residue environments was altered and the physiological functions of Hb were affected by silver nanoparticles coated with poly ethylene glycol. It could also be suggested that due to the binding of silver nanoparticle to Hb, some conformational changes are induced, enhancing the hydrophobicity. These nanoparticles have increased the ratio of deoxy and decreased hemoglobin tendency to oxygen. This increase in the highest concentration of nanoparticles is six times as common.

Conclusion: The results showed that PEGylated silver nanoparticles lead to secondary structural changes and hemoglobin unfolding. Therefore, PEGylated silver nanoparticles decrease the hemoglobin function by decreasing the hemoglobin tendency toward oxygen. As a result, silver nanoparticles may cause the molecular toxicity of proteins. Considering the results obtained and the importance of nanoparticles biosafety, it is suggested that by changing the coating, size, or shape of nanoparticles and optimizing them, the possible side effects of nanoparticles on the structure and function of the protein can be prevented.

Keywords: Silver Nanoparticle; Hemoglobin; Interaction

*Corresponding author: Samane Zolghadri Jahromi
Email: Z.jahromi@ut.ac.ir

بررسی آثار نانوذرات نقره به فرم پگیده بر ساختار، عملکرد و غلظت فرم‌های مختلف هموگلوبین

سمانه ذوالقدری جهرمی^{۱*}، علی اکبر صبوری^۲

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۲/۲۲

چکیده:

سابقه و هدف: مواد همیشه در برخورد با یک محیط فیزیولوژیک به سرعت از سوی پروتئین‌ها احاطه می‌شوند. هموگلوبین هم که یکی از پروتئین‌های مهم و کارساز خون به شمار می‌آید، به دلیل ورود مواد به خون ممکن است با آن‌ها وارد برهم کنش شود. اندرکنش لیگاند‌ها با این مولکول بسیار مهم است و این احتمال وجود دارد که در اثر اتصال لیگاند‌های مختلف از جمله نانوذرات با هموگلوبین، تغییرهایی در ساختار سوم آن ایجاد شود که سبب تغییر در عملکرد آن شود. با توجه به این که فرم پگیده نانوذرات دارای سازگاری زیستی مناسب‌تری نسبت به نانوذرات بدون پوشش است، در این تحقیق بررسی اندرکنش نانوذرات نقره به فرم پگیده با هموگلوبین خون انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، از روش‌های مختلف طیف‌سنجی شامل مرئی ماورای بنفش، فلورسانس و دورنگ‌نمایی حلقوی برای ارزیابی اندرکنش نانوذرات نقره با پوشش پلی‌اتیلن گلیکول و هموگلوبین استفاده شده است و با استفاده از این روش‌ها، آثار نانوذرات بر ساختار دوم، تغییر در میزان آلفا هلیکس و صفحات بتای پروتئین و همچنین تغییر در ساختار سوم و در نتیجه تغییر در عملکرد پروتئین بررسی شده است.

یافته‌ها: نتایج طیف‌سنجی فلورسانس و طیف‌سنجی جذبی مرئی ماورای بنفش نشان داد که ساختار محیط اطراف اسید آمینه تریپتوفان تغییر کرده و عملکرد فیزیولوژیک هموگلوبین تحت تاثیر نانوذرات نقره با پوشش پلی‌اتیلن گلیکول قرار گرفته است. همچنین اتصال نانوذرات نقره پگیده به هموگلوبین سبب برخی تغییرات در شکل فضایی آن و در نتیجه افزایش آب‌گریزی سطح شده است. این نانوذرات سبب افزایش نسبت دی‌اکسی و کاهش تمایل هموگلوبین نسبت به اکسیژن شده‌اند. این افزایش در بیشترین غلظت نانوذرات شش برابر حالت معمول است.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل نشان می‌دهد نانوذرات نقره پگیده با ایجاد تغییر در ساختمان دوم پروتئین و باز شدگی ساختار سوم هموگلوبین سبب تغییر در عملکرد پروتئین می‌شوند، بنابراین نانوذرات نقره پگیده با کاهش تمایل هموگلوبین نسبت به اکسیژن به کاهش قابل توجه عملکرد هموگلوبین منجر می‌شوند. با توجه به نتایج به دست آمده و اهمیت ایمنی زیستی در استفاده از ترکیب‌های نانو، پیشنهاد می‌شود با تغییر پوشش، اندازه یا شکل نانوذرات و انتخاب بهینه آن‌ها، از عوارض احتمالی نانوذرات بر ساختار و عملکرد پروتئین جلوگیری شود.

واژگان کلیدی: نانوذرات نقره پگیده، هموگلوبین، برهم کنش

مقدمه:

لیگاند‌های مختلف با این مولکول، می‌تواند به تغییر در عملکرد هموگلوبین (اتصال و آزادسازی اکسیژن) منجر شود. از این رو ذرات نانو نیز که به تازگی به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود، به طور گسترده‌ای برای کاربردهای درمانی مورد توجه واقع شده‌اند[۱]، می‌توانند در کنار کاربردهای موثر خود، در اثر اتصال با

هموگلوبین خون یکی از پروتئین‌های مهم است که دارای ساختار کروی چهار زیر واحدی (شامل دو زیر واحد آلفا و دو زیر واحد بتا) است. هر زیر واحد توانایی حمل یک مولکول اکسیژن را دارد. تغییرهای ساختاری ایجاد شده در اثر اتصال

نویسنده مسئول: سمانه ذوالقدری جهرمی

پست الکترونیکی: z.jahromi@ut.ac.ir

پلی اتیلن گلیکول ۱۰ nm تهیه شده از شرکت Biocera کره جنوبی، همین (Hemin) خریداری شده از شرکت سیگما، بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH ۷/۴ (نمک‌های مربوطه از شرکت مرک خریداری شده است).

همچنین برای استخراج هموگلوبین از خون تازه، سدیم سیترات ۴ درصد (شرکت مرک) سالی، بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH ۷/۴ (شرکت مرک)، آب دوبار تقطیر سرد و نمک سولفات آمونیوم ۲۰ درصد (شرکت مرک) استفاده شد.

ب: تجهیزات دستگاهی

pH متر (ساخت کشور سوئیس)، همزن آزمایشگاهی (تکنوژن ساخت ایران)، ترازو آزمایشگاهی (ساخت کشور ژاپن) سانتریفیوژ (بکمن ساخت کشور آلمان)، دستگاه طیف سنجی فلورسانس (وریان ساخت کشور استرالیا)، دستگاه طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی (اوبو ساخت کشور آمریکا)، دستگاه طیف سنجی مرئی ماورای بنفش (شیماتزو ساخت کشور ژاپن و کری ۱۰۰ ساخت استرالیا)، دستگاه الکتروفورز (ساخت ایران)، گرماسنج تیتراسیون همدا (میکروکال ساخت کشور آمریکا).

ج: روش‌ها

استخراج هموگلوبین از خون انسان:

برای استخراج هموگلوبین از خون تازه مراحل زیر به ترتیب انجام شد: ۹ میلی لیتر از خون تازه به یک میلی لیتر سدیم سیترات ۴ درصد اضافه شد. برای جدا کردن سرم، محلول خونی به مدت ۱۵ دقیقه با ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. نمونه سانتریفیوژ شده سرریز شد. سپس معادل ۱۰ حجم سالی ۰/۹ درصد اضافه شد. در مرحله بعد ۱۵ دقیقه با ۱۰ هزار دور سانتریفیوژ و بعد سرریز شد. سپس ۵ حجم بافر فسفات ۰/۲ مولار pH ۷/۴ اضافه شد. این محلول به مدت ۱۵ دقیقه و با ۵ هزار دور سانتریفیوژ و سپس سرریز شد. مرحله بعد آب دوبار تقطیر سرد به اندازه ۹ برابر حجم رسوب برای لیز کردن گلبول‌های قرمز افزوده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۸ هزار سانتریفیوژ انجام شد. محلول رویی را جدا کرده و سپس نمک سولفات آمونیوم ۲۰ درصد اضافه کرده و ۱۵ دقیقه در حالت ایستا قرار داده و سپس با دور ۱۴ هزار در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت سانتریفیوژ شد. به این ترتیب، محلول رویی که هموگلوبین است از رسوبی که شامل جداره سلول‌هاست، جدا شد. سپس محلول رویی با بافر فسفات به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت ۳ بار دیالیز شد. در مرحله آخر نمونه فریز شد [۲۸-۳۱-۲۶-۲۹].

الکتروفورز هموگلوبین:

برای تایید تخلیص هموگلوبین استخراج شده از خون انسان، الکتروفورز هموگلوبین با ژل پلی اکریلامید SDS انجام شده و با نمونه‌های شرکت مرک و سیگما مقایسه شد.

طیف سنجی UV-Visible:

طیف جذبی مرئی ماورای بنفش در محدوده ۲۵۰ تا ۵۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ثبت شد. طیف سنجی‌های جذبی هموگلوبین، آپوهموگلوبین و hemin ۱/۵-۳ میکرومولار در حضور و در غیاب غلظت‌های مختلف لیگاند (۰، ۱۸/۷، ۲۸، ۳۷/۴ و ۴۷ میکرومولار) انجام شد. تمامی آزمایش‌های طیف‌سنجی در pH ۷/۴ و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با سه بار تکرار انجام شده است.

طیف سنجی فلورسانس:

برای اندازه‌گیری شدت نشر فلورسانس ذاتی هموگلوبین و مطالعه تأثیر نانوذرات مختلف بر ساختار هموگلوبین از غلظت ۳ میکرومولار هموگلوبین استفاده شد. طول موج تحریک ۲۸۰ نانومتر بوده است. آزمایش‌ها در غلظت‌های مختلف نانوذرات و در دماهای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با سه بار تکرار، انجام شد. پهنای شکافت نشر و جذب به ترتیب ۵ و ۱۰ نانومتر تنظیم شد. طول سل مورد استفاده یک سانتی‌متر بوده است.

طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی (Circular Dichroism):

طیف سنجی CD براساس اختلاف جذب نور پلاریزه چپ گرد و راست گرد است. طیف‌های در ناحیه فرابنفش دور (۱۹۰ تا ۲۶۰ نانومتر) که منطبق بر جذب پیوندهای پپتیدی است با دستگاه اسپکتروپلاریمتر اویو مدل ۲۱۵ (لایک وود ساخت آمریکا) به دست آمده است.

پروتئین‌های مختلف موجود در خون از جمله هموگلوبین سبب تغییرهایی در ساختار و عملکرد این مولکول‌های مهم شوند.

لازم به ذکر است، اندازه مشابه این نانوذرات با ملکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، همچنین ویژگی‌های رفتاری برخی از آن‌ها مانند رفتارهای مغناطیسی یا فلورسانس سبب استفاده روزافزون آن‌ها در علوم زیست‌شناسی و پزشکی شده است [۲]. از سوی دیگر، پروتئین‌ها در راستای عملکرد بخشیدن به نانو مواد به کار می‌روند. همچنین از ویژگی‌های پروتئین می‌توان در راستای احساس و تشخیص تا انتقال استفاده کرد. در مقابل، نانو مواد هم تأثیر قدرتمندی بر ساختار و عملکرد پروتئین‌ها دارند که تلاش فراوانی برای فهم اصولی این اثرها در حال انجام است. فهم دقیق اندرکنش پروتئین-نانو مواد می‌تواند در طراحی کاربردی پروتئین-نانو مواد مفید واقع شود که از چند زاویه از لحاظ صنعتی حائز اهمیت است: ۱- در طراحی زیست حسگرها ۲- طراحی سیستم‌های انتقال دارو ۳- ساخت نانو کامپوزیت‌های عملکردی ۴- تصویربرداری مولکولی از سلول‌های زنده. علاوه بر جنبه صنعتی اندرکنش پروتئین و آنزیم با نانو مواد، جنبه پزشکی و آثار زیان‌آور نانو مواد بر این ارگان‌ها به عنوان مهم‌ترین بخش موجود زنده و تغییر خصوصیات ساختاری و عملکردی آن‌ها نیز موضوع بسیار مهمی است. در حال حاضر در جامعه پزشکی، این امر به خوبی پذیرفته شده است که سطوح مواد در یک محیط زیستی، با جذب مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها تغییر می‌یابند [۳-۱۲] و این اجماع وجود دارد که پاسخ‌های سلولی به مواد در یک محیط زیستی بیش از این که ناشی از خود آن‌ها باشد، بازتاب لایه زیستی جذب شده است [۳]. مطالعه‌های اولیه در زمینه برهم‌کنش پروتئین‌ها با سطوح مختلف ناظر به این واقعیت است که ممکن است ساختار پروتئین نیز در اثر جذب تغییر کند. به همین منظور مطالعه اندرکنش پروتئین‌ها و سطوح جدی به نظر می‌رسد [۱۳-۱۷]. با وجود این حقیقت که اولین برخورد نانوذرات پس از ورود به یک محیط فیزیولوژیک با پروتئین‌هاست اما در این زمینه هنوز تحقیق کاملی انجام نشده است.

از میان نانوذرات، نانوذرات نقره در بخش پزشکی بیشترین درجه تجاری شدن را به خود اختصاص داده است. ویژگی‌های آنتی‌باکتریال این نانوذرات حتی در غلظت‌های بسیار کم هم قابل توجه است. دیدگاه افراد این است که این نانوذرات برخی موارد به نسبت غیرسمی هستند [۱۸-۱۹]. مطالعه‌های دیگری نشان می‌دهد که نانوذرات نقره با پوشش سیترات خواص آنتی‌باکتریال قویتری نسبت به نانوذرات نقره بدون پوشش نشان می‌دهند [۲۰]. هم چنین تاکنون مطالعه‌های مختلفی در رابطه با برهم‌کنش نانوذرات نقره با پروتئین‌ها و، از جمله آلبومین و هموگلوبین انجام شده است. برهم‌کنش نانوذرات نقره با آلبومین سرم نشان می‌دهد که این نانوذرات سبب کاهش ساختارهای هلیکس آلبومین می‌شوند [۲۱-۲۲]. این مطالعه‌ها نشان می‌دهد پوشش نانوذرات نقره می‌تواند سبب کاهش اتصال آن‌ها با هموگلوبین و افزایش خاصیت آنتی‌باکتریال آن‌ها شود [۲۰].

برهم‌کنش هموگلوبین با تعدادی از مولکول‌های کوچک دیگر مثل دی‌متیل سولفوکسید [۲۳]، مولکول‌های آب‌دوست [۲۴-۲۷] و همتاپورفیرین‌ها [۲۶] گزارش شده است. همچنین جذب هموگلوبین روی نانوذرات سیلیسی، زیرکونیوم و تیتانیوم نیز مطالعه شده است [۲۷-۲۸]. در اثر اندرکنش لیگاندها با هموگلوبین ممکن است تغییرهایی در ساختار سوم هموگلوبین ایجاد شده و بنابراین تعادل $R \rightleftharpoons T$ را به سمت چپ یا راست جابه‌جا کند؛ بنابراین تمایل اتصال هموگلوبین به اکسیژن را کاهش یا افزایش دهد.

همان‌طور که اشاره شد تحقیقات نشان می‌دهد نانوذراتی که دارای پوشش مناسب هستند اثرات کمتری بر سمیت سلولی دارند و بنابراین زیست سازگاری بیشتری از خود نشان می‌دهند. بنابراین هدف نهایی از انجام این تحقیق بررسی آثار نانوذرات نقره پگیله با کاربردهای پزشکی و داروسازی بر گونه‌های مختلف هموگلوبین است.

مواد و روش‌ها:

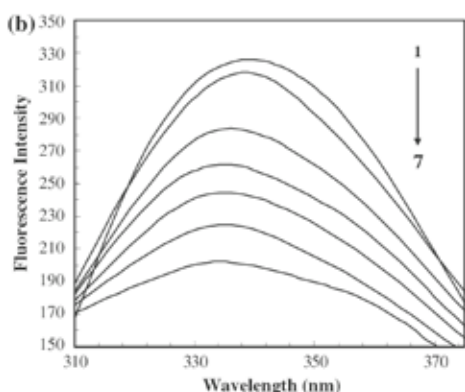
الف: مواد

هموگلوبین انسانی استخراج شده از نمونه خون انسان، نانوذرات نقره با پوشش

ج: ویژگی‌های اتصال نانوذرات نقره به هموگلوبین به کمک روش فلوریمتری

فلورسانس ذاتی پروتئین‌هایی که دارای اسید آمینه تیروزین یا تریپتوفان هستند یک شیوه مهم برای درک ویژگی‌های دینامیکی و کنفورماسیونی ماکرومولکول‌های زیستی به شمار می‌آید. هموگلوبین در هر دایمر □□□ دارای سه اسید آمینه تریپتوفان و در مجموع دارای ۶ اسید آمینه تریپتوفان (two □-14 Trp, two □-15 Trp, □-37 Trp) است. فلورسانس ذاتی هموگلوبین بیشتر ناشی از تریپتوفان □-37 است. این اسید آمینه در نزدیکی گروه هم قرار دارد [۳۳-۳۰-۳۵].

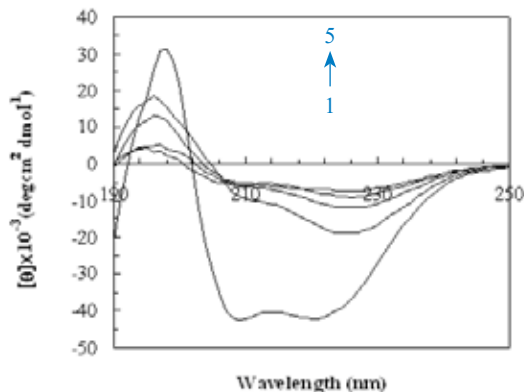
طیف فلورسانس هموگلوبین در حضور و غیاب نانوذرات نقره و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ثبت شد (شکل ۳). شکل نشان‌دهنده یک جابه‌جایی به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر (جابه‌جایی آبی) و کاهش شدت نشر ماکزیمم در اثر افزایش غلظت نانوذرات است.



نمودار ۲: طیف فلورسانس هموگلوبین و نانوذرات نقره با پوشش پلی اتیلن گلیکول - هموگلوبین. غلظت هموگلوبین ۳ میکرومولار و غلظت نانوذرات نقره ۱ تا ۷ به ترتیب برابر با ۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰، ۱۱۰، ۱۳۰ و ۱۵۰ میکرومولار می باشد. دما برابر با ۳۷ درجه سانتیگراد و pH ۷ می باشد.

د: مطالعه‌های دورنگ نمای حلقوی

طیف CD هموگلوبین دارای دو کمینه در طول موج های ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر است که نشان‌دهنده محتوای هلیکسی پروتئین است. شکل (۴) تغییر در طیف هموگلوبین را در اثر افزایش نانوذرات نقره در دمای ۳۷ نشان می‌دهد. همان طور که در شکل قابل مشاهده است در اثر افزایش نانوذرات نقره به محلول هموگلوبین بیضی واری در دو طول موج ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر تغییر معناداری نشان می‌دهد.



نمودار ۳: طیف دورنگ‌نمایی حلقوی هموگلوبین و هموگلوبین- نانوذرات نقره با پوشش پلی‌اتیلن گلیکول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (pH ۷ و غلظت ۲۵ mg/ml). هموگلوبین و غلظت نانوذرات نقره‌ها ۱ تا ۵ به ترتیب ۰، ۱۸/۷، ۳۷/۴، ۷۴/۸ میکرومولار است.

هدف از آنالیز فوق دسترسی به میزان ساختارهای دوم منظم هموگلوبین بوده است. محلول‌های پروتئینی در بافر فسفات تهیه شده‌اند. از غلظت محلول پروتئینی ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و غلظت‌های مختلف نانوذرات استفاده شد. از سل یک سانتی‌متری استفاده شد.

آزمایش‌های انجام شده در غیاب و حضور نانوذرات و با سه بار تکرار انجام شد ضمن اینکه نانوذرات به مدت حداقل ۲ دقیقه با هموگلوبین انکوبه شدند. نتایج بر حسب بیضی واری به اندازه متوسط وزن مولکولی برای آمینو اسید برابر ۱۱۵ ارائه شده است ۳۲-۲۹.

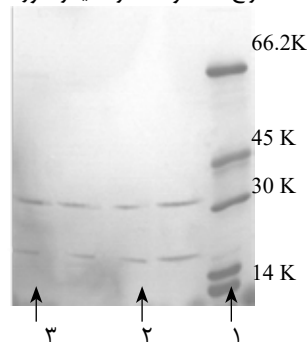
محاسبات آماری:

تمامی آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شده است و نمودارها بر اساس میانگین و انحراف معیار و با استفاده از نرم‌افزار اکسل گزارش شده است.

یافته‌ها:

الف- الکتروفورز هموگلوبین

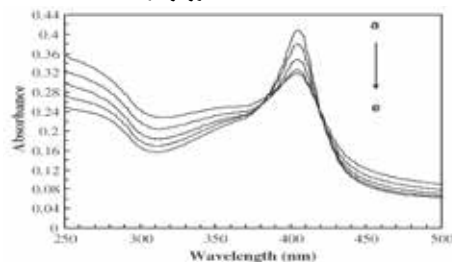
اولین مرحله پس از استخراج هموگلوبین از خون انسان تعیین غلظت بود که با استفاده از معرف برادفورد انجام شد. سپس نمونه‌ها روی ژل SDS برده شد و خلوص نمونه هموگلوبین در مقایسه با هموگلوبین تهیه شده از شرکت سیگما، مارکر و چند نمونه استخراج شده توسط افراد دیگر مورد تایید واقع شد (شکل ۱).



شکل ۱: بررسی تخلیص هموگلوبین بر روی ژل SDS-PAGE
۱ مارکر وزن مولکولی، ۲ نمونه خالص شده هموگلوبین، ۳ هموگلوبین سیگما

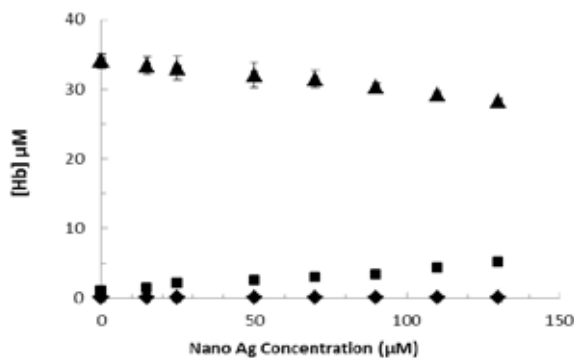
ب: طیف جذبی برای بررسی اندرکنش نانوذرات نقره با هموگلوبین

هموگلوبین دارای دو پیک جذبی در ۲۷۸ و ۴۰۶ نانومتر است. هموگلوبین دارای ۴ گروه هم در نزدیکی سطح است. پیک ۴۰۶ نانومتری مربوط به گروه هم و معروف به باند سورت است. این باند جذبی اطلاعاتی درباره تغییرهای کنفورماسیونی منطقه هم فراهم می‌آورد. طیف جذبی هموگلوبین در حضور و غیاب نانوذرات نقره طیف جذبی هموگلوبین در حضور و غیاب نانوذرات نقره در شکل ۲ ترسیم شده است. همان طور که در شکل مشاهده می کنید با افزودن غلظت نانوذرات به محلول هموگلوبین جذب در ناحیه سورت کاهش یافته است در حالی که در محل پیک تغییری مشاهده نمی‌شود. هم‌چنین جذب پروتئین در ناحیه ۲۷۸ نانومتر افزایش نشان می‌دهد. در این آزمایش غلظت هموگلوبین ۱/۵ میکرومولار و غلظت نانوذرات نقره ۰، ۱۸/۷، ۲۸، ۳۷/۴، ۴۷ میکرومولار انتخاب شده است.

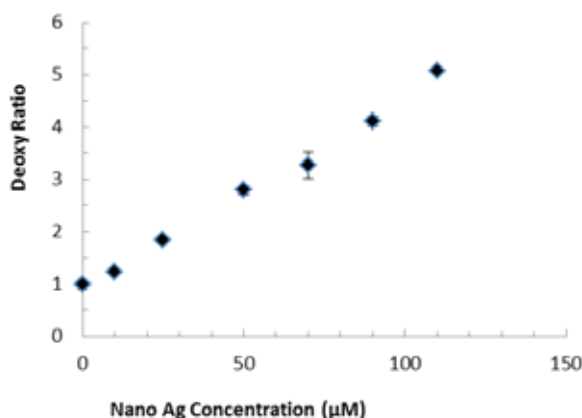


نمودار ۱: طیف جذبی هموگلوبین و نانوذرات نقره با پوشش پلی‌اتیلن گلیکول - هموگلوبین. غلظت هموگلوبین ۱/۵ میکرومولار و غلظت نانوذرات نقره برابر با ۰، ۱۸/۷، ۲۸، ۳۷/۴، ۴۷ میکرومولار است. دما برابر با ۲۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۷/۴ است.

در بیشترین غلظت نانوذرات شش برابر حالت معمول است.



نمودار ۵: نمودار غلظت لیگاند (نانوذرات نقره با پوشش پلی اتیلن گلیکول) علیه غلظت گونه‌های اکسی(■)، دی اکسی (▲) و مت (▲) هموگلوبین. نمودار بر اساس میانگین و انحراف معیار گزارش شده است.



نمودار ۶: نمودار غلظت لیگاند (نانوذره نقره با پوشش پلی اتیلن گلیکول) علیه نسبت دی اکسی هموگلوبین. نمودار بر اساس میانگین و انحراف معیار گزارش شده است.

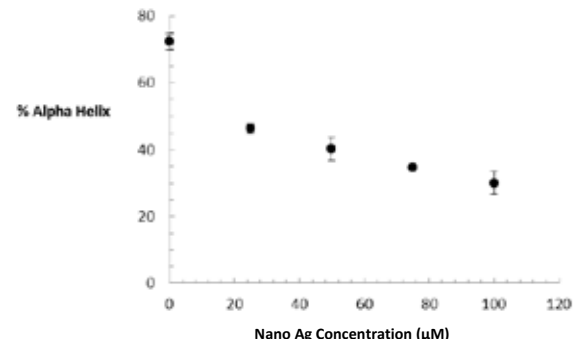
بحث و نتیجه گیری:

بررسی‌های انجام شده در این تحقیق نشان داد که نانوذره نقره با پوشش پلی اتیلن گلیکول، اثر قابل توجهی بر ساختار و عملکرد هموگلوبین دارند.

همان طور که نتایج طیف‌سنجی مرئی ماورای بنفش نشان داد، با افزودن غلظت نانوذرات به محلول هموگلوبین جذب در ناحیه سورت کاهش می‌یابد. در حالی که در محل پیک تغییری مشاهده نمی‌شود. همچنین طیف جذبی پروتئین در ناحیه ۲۷۸ افزایش نشان داد. این تغییرهای طیفی معنادار نشان می‌دهد. گروه‌های هم متصل به پروتئین مورد هدف نانوذرات نقره با پوشش پلی اتیلن گلیکول قرار گرفته‌اند و سبب تغییر موقعیت هم در جایگاه خود شده است.

همچنین با آنالیز داده‌های حاصل از طیف‌سنجی دو رنگ‌نمایی حلقوی مشخص شد که نانوذرات نقره سبب کاهش ساختار هلیکسی هموگلوبین و افزایش ساختار بتای آن شده است. به طوری که در بیشترین غلظت نانوذرات بیش از ۵۰ درصد از ساختار آلفا کاسته شده و در حدود ۲۰ درصد به ساختار بتا افزوده شده است. به عبارت دیگر افزودن نانوذرات به هموگلوبین سبب تغییر در ساختار دوم هموگلوبین و انتقال ساختار از هلیکس به بتا گردیده است. با افزایش محتوای بتا نیز آگریزی پروتئین افزایش می‌یابد. این نتیجه همسو با نتایج یک محقق هندی است که نشان داد در اثر برهم‌کنش هموگلوبین با نانوذرات نقره به واسطه افزایش ساختارهای بتا تغییرهای ساختاری گسترده‌ای رخ می‌دهد [۳۸]. همچنین در تحقیق دیگری برای

با آنالیز داده‌های حاصل از طیف سنجی دورنگ‌نمایی حلقوی توسط نرم‌افزار CDNN مشخص شد که نانوذرات نقره سبب کاهش ساختار هلیکسی هموگلوبین و افزایش ساختار بتای آن شده‌اند. به طور کلی ۷۴ درصد از ساختار طبیعی هموگلوبین دارای ساختار آلفا هلیکس و ۸/۵ درصد دارای ساختار بتا است. در این تحقیق، نمونه طبیعی هموگلوبین در غیاب نانوذرات دارای ۷۰ درصد ساختار هلیکس و ۱۰ درصد ساختار بتا بوده است ۳۶-۳۳. افزودن نانوذرات در بیشترین غلظت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد سبب کاهش بیش از ۶۰ درصد از ساختار آلفا (شکل ۵) و در حدود ۲۰ درصد افزایش ساختار بتا شده است.



نمودار ۷: کاهش هلیسیتی هموگلوبین در اثر افزایش نانوذرات نقره در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد. نمودار بر اساس میانگین و انحراف معیار گزارش شده است.

۵: تاثیر نانوذرات بر گونه‌های مختلف هموگلوبین

در یک محلول هموگلوبین، شکل‌های مختلفی از هموگلوبین با غلظت‌هایی مشخص دیده می‌شود که عبارت است از شکل اکسی، دی اکسی و مت هموگلوبین. شکل اکسی هموگلوبین همان شکل اکسیژن‌دار هموگلوبین و دی اکسی هموگلوبین شکل بدون اکسیژن هموگلوبین است. مت هموگلوبین حالتی بین اکسی و دی اکسی هموگلوبین بوده که در آن آهن در حالت اکسید Fe^{3+} و کنفورماسیون شل (R) قرار داشته و قادر به حمل اکسیژن نیست ۳۷. برای تعیین غلظت گونه‌های مختلف هموگلوبین در محلول از روابط زیر استفاده می‌شود.

$$[met] = (2.6828 A_{630} + 0.174 A_{576} - 0.3414 A_{560}) \times 10^{-4} M$$

$$[deoxy] = (1.335 A_{560} - 0.7356 A_{576} - 0.6254 A_{630}) \times 10^{-4} M$$

$$[oxy] = (1.0154 A_{576} - 0.2772 A_{630} - 0.742 A_{560}) \times 10^{-4} M$$

در این مطالعه، به منظور جلوگیری از تشکیل شکلهای دایمر هموگلوبین از نمونه هموگلوبینی با غلظت بالا (۶-۴ mg/ml) استفاده شده است.

همان طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت نانوذرات نقره از شکل اکسیژن دار هموگلوبین کاسته شده و به شکل بدون اکسیژن آن افزوده می‌گردد. در حالیکه در غلظت شکل مت هموگلوبین تغییری حاصل نشده است.

و: بررسی عملکرد هموگلوبین در حضور نانوذرات با استفاده از نسبت دی اکسی

با استفاده از نسبت دی اکسی به جای P_{50} (فشاری که در آن ۵۰ درصد هموگلوبین از اکسیژن اشباع شده باشد) می‌توان تمایل هموگلوبین برای اتصال به اکسیژن را بررسی کرد. زیرا در تعادل $R \leftrightarrow T$ (ساختار سخت $\leftrightarrow$ ساختار شل) هر عاملی که شکل T یا دی اکسی را بیشتر افزایش دهد باعث کاهش تمایل هموگلوبین به اکسیژن می‌شود. نسبت دی اکسی عبارت است از غلظت شکل دی اکسی در حضور لیگاند تقسیم بر غلظت شکل دی اکسی همان نمونه در غیاب لیگاند. شکل ۷ میزان تاثیر نانوذرات نقره را بر نسبت دی اکسی نشان می‌دهد. این نانوذره سبب افزایش نسبت دی اکسی و کاهش تمایل هموگلوبین نسبت به اکسیژن می‌شود. این افزایش

آبی) و شدت نشر ماکزیمم نیز کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد کاهش شدت نشر فلورسانس در اثر افزودن نانوذرات گویای این است که محل اتصال نانوذرات در نزدیکی تریپتوفان است. تغییر در طول موج ماکزیمم و کاهش آن به سمت طول موج‌های کوتاه تر نیز نشان‌دهنده افزایش آبریزی سطح پروتئین در اثر افزایش غلظت نانوذرات نقره است.

محدودیت‌های تحقیق: با توجه به هزینه‌های مواد و تعدد روش‌های بررسی، تعداد تکرارها سه بار انتخاب شد که تکرار بیشتر آب شده نانوذرات، در برخی از روش‌ها به دلایل مختلف از جمله خطای آزمایش، از نتایج حذف شد.

نتیجه‌گیری: بر اساس آنچه گفته شد تغییر در خصوصیات رفتاری و عملکردی هموگلوبین می‌تواند آثار زیان‌آوری را بر موجودات زنده داشته باشد. از آنجا که تغییرهای کنفورماسیونی القایی حاصل از اندرکنش نانومواد با پروتئین‌های خون به عنوان آثار مخرب این ترکیب‌ها مطرح است، در نتیجه نتایج حاصل می‌تواند اطلاعات مفیدی برای شناسایی و معرفی ترکیب‌هایی با عوارض جانبی و سمیت کمتر در اختیار ما قرار دهد. از نتایج این تحقیق می‌توان دریافت که اتصال نانوذرات نقره به هموگلوبین سبب تغییر ساختار آن شده است به نحوی که در اثر این تغییر ساختار محتوای هلیکسی آن کاهش و بر محتوای بتای آن افزوده شده است. به بیان دیگر ساختار پروتئین تا حد زیادی باز شده است نتیجه این امر می‌تواند افزایش آبریزی سطح پروتئین باشد که آن نیز به آغاز پدیده خودتجمعی هموگلوبین منجر می‌شود. انعکاس این تغییر ساختار در تغییر عملکرد پروتئین نیز مشهود است به طوری که این تغییرهای ساختاری به تغییر در سطح پاکت آبریز هم نیز منجر گردیده است؛ بنا بر تمایل اتصال هموگلوبین نیز تاثیر گذاشته است و بر خلاف آنچه انتظار می‌رفت پوشش پلی اتیلن گلیکول منجر به عدم ایجاد برهم کنش بین نانوذرات نقره با هموگلوبین نشد. هر چند این احتمال وجود دارد که نانوذرات نقره بدون پوشش اثرات شدیدتری بر ساختار و عملکرد هموگلوبین از خود بر جای بگذارند. به این ترتیب با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق پیشنهاد می‌گردد برای استفاده از نانوذرات در کارهای درمانی، عوارض جانبی آن‌ها از جمله برهمکنش‌های احتمالی با پروتئین‌ها مدنظر قرار گیرد و پوشش، اندازه و شکلی از نانوذرات استفاده شود که کمترین اثرات سوء بر سایر ملکول‌ها برجا گذارد.

منابع:

1. Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LWK, Nie S: In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 2004; 22, 969.
2. Ferrari M: Cancer nanotechnology: opportunities and challenges . *Nat Rev Cancer* 2005; 5, 161.
3. Lynch I: Detecting Cryptic Epitopes Created by Nanoparticles, *Science STKE* 2006;327, 14
4. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggård T, Thulin E, Nilsson H, et al: Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104, 2050
5. Gan S, Zhong L, Han D, Niu L, Chi Q: Probing Bio-Nano Interactions between Blood Proteins and Monolayer-Stabilized Graphene Sheets. *Small*. 2015 ;11(43):5814-25.
6. Norde W, Gage D: Interaction of Bovine Serum Albumin and Human Blood Plasma with PEO-Tethered Surfaces: Influence of PEO Chain Length, Grafting Density, and Temperature. *Langmuir* 2004; 20, 4162
7. Allen LT, Tosetto M, Miller IS, O'Connor DP, Penney SC, Lynch I, et al: Surface-induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interaction. *Biomaterials* 2006; 27, 3096
8. Gray JJ: The Interaction of Proteins with Solid Surfaces. *Curr Opin*

نانوذرات مس نیز نتایج مشابهی حاصل شده است(۳۹). هر چند برخی تحقیقات نشان می‌دهد تغییر نوع، اندازه و پوشش نانوذرات می‌تواند تاثیر متفاوتی بر برهم کنش آن‌ها با هموگلوبین نشان دهد(۴۰-۴۱).

اگر در اثر اتصال نانوذرات تغییر چشمگیری در ساختار هموگلوبین رخ دهد که در نتیجه آن تبدیل شکل از R به T و یا بالعکس رخ دهد، انعکاس این تغییر در طیف‌های CD فلورسانس و مرئی ماورای بنفش قابل مشاهده است. ضمن اینکه این تغییر مهم ساختاری نسبت گونه‌های مختلف هموگلوبین را نیز تغییر داده و بر میل اتصال هموگلوبین نسبت به اکسیژن نیز اثر گذار است.

به طور مثال انتقال ساختار از R به T به کاهش تمایل اتصال هموگلوبین به اکسیژن و افزایش شکل بدون اکسیژن منجر می‌شود. در شکل R اتم آهن در صفحه پورفیرین قرار دارد و در این حالت انتقال از انرژی از تریپتوفان β -۳۷ (مهم‌ترین منبع نشر نور) به سیستم پورفیرین به راحتی انجام می‌شود؛ بنابراین فلورسانس شکل R در مقایسه با شکل T با شدت بیشتری خاموش می‌شود؛ بنابراین افزایش می‌یابد. هم چنین تغییر ساختار چهارم از R به T سبب تغییر در ساختار دوم نیز می‌شود. دلیل این امر جابه‌جایی Fe^{2+} سمت صفحه پورفیرین است که سبب می‌شود دنباله اسید آمینه هیستیدین به سمت جایگاه کتوردیناسیون پنجم حرکت کند. این هیستیدین بخشی از آلفا هلیکس است. بنابراین با تغییر ساختار چهارم از R به T یک دگرگونی در ساختار دوم به وجود می‌آید که منجر به کاهش میزان هلیکس پروتئین منجر می‌شود.

همچنین نتایج حاصل از داده‌های طیف مرئی ماورای بنفش نشان داد که در اثر افزودن نانوذرات به محلول هموگلوبین از شکل اکسی کاسته و به شکل دی اکسی افزوده می‌شود و در نتیجه در حضور این نانوذرات نسبت دی‌اکسی نیز افزایش می‌یابد. این نتایج بدین معنی است که یک تغییر ساختار از R به T کاهش تمایل اتصال اکسیژن منجر شده است. اما همان طور که قبلاً نیز اشاره شد در صورتی که ساختار چهارم از R به T تغییر یابد باید نشر فلورسانس نیز افزایش یابد. که در این جا عکس این اتفاق رخ داده است.

طیف فلورسانس هموگلوبین در حضور نانوذرات نقره نشان داد که در اثر افزایش غلظت نانوذرات طول موج ماکزیمم به سمت طول موج‌های کوتاه تر (جابه‌جایی

Struct Biol 2004; 14, 110

9. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ.: Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng* 2005; 11, 1
10. Engel MF, Visser AJ, van Mierlo CP.: Conformation and orientation of a protein folding intermediate trapped by adsorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101, 11316
11. Cummings CL, Gawlitta D, Nerem RM, Stegemann JP: Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures. *J Biomaterial* 2004; 25, 3699
12. Chen CS, Alonso JL, Ostuni E, Whitesides GM, Ingber DE.: Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochem Biophys Res Commun*.2003; 307, 355
13. Saptarshi SR1, Duschl A, Lopata AL: Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnology*. 2013; 11, 26.
14. Mohd SA, Hamad AL, Ayman MA, Abdelrahman O E, Sami AAH. Interaction of human serum albumin with silver nanoparticles functionalized with polyvinylthiol. *Journal of Molecular Liquids*. 2015;204, 248-254
15. Lindman S, Lynch I, Thulin E, Nilsson H, Dawson KA, Linse S: Systematic investigation of the thermodynamics of HAS. *Nano Lett* 2007; 7, 914
16. Dutta D, Sundaram SK, Teegarden JG, Riley BJ, Fifield LS,

- Jacobs JM, et al: Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. *Toxicological Sciences*. 2007;100, 303–315.
17. Sabatino P, Casella L, Granata A, Iafisco M, Lesci IG, Monzani E, et al: Synthetic chrysotile nanocrystals as a reference standard to investigate surface-induced serum albumin structural modifications. *J Colloid Interface Sci* 2007; 314, 389
18. Jeong SH, Hwang YH, Yi SC, Antibacterial properties of padded PP/PE nonwovens incorporating nano-sized silver, *J Mater Sci* 2005; 40, 5413–5418.
19. Chen X, Schluesener HJ, Silver nanoparticle: a nanoparticle in medical application, *Toxicol Lett* 2008;176, 1–12.
20. Divya PG, Midhun BT, Rony T, Ashok MR and Dipshikha C. Interaction of silver nanoparticles with serum proteins affects their antimicrobial activity in vivo. *antimicrob agents chemother*. 2013 ; 57(10): 4945–4955.
21. AL-Thabaiti NS, Malik MA, Khan Z. Protein interactions with silver nanoparticles: Green synthesis, and biophysical approach. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;95,421-428
22. Rahmani S, Mogharizadeh L, Attar F, Rezayat SM, Mousavi SE and Falahati M. Probing the interaction of silver nanoparticles with tau protein and neuroblastoma cell line as nervous system models, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2017
23. DOI: 10.1080/07391102.2017.1407673 23 Songqin L, Zhihui D, Hongyuan C, Huangxian J. Immobilization of hemoglobin on zirconium dioxide nanoparticles for preparation of a novel hydrogen peroxide biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2004; 19, 963–969
24. De S, Girigoswami A: A fluorimetric and circular dichroism study of Hemoglobin:effect of pH and anionic amphiphiles. *J Colloid Interface Sci* 2006; 296, 324.
25. Cheng Y, Lin HK, Xue DP, Li RC, Wang K: Lanthanide ions induce hydrolysis of Hemoglobin-bound. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1535, 200.
26. Susmita Sil, Tania Bose, Dibyendu Roy, Abhay Sankar Chakraborti. Protoporphyrin IX-induced structural and functional changes in human red blood cells, haemoglobin and myoglobin. *J Biosci*. 2004; 29(3), 281
27. Shuizhen Z, Yong C, Yuming Z, Huangxian Ju. Hydrogen peroxide biosensor based on hemoglobin modified zirconia nanoparticles-grafted collagen matrix. *Analytica Chimica Acta* 2007; 582, 361–366.
28. Devineau S, Zargarian L, Renault JP, Pin S. Structure and Function of Adsorbed Hemoglobin on Silica Nanoparticles: Relationship between the Adsorption Process and the Oxygen Binding Properties. *Langmuir*. 2017;33(13),3241.
29. Khodarahmi R, Maghsoodi S, Rahi H, Hamzehee K, Zamaheni S, Davarpanah E. Evidence of human hemoglobin interaction with chorionic gonadotropin hormone: Prospects for the use of hemoglobin as ligand in affinity chromatography for the purification of the hormone. *Journal of Paramedical Sciences*. 2014;5(3), 31
30. Andrade CT, Barros LA, Lima MC, Azero EG. *Int J Biol Macromol*. 2004;34(4):233-40.
31. D'Alessandro A, Blasi B, D'Amici GM, Marrocco C, and Zolla L. Red blood cell subpopulations in freshly drawn blood: application of proteomics and metabolomics to a decades-long biological issue. *Blood Transfus*. 2013;11(1): 75–87.
32. Norma JG. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*. 2006; 1(6), 2876.
33. Zolghadri S, Saboury AA, Amin E, Moosavi-Movahedi AA. A spectroscopic study on the interaction between ferric oxide nanoparticles and human hemoglobin. *Journal of the Iranian Chemical Society* 2010;7,145
34. Goldbeck RA, Esquerra RM, Kliger DS: Hydrogen Bonding to Trp β 37 Is the First Step in a Compound Pathway for Hemoglobin Allostery. *J Americ Chem Soc* 2002;124, 7646.
35. Venkatesh Rao S, Manoharan PT: Fluorescence Study on Reconstituted Hemoglobins. *Spectrochim Acta Part A* 2004; 60, 2523.
36. Kong J, Yu : Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim Biophys Sin* 2007; 39,549
37. Asghari Khiavi M, Mechler A, Bamberg K, McNaughton D and Wood B. A resonance Raman spectroscopic investigation into the effects of fixation and dehydration on heme environment of hemoglobin. *Journal of Raman Spectroscopy* 2009;. 40. 1668
38. Mahato M, Pal P, Tah B, Ghosh M, Talapatra GB.. Study of silver nanoparticle–hemoglobin interaction and composite formation *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2011; 88, 141.
39. Bhattacharya J, Choudhuri U, Siwach O, Sen P, Dasgupta AK. Interaction of hemoglobin and copper nanoparticles: implications in hemoglobinopathy. *Nanomedicine* 2006 ; 2(3), 191.
40. Yang W, Sun L, Weng J, Chen L, Zhang Q.. Probing the interaction of bovine haemoglobin with gold nanoparticles *IET Nanobiotechnology* 2012; 6, 26.
41. Shen XC, Liu XY, Liang H, Lu X: Spectroscopic Studies of Interaction between Bovine Hemoglobin and Ag Nanoparticles. *Acta Chimica Sinica* 2006; 64, 469.