Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.42; No.2; 2018

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 Unversity

(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*

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

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۲، شماره ۲، ۱۳۹۷، صفحات ۷۹ تا ۸۵

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

سمانه ذوالقدری جهرمی*[۱]، علی اکبر صبوری[۲]

۱- گروه زیست شناسی، 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:

سابقه‌وهدف: 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 پگیله نانوذرات دارای سازگاری زیستی مناسب‌تری نسبت به نانوذرات بدون پوشش است، در این تحقیق بررسی اندرکنش نانوذرات نقره به فرم پگیله 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 اسیدآمینه تریپتوفان تغییر کرده و عملکرد فیزیولوژیکی هموگلوبین تحت تاثیر نانوذرات نقره با پوشش پلی‌اتیلن گلیکول قرار گرفته است. همچنین اتصال نانوذرات نقره پگیله به هموگلوبین سبب برخی تغییرها در شکل فضایی آن و در نتیجه افزایش آب گریزی 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 پگیله با ایجاد تغییر در ساختمان دوم پروتئین و باز شدگی ساختار سوم هموگوبین سبب تغییر در عملکرد پروتئین می شوند، بنابراین نانوذرات نقره پگیله 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 پگیله، هموگلوبین، برهم کنش

مقدمه:

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 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

نویسنده مسئول: سمانه ذوالقدری جهرمی
پست الکترونیک: *z.jahromi@ut.ac.ir*

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]

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 بر هم‌کنش 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]. مطالعه‌هایات دیگری نشان می دهد که نانوذرات نقره با پوشش سیترات خواص آنتی باکتریال قویتری نسبت به نانوذرات نقره بدون پوشش نشان می دهند[۲۰]. هم چنین تاکنون مطالعه‌هایات مختلفی در رابطه با برهم‌کنش نانوذرات نقره با پروتئین ها و، از جمله آلبومین و هموگلوبین انجام شده است. برهم کنش نانوذرات نقره با آلبومین سرم نشان می دهد که این نانوذرات سبب کاهش ساختارهای هلیکس آلبومین می شوند [۲۱-۲۲]. این مطالعه‌هاات نشان می دهد پوشش نانوذرات نقره می تواند سبب کاهش اتصال آن ها با هموگلوبین و افزایش خاصیت آنتی باکتریال آن ها شود [۲۰].
برهم‌کنش هموگلوبین با تعدادی از مولکول‌های کوچک دیگر مثل دی‌متیل‌سولفوکسید[۲۳]، مولکول‌های آب‌دوست[۲۴-۲۷] و هماتوپورفیرین‌ها[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⇆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 می دهد نانوذراتی که دارای پوشش مناسب هستند اثرات‌اثار کمتری بر سمیت سلولی دارند و و بنابراین زیست سازگاری بیشتری از خود نشان می دهند. 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 پلی‌اتیلن گلیکول ۱۰ nm تهیه شده از شرکت Biocera کره‌جنوبی، 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 ۴درصد (شرکت مرک) سالین، بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH ۷/۴ (شرکت مرک)، آب دوبار تقطیر سرد و نمک سولفات آمونیوم۲۰درصد (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 طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی (اویو ساخت کشور آمریکا)، دستگاه طیف سنجی مرئی ماورای بنفش(شیماتزو ساخت کشور ژاپن و کری ۱۰۰ ساخت استرالیا)، دستگاه الکتروفورز (ساخت ایران)، گرماسنج تیتراسیونی همدما (میکروکال ساخت کشورآمریکا).

ج: روش‌ها

استخراج هموگلوبین از خون انسان:

برای استخراج هموگلوبین از خون تازه مراحل زیر به ترتیب انجام شد: ۹ میلی‌لیتر از خون تازه به یک میلی‌لیتر سدیم سیترات ۴درصد 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 سالین ۰/۹ درصداضافه 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 دور۱۸ هزارسانتریفیوژ انجام شد. محلول رویی را جدا کرده و سپس نمک سولفات آمونیوم۲۰درصد اضافه کرده و ۱۵ دقیقه در حالت ایستا قرار داده و سپس با دور ۱۴هزار 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[۲۹-۲۶-۳۱-۲۸].

الکتروفورز هموگلوبین:

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

طیف سنجی UV-Visible:

طیف جذبی مرئی ماورای بنفش در محدوده ۲۵۰تا۵۰۰ 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) انجامک 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 دماهای۳۷ 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 (CD):

طیف سنجی CD براساس اختلاف جذب نور پلاریزه چپ گرد و راست گرد است. طیف‌های در ناحیه فرابنفش دور(۱۹۰تا۲۶۰ نانومتر) که منطبق بر جذب پیوندهای پپتیدی است با دستگاه اسپکتروپلاریمتراویو مدل ۲۱۵ (لایک وود ساخت آمریکا) به دست آمده است.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]

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].

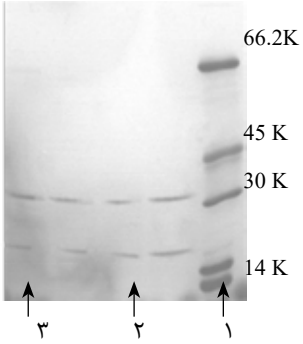
محاسبات آماری:

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

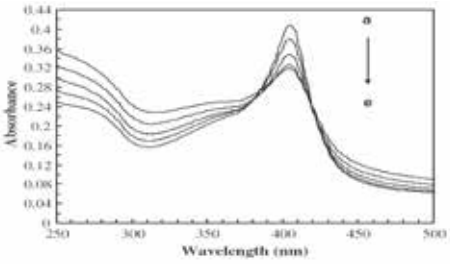
اولین مرحله پس از استخراج هموگلوبین از خون انسان تعیین غلظت بود که با استفاده از معرف برادفورد انجام شد. سپس نمونه‌ها روی ژل SDS برده شد و خلوص نمونه هموگلوبین در مقایسه با هموگلوبین تهیه شده از شرکت سیگما، مارکر و چند نمونه استخراج شده توسط افراد دیگر مورد تایید واقع شد(شکل ۱).



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 در 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 نقره۰، ۱۸/۷، ۲۸، ۳۷/۴، ۴۷ میکرومولار انتخاب شده است.

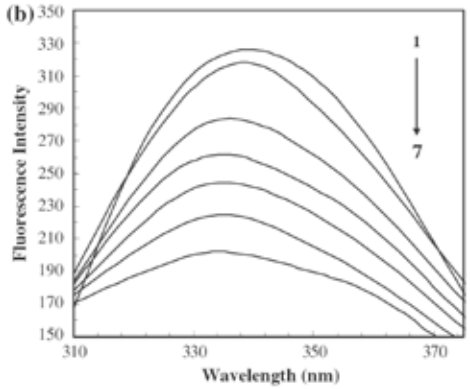


نمودار۱: طیف جذبی هموگلوبین و نانوذرات نقره با پوشش پلی‌اتیلن گلیکول – هموگلوبین. غلظت هموگلوبین ۱/۵ میکرومولار و غلظت نانوذرات نقره برابر با a=۰، b=۱۸/۷، c=۲۸، d =۳۷/۴ e=۴۷۰ میکرومولار است. دما برابر با ۲۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۷/۴ است.

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 15-□ Trp, two 14-□ (two Trp, □-37) است. فلورسانس ذاتی هموگلوبین بیشتر ناشی از تریپتوفان 37-□ است. این اسید آمینه در نزدیکی گروه هم قرار دارد[۳۳-۳۰-۳۲-۳۵].

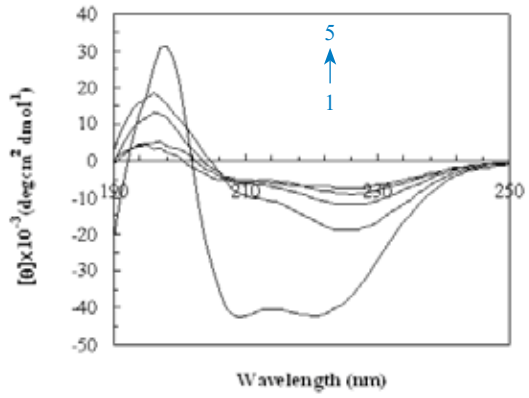
طیف فلورسانس هموگلوبین در حضور و غیاب نانوذرات نقره و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ثبت شد (شکل۳). شکل نشان‌دهنده یک جابه‌جایی به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر (جابجایی آبی) و کاهش شدت نشر ماکزیمم در اثر افزایش غلظت نانوذرات است.



نمودار ۲: طیف فلورسانس هموگلوبین و نانوذرات نقره با پوشش پلی اتیلن گلیکول – هموگلوبین. غلظت هموگلوبین ۳ میکرومولار و غلظت نانوذرات نقره از۱تا ۷ به ترتیب برابر با ۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰، ۱۱۰ ،۱۳۰ و ۱۵۰ میکرومولار می باشد. دما برابر با ۳۷ درجه سانتیگراد و ۷ pH می باشد.

د: مطالعه‌های دورنگ نمایی حلقوی

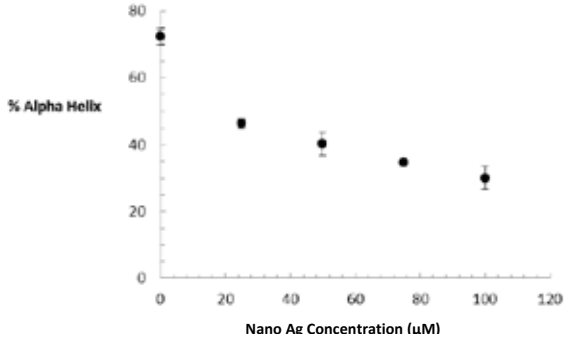
طیف CD هموگلوبین دارای دو کمینه در طول موج های ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر است که نشان‌دهنده محتوای هلیکسی پروتئین است. شکل(۴) تغییر در طیف هموگلوبین را در اثر افزایش نانوذرات در دمای ۳۷ نشان می‌دهد. همان طور که در شکل قابل مشاهده است در اثر افزایش نانوذرات نقره به محلول هموگلوبین بیضی واری در دو طول موج ۲۰۸ و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



نمودار۳: طیف دورنگ‌نمایی حلقوی هموگلوبین و هموگلوبین- نانوذرات نقره با پوشش پلی‌اتیلن گلیکول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) ۷ (pH و غلظت mg/ml ۰/۲۵ هموگلوبین و غلظت نانوذرات نقرهاز ۱ تا ۵۱ به ترتیب ۰، ۱۸/۷، ۳۷/۴، ۷۴/۸ میکرومولار است.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]

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 ۸/۵درصد دارای ساختار بتا است . در این تحقیق، نمونه طبیعی هموگلوبین در غیاب نانوذرات دارای ۷۰ درصد ساختار هلیکس و ۱۰ درصد ساختار بتا بوده است۳۶-۳۳. افزودن نانوذرات در بیشترین غلظت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد سبب کاهش بیش از ۶۰درصد از ساختار آلفا (شکل ۵) و در حدود ۲۰درصد افزایش ساختار بتا شده است.



نمودار ۴: کاهش هلیسیتی هموگلوبین در اثر افزایش نانوذرات نقره در دمای ۳۷درجه سانتیگراد. نمودار بر اساس میانگین و انحراف معیار گزارش شده است.

ه: تاثیر نانوذرات بر گونه‌های مختلف هموگلوبین

دریک محلول هموگلوبین، شکل‌های مختلفی از هموگلوبین با غلظت‌هایی مشخص دیده می‌شود که عبارت است از شکل اکسی، دی‌اکسی و مت هموگلوبین. شکل اکسی هموگلوبین همان شکل اکسیژن‌دار هموگلوبین و دی‌اکسی هموگلوبین شکل بدون اکسیژن هموگلوبین است. مت هموگلوبین حالتی بین اکسی و دی‌اکسی هموگلوبین بوده که در آن آهن در حالت اکسید Fe^{3+} و کنفورماسیون شل (R) قرار داشته و قادر به حمل اکسیژن نیست۳۷. برای تعیین غلظت گونه های مختلف هموگلوبین در محلول از روابط زیر استفاده می شود..

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

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

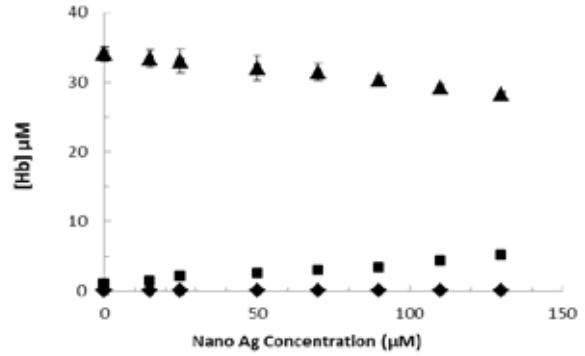
$$[oxy] = (1.0154\ A_{576} - 0.2772\ A_{630} - 0.742\ A_{560}) \times 10^{-4}\ M$$

در این مطالعه، به منظور جلوگیری از تشکیل شکلهای دایمر هموگلوبین از نمونه هموگلوبینی با غلظت بالا (mg/ml 6-4) استفاده شده است.

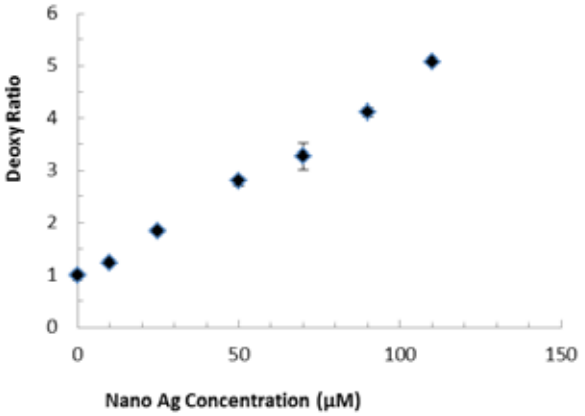
همان طور که در شکل ۶ مشاهده می شود با افزایش غلظت نانوذرات نقره از شکل اکسیژن دار هموگلوبین کاسته شده و به شکل بدون اکسیژن آن افزوده می گردد. در حالیکه در غلظت شکل مت هموگلوبین تغییری حاصل نشده است.

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

با استفاده از نسبت دی‌اکسی به جای P۵۰ (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↔T (ساختار سخت ↔ ساختار شل) هر عاملی که شکل T یا دی‌اکسی را بیشتر افزایش دهد باعث کاهش تمایل هموگلوبین به اکسیژن می‌شود. نسبت دی‌اکسی عبارت است از غلظت شکل دی‌اکسی در حضور لیگاند تقسیم بر غلظت شکل دی‌اکسی همان نمونه در غیاب لیگاند. شکل ۷ میزان تاثیر نانوذرات نقره را بر نسبت دی‌اکسی نشان می‌دهد. این نانوذره سبب افزایش نسبت دی‌اکسی و کاهش تمایل هموگلوبین نسبت به اکسیژن می‌شود. این افزایش 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 دی‌اکسی 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 پلی‌اتیلن 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 نمی شود. 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 پلی‌اتیلن 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 شده‌است. به طوری که در بیشترین غلظت نانوذرات بیش از ۵۰درصد از ساختار آلفا کاسته شده و در حدود ۲۰درصد 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 آبگریزی پروتئین افزایش می یابد. 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

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]

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 برهم‌کنش 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 ماورای‌بنفش 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 کئوردیناسیون 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 سنجی 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 قبلا نیز اشاره شد در صورتی که ساختار چهارم از R به T تغییر یابد بایید 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 (جابجایی 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 آبگریزی 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 برموجودات 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 کمتردر 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 آبگریزی 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 آبگریز هم نیز منجرگردیده است ؛ بنا بر تمایل اتصال هموگلوبین نیز تاثیر گذاشته است و بر خلاف آنچه انتظار می رفت 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 می گردد 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: Pro1bing 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 Struct Biol 2004; 14, 110
9. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Pearcy 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, Teeguarden JG, Riley BJ, Fifield LS,

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]

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 nanoproduct 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, Abh ay 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 β37 Is the First Step in a Compound Pathway for Hemoglobin Allostery. J Americ Chem Soc 2002;124, 7646.

35. Venkateshrao 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, Bambery 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.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]