

بررسی تأثیر نانوذرات دو فلزی طلا- نقره بر مهار فیبری شدن آمیلوئیدی لیزوزیم و جلوگیری از سمیت سلولی ناشی از آن

حسن رامشینی^{۱*}

۱. دانشیار بیوشیمی، گروه علمی زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۰۷

زمینه و هدف: رسوب تجمعات آمیلوئیدی در مغز، باعث بیماری‌های متعدد تحلیل‌برنده سیستم عصبی می‌گردد. نانوذرات گوناگونی برای درمان این گونه بیماری‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. خواص نانوذرات فلزی، از طریق ساخت ذراتی با دو فلز گوناگون به جای ذراتی که منحصراً از یک ذره تشکیل شده می‌تواند به صورت مؤثری بهبود پیدا کند. در مطالعه حاضر، تأثیر نانوذرات دو فلزی طلا- نقره بر تجمع آمیلوئید پیروتئین لیزوزیم تخم‌مرغ که یک پروتئین مدل تشکیل‌دهنده آمیلوئید است بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، برای القای تشکیل آمیلوئید، از دمای بالا و pH اسیدی استفاده شد. لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ به میزان ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر گلاپسین ۵۰ میلی‌مولار حل شد و در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای دوره‌های مشخصی انکوبه گردید. تأثیر مهاری این نانوذرات بر فیبری شدن لیزوزیم با استفاده از روش‌های سنجش آمیلوئید مثل تیوفلاوین T، قرمز کنگو و سنجش MTT مطالعه شد.

یافته‌ها: مطالعه سنجش ThT نشان داد که این نانوذرات، قادر به مهار تشکیل تجمع آمیلوئیدی با الگوی مهار وابسته به غلظت معکوس می‌باشد و بهترین غلظت مهاری نیز ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. مطالعه سینتیک تجمع نشان داد که نانوذرات طلا- نقره بر فاز تأخیری فیبری شدن، تأثیری ندارند ولی فاز تعادلی آن به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. همچنین تأثیرات سمیت تجمعات لیزوزیم در حضور نانو ذرات نقره- طلا به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: پیش‌بینی می‌شود که براساس بینش‌های به دست آمده در طراحی نانوذرات جدید دو فلزی، ایده استفاده از روش‌های درمانی مبتنی بر نانوذرات جدید دو فلزی برای درمان بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی، چشم‌انداز واقع‌بینانه داشته باشد.

کلیدواژه‌ها:

تجمعات آمیلوئیدی، نانوذرات طلا- نقره، لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ، سمیت سلولی.

۱. مقدمه

فیزیک، پزشکی، علوم محیطی و مهندسی هستند [۱]. امروزه مشخص شده است که نانوذرات دارای نقش مهمی در مهار بیماری‌های گوناگونی که در نتیجه تا خوردگی غلط پروتئین‌ها و تجمع آنها حادث می‌شود می‌باشند [۱]. با توجه به خصوصیات منحصر به فرد و کاربردهای امیدوارکننده در پزشکی و داروسازی، طی چند دهه گذشته، مطالعات گسترده‌ای در مورد آنها صورت گرفته

نانوذرات، ذراتی با ابعاد بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند و خواص کاتالیتیکی، نوری و الکترونیکی ویژه‌ای دارند که آنها را نسبت به همین ذرات در ابعاد بزرگ‌تر، منحصربه‌فرد کرده است. این ذرات به دو شکل طبیعی یا مصنوعی وجود دارند اما هر دو دسته دارای کاربردهای وسیعی در شیمی،

* نویسنده مسئول: حسن رامشینی

نشانی: دانشگاه پیام نور، گروه علمی زیست‌شناسی، تهران، ص. پ. ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵ - ج. ۱، ایران

تلفن: ۰۵۱۴۴۶۴۴۰۱۲

رایانامه: ramshini@alumni.ut.ac.ir

شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0002-6615-2651

نشان می‌دهد که ارتباط مستقیمی بین کمبود سلنیوم در سرم خون با کاهش حافظه در بیماران آلزایمری وجود دارد [۱۴ و ۱۵] و مشخص شده است که تیمار کردن حیوانات آزمایشگاهی و همچنین بیماران آلزایمری با سلنیوم تا حدودی ممکن است حافظه را تقویت کند [۱۶]. امروزه ممکن است به دلیل پتانسیل بالا و سمیت سیستمیک پایین از نانوذرات سلنیوم برای درمان بیماری‌های مربوط به نرون‌ها از جمله آلزایمر استفاده می‌شود [۱۷]. علی‌رغم اینکه امروزه تولید انواع مختلف نانوذرات فلزی با اندازه و شکل‌های مختلف به راحتی امکان‌پذیر است اما دانشمندان درصدد تولید نانوذراتی با دو فلز گوناگون که دارای خواص متفاوت با نانوذرات تک‌فلزی از جمله افزایش خواص مغناطیسی و خواص نوری هستند، می‌باشند [۱۸]. تاکنون اطلاعات کمی در رابطه با نقش درمانی نانوذرات دوفلزی وجود دارد. در مطالعه حاضر، تأثیر نانوذره دو فلزی طلا-نقره بر تجمع آمیلوئیدی آنزیم لیزوزیم (به‌عنوان یک پروتئین مدل در مطالعات مربوط به تجمعات آمیلوئیدی) بررسی شده و تأثیر این نانوذره با تکنیک‌هایی مثل فلورسانس تیوفلاوین T، شدت جذب قرمز کنگو^۴ و مطالعه سمیت سلولی به روش MTT مورد مطالعه قرار گرفته است.

۲. مواد و روش

۲.۱. مواد

نانوذرات طلا- نقره در آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه حکیم سبزواری سنتز گردید. به‌طور خلاصه، در این پروژه، از محیط کشت Luria-Bertania Medium (LB) (متشکل از نمک سدیم کلراید، تریپتون و عصاره مخمر به ترتیب با نسبت‌های ۱ به ۱ به ۰/۵ گرم برای هر ۱۰۰ سی‌سی) برای رشد باکتری استفاده گردید و در ادامه بعد از به حجم رساندن با آب مقطر، pH آن با اضافه کردن محلول اسید و باز تنظیم شد. معمولاً از pH خنثی (pH = 7) برای رشد باکتری مورد نظر استفاده می‌شود و در ادامه، محیط ساخته‌شده، درون اتوکلاو استریل می‌گردد و برای انجام مراحل بعدی آزمایش‌ها استفاده می‌شود. پس از آماده کردن محیط مایع LB، مقدار ۵ میلی‌لیتر از آن، در یک ارلن‌مایر ۵۰ میلی‌لیتری قرار داده شد و مقدار ۲۰ میکرولیتر از استوک گلیسرول باکتری به آن اضافه گردید. پس از اضافه کردن باکتری، این محیط که به آن محیط

است. نانوذرات به‌عنوان حامل‌های دارویی استفاده شده‌اند؛ زیرا دارای ظرفیت حمل بالا، نسبت سطح به حجم بالا، پایداری زیاد، اندازه قابل کنترل برای هدف‌های گوناگون و قدرت رهایش کنترل شده دارو می‌باشند [۲]. آنها قادرند دسترس‌پذیری داروها را افزایش و سمیت آنها را در بدن کاهش دهند، ضمن اینکه اثرات جانبی کمتری دارند و از نظر هزینه، تولید آنها مقرون‌به‌صرفه است [۳ و ۴]. امروزه دانشمندان، مطالعات مختلفی را برای درک تأثیر نانوذرات با خصوصیات مختلف فیزیوشیمیایی بر تجمع پروتئین انجام داده‌اند. این مطالعات به منظور کشف نانوذرات جدید برای مهار تجمعات آمیلوئیدی صورت گرفته است. تشکیل تجمعات آمیلوئیدی، پروسه‌ای است که پروتئین‌های محلول و طبیعی در بدن به دلایل گوناگون به صورت غیرمحلول درمی‌آیند و در بافت‌های مختلف رسوب می‌کنند. برای مثال در بیماری آلزایمر، پلاک‌های آمیلوئیدی در اثر تجمع پروتئین A β و همچنین تنگل‌های^۱ نوروفیبریلار در اثر تجمع پروتئین هایپرفسفریله تاو^۲، در مغز به وجود می‌آیند [۵]. تجمعات A β باعث سمیت عصبی، مهار پتانسیل طولانی‌مدت عصبی^۳ و القای از دست رفتن سیناپس‌ها و در نهایت باعث تخریب حافظه و رفتارهای یادگیری می‌شود [۶]. امروزه داروهایی که به منظور درمان بیماری آلزایمر تجویز می‌شوند؛ مثل استیل‌کولین استرازاها یا آنتاگونیست‌های رسپتور آسپاراتات فقط در راستای کاهش علائم بیماری عمل می‌کنند و متأسفانه قادر به درمان آن نیستند [۷]. مانع اصلی رسیدن داروهای ضدآلزایمری جدید به مغز، سد عروقی- خونی است؛ بنابراین از مزایای مطالعه نانوذرات، مهارکنندگی بیماری آلزایمر تراوا بودن سد مغزی- عروقی برای این ذرات است [۸]. مطالعات گوناگونی در رابطه با تأثیر نانوذرات بر تجمعات آمیلوئیدی صورت گرفته است. در حالی که مطالعات نشان می‌دهد نانوذرات طلا باعث القای تشکیل آمیلوئیدی می‌گردند [۹]، نانوذرات آهن یا نانوذرات کربنی باعث مهار تشکیل فیبر پروتئین A β می‌شوند [۱۰ و ۱۱]. از طرف دیگر، مطالعات نشان می‌دهد نانوذرات نقره و سلنیوم در غلظت‌های پایین باعث مهار تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی می‌گردند [۱۲]. حتی نشان داده شده است که در اثر تزریق آمیلوئیدهای تشکیل شده در حضور نانوذرات نقره به مغز موش صحرایی در مقایسه با همین آمیلوئیدها در غیاب نانوذره، حافظه موش‌ها تخریب نگردیده است [۱۳]. مطالعات گوناگون

3 Neural long-term potentiation
4 Congo red

1 Tangle
2 Tau

۴.۲. مطالعات سنجش ThT

از محلول تازه تهیه شده تیوفلاوین T که با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرومتری فیلتر شده بود، برای نشان دادن تشکیل یا تشکیل نشدن فیبرهای آمیلوئیدی استفاده گردید. محلول ThT به فیبرهای آمیلوئیدی تشکیل شده در حضور یا فقدان نانوذرات طلا- نقره اضافه شد و بررسی تغییر شدت فلوروسانس با استفاده از دستگاه اسپکتروفلورومتر کری اکلپس واریان انجام شد. طیف برانگیختگی در ۴۴۰ نانومتر، نشر از ۴۴۵ تا ۵۵۰ نانومتر و پهنای شکاف برانگیختگی و نشر ۱۰ نانومتر در نظر گرفته شد. افزایش شدت نشر تیوفلاوین T به عنوان تشکیل احتمالی فیبرهای آمیلوئیدی یا شبه آمیلوئیدی در مقایسه با شدت نشر تیوفلاوین T به تنهایی تفسیر گردید [۲۱].

۵.۲. جذب نوری کنگورد

رنگ کنگورد به غلظت ۲۰ میکرومولار در ۵ میلی مولار بافر فسفات سدیم، ۱۵۰ میلی مولار NaCl، pH= ۷/۴ تهیه شد. به نمونه های آمیلوئیدی تشکیل شده در حضور یا فقدان نانوذرات طلا- نقره، محلول کنگورد اضافه شد و پس از هم خوردن طیف جذبی آن در محدوده طول موج ۷۰۰ nm-۴۰۰ بعد از ۲ یا ۳ دقیقه صبر کردن برای ایجاد تعادل با دستگاه اسپکتروفتومتر به دست آمد [۲۱].

۶.۲. بررسی سمیت با روش MTT

فیبرهای آمیلوئیدی طبق روش پیش گفته، در حضور نانوذرات (با غلظت بهینه) و فقدان نانوذرات تهیه شدند. سپس ویال های حاوی مواد فوق، سانتریفوژ گشتند و محلول رویی برداشته شد، به اندازه محلول رویی خارج شده، محیط کشت DMEM به بخش رسوبی ویال ها اضافه گردید و بخش رسوبی در آن حل شد. پس از چندین بار هم زدن ماده آماده تزریق بلافاصله به محیط کشت سلول ها اضافه و سمیت نمونه ها برای سلول در یک ظرف ۹۶ چاهکی به وسیله MTT سنجش شد [۲۰].

۷.۲. آنالیز آماری

هر آزمایش حداقل سه بار به صورت مستقل انجام و در هر بار هرکدام حداقل سه بار تکرار شد و تمام نمودارها به صورت میانگین $SD \pm Mean$ گزارش شد. داده ها توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ با استفاده از آزمون T

پیش کشت باکتری گفته می شود در انکوباتور شیکردار به مدت تقریباً ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ C و دور ۱۸۰ قرار داده شد و دوباره بعد از ۲۴ ساعت به مقدار ۵ درصد محیط تولید جدید از محیط پیش کشت به آن اضافه شد و با همان شرایط قبلی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ C در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. بعد از رشد باکتری در شرایط پیش گفته در حالت خارج سلولی، محلول حاوی باکتری در فالكون های مخصوص ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از این مرحله، از محلول شفاف رویی که حاوی آنزیم ها، ماکرومولکول ها و متابولیت های ثانویه مختلف است مقدار مشخصی (معمولاً در حجم های ۵۰۰ میکرولیتری) برداشته و به ترتیب از محلول استوک نیترا نقره ۵۰ میلی مولار و محلول استوک طلا ۱٪ به طور جداگانه به اندازه ای اضافه شد که در حجم نهایی غلظت هر یک از آن ها ۱ میلی مولار باشد. در نهایت نمونه ها در انکوباتور در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند [۱۹].

۲.۲. تعیین غلظت پروتئین لیزوزیم

برای محاسبه غلظت پروتئین لیزوزیم از روش اسپکتروفتومتری و با قرائت جذب ۲۸۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی $2/65 L.g^{-1}cm^{-1}$ استفاده شد [۱۲].

۳.۲. القای فیبرهای آمیلوئیدی در لیزوزیم سفیده تخم مرغ

برای مطالعه تأثیر نانوذرات طلا- نقره ابتدا یک محلول مادر از این ذرات تهیه شد. در هر بار استفاده، مقدار مورد نیاز از این محلول مادر برداشته و توسط آب دو بار تقطیر رقیق و بوسیله دستگاه التراسونیک^۱ به مدت ۵ دقیقه یکنواخت گردید. ۲ میلی گرم در میلی لیتر پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ و غلظت مورد نیاز از نانوذرات به طور همزمان در بافر ۵۰ میلی مولار گلیسین با pH=۲/۵ در دمای ۵۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت همراه با همزن مداوم و چرخش rpm ۲۵۰ قرار داده شد. پس از ۴۸ ساعت، تشکیل تجمعات آمیلوئیدی بررسی شد. آمیلوئید تشکیل شده در فقدان نانوذرات برای کنترل نیز به همین روش تهیه گردید [۲۰].

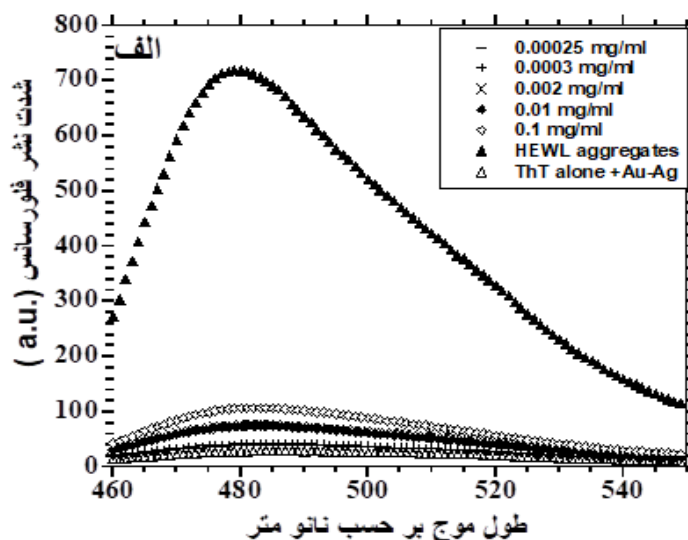
مستقل با ضریب اطمینان ۹۵ درصد تجزیه و تحلیل گردید.

۳. یافته‌ها

۱.۳. تعیین غلظت بهینه و بررسی کینیتیک مهار تجمع فیبرهای لیزوزیم توسط نانوذره طلا- نقره در غلظت بهینه

تشکیل تجمعات آمیلوئیدی به روش‌های گوناگونی، تأیید می‌شود. یکی از این روش‌ها استفاده از رنگ فلورسانس تیوفلاوین T (ThT) است. در این روش، در اثر اتصال این رنگ به فیبریل‌ها و با تحریک آن در طول موج ۴۴۰ نانومتر،

شدت نشر بالایی در طول موج‌های بین ۴۴۵ تا ۵۵۰ نانومتر دیده می‌شود. در این مطالعه، ابتدا بهترین غلظتی که نانوذره طلا- نقره می‌تواند باعث مهار تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی گردد به دست آمد. برای به دست آوردن غلظت بهینه، فرایند تشکیل این فیبرهای آمیلوئیدی توسط پروتئین لیزوزیم (در شرایط تشکیل این فیبرها که در بخش روش‌ها توضیح داده شد)، در حضور دامنه غلظت ۰/۰۰۰۲۵ - ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره طلا-نقره بررسی گردید و نتایج آن به وسیله تغییرات شدت فلورسانس تیوفلاوین T نشان داده شد.



شکل ۱. طیف شدت نشر فلورسانس تیوفلاوین T (ThT) لیزوزیم انکوبه شده در شرایط آمیلوئیدی (براساس بخش روش‌ها) در حضور و غیاب غلظت‌های ۰/۰۰۰۲۵ تا ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر (شکل الف) و ۱ تا ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر (شکل ب) نانوذرات طلا- نقره. طیف نشر نانوذره با غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حضور ThT برای مقایسه آورده شده است.

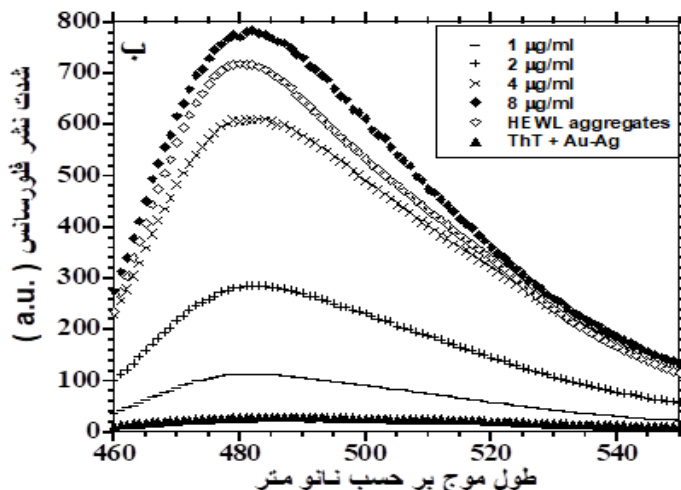
توسط نانوذره است [۲۰].

برای بررسی اثر خاموش‌کنندگی احتمالی ابتدا طیف نشر فلورسانس فیبرهای بالغ آمیلوئیدی قرائت شد. سپس نانوذره طلا- نقره با غلظت ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی آن اثر داده شد و بلافاصله شدت نشر فلورسانس آن را مورد مطالعه قرار دادیم. اگر کاهش شدید نشر به‌وقوع بپیوندد ناشی از اثر خاموش‌کنندگی نانوذره است نه مهارکنندگی آن. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود افزودن نانوذرات با غلظت ۰/۰۱ به محلول دارای آمیلوئید بالغ و بلافاصله مشاهده طیف فلورسانس آن، کاهش شدت نشر را نشان نمی‌دهد؛ بنابراین این نانوذرات روی تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی، اثر مهاری دارد و کاهش شدت فلورسانس به دلیل اثر خاموش‌کنندگی نیست. پس از به دست آوردن غلظت بهینه (۰/۰۱ میکروگرم/میلی‌لیتر) و

همان‌طور که شکل ۱ (الف) نشان می‌دهد، براساس میزان نشر فلورسانس بهینه‌ترین غلظت از این نانوذره که بیشترین مهار را دارد غلظت ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. براساس شکل ۱ (الف و ب) میزان مهار با میزان غلظت نانوذره، رابطه عکس دارد؛ یعنی این نانوذره در غلظت‌های پایین‌تر، میزان مهار بهتری را نشان می‌داد (الف) و هر چه میزان غلظت نانوذره از غلظت بهینه بالاتر رفت میزان مهار به‌صورت وابسته به غلظت کاهش یافت (ب). نتیجه این مطالعه با مطالعات پیشین در مورد نانوقره منطبق است [۱۳]. یکی از کنترل‌هایی که باید انجام شود این است که آیا کاهش نشر فلورسانس توسط نانوذره مربوط به مهار تجمعات آمیلوئیدی است یا به دلیل اثر خاموش‌کنندگی طیف فلورسانس در طول موج‌های بین ۴۶۰-۵۵۰ نانومتر

تأخیر، فاز رشد سریع و فاز تعادل را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۳ مشخص است، در حضور این غلظت از نانوذره طلا-نقره، میزان شدت فلورسانس و تشکیل آمیلوئید بعد از ۴۸ ساعت به میزان چشمگیری کاهش یافت. این شکل نشان می‌دهد که در حضور نانوذره فاز فیبریلاسیون (فاز سریع) کاهش یافته است و این نشانه عمل مهار نانوذره است.

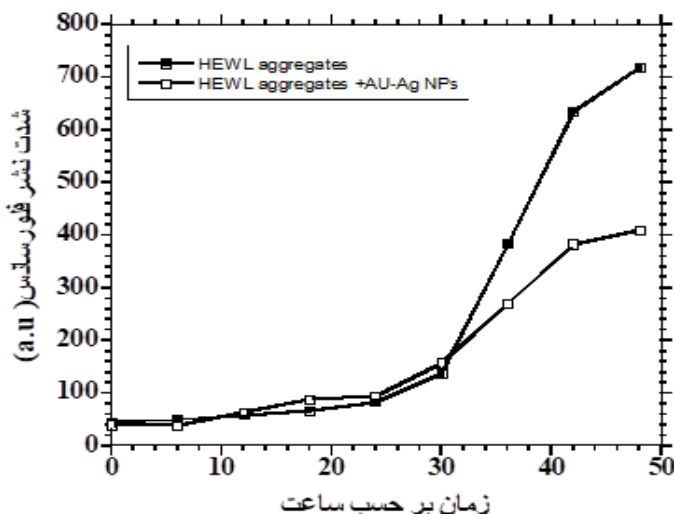
اطمینان از عدم اثر خاموش‌کنندگی نانوذره طلا-نقره برای مهار تجمع لیزوزیم، اثر مهار نانوذره در غلظت بهینه در یک دوره ۴۸ ساعته مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات مهار نانوذره هر ۶ ساعت به دست آمد و تغییرات شدت نشر در مقابل تغییرات زمان رسم شد تا نمودار کینتیکی تجمع در حضور و فقدان نانوذره به دست آید. کینتیک تجمع لیزوزیم در غیاب نانوذره سه مرحله: فاز



شکل ۲. مطالعه اثر خاموشی نانوذرات طلا-نقره.

افزافه کردن نانوذرات طلا-نقره (□) با غلظت نهایی ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر مورد سنجش نشر فلورسانس ThT قرار گرفت.

آمیلوئیدهای لیزوزیم به دست آمده بعد از ۴۸ ساعت آنکوباسیون در pH=۲/۵ و دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد بلافاصله بدون اضافه کردن نانوذرات طلا-نقره (■) و با

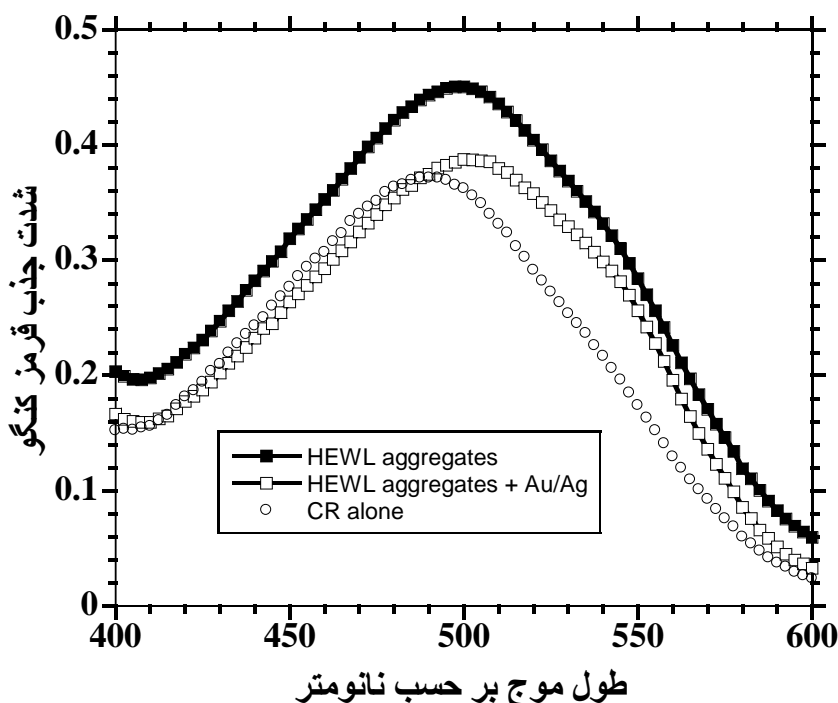


شکل ۳. طیف نشر فلورسانس تیو فلاوین T، ۲ میلی‌گرم لیزوزیم آنکوبه شده در دمای ۵۷ درجه و pH=۲/۵ در فقدان نانوذرات طلا-نقره (■) یا حضور آن با غلظت نهایی ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر (□) در زمان‌های مختلف.

۲,۳. بررسی جذب نوری قرمز کنگو (کنگورد) در حضور نانوذره نقره در غلظت بهینه

برای تأیید اثر مهاری نانوذره طلا- نقره در غلظت ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از دیگر شناساگر تجمعات آمیلوئیدی یعنی اندازه‌گیری میزان شدت جذب قرمز کنگو^۱ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. شکل ۴ طیف جذب نوری قرمز کنگو تجمعات آمیلوئیدی را در حضور و عدم حضور نانو ذره طلا- نقره در غلظت بهینه (۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) را نشان می‌دهد. طیف جذبی قرمز کنگو واجد بیشینه‌ای در طول موج ۴۹۰ نانومتر است. اضافه کردن پروتئین عادی تغییر قابل‌ملاحظه‌ای در شدت

یا الگوی طیف جذبی قرمز کنگو موجب نمی‌شود ولی پس از اضافه کردن پروتئین انکوبه شده در شرایط آمیلوئیدی شدت نشر و به خصوص شیفت قابل‌ملاحظه‌ای به سمت قرمز مشاهده می‌شود؛ به گونه‌ای که بیشینه تفاوت دو طیف در ۵۳۰ نانومتر مشاهده می‌شود. این یافته مؤید تشکیل تجمعات آمیلوئیدی لیزوزیم در فقدان نانوذرات طلا- نقره است. کاهش شدت طیف جذبی و همچنین کاهش شیفت به سمت قرمز مربوط به تجمعات تشکیل شده در حضور این نانوذرات به خوبی نشان‌دهنده مهار تشکیل آنها می‌باشد [۲۱].

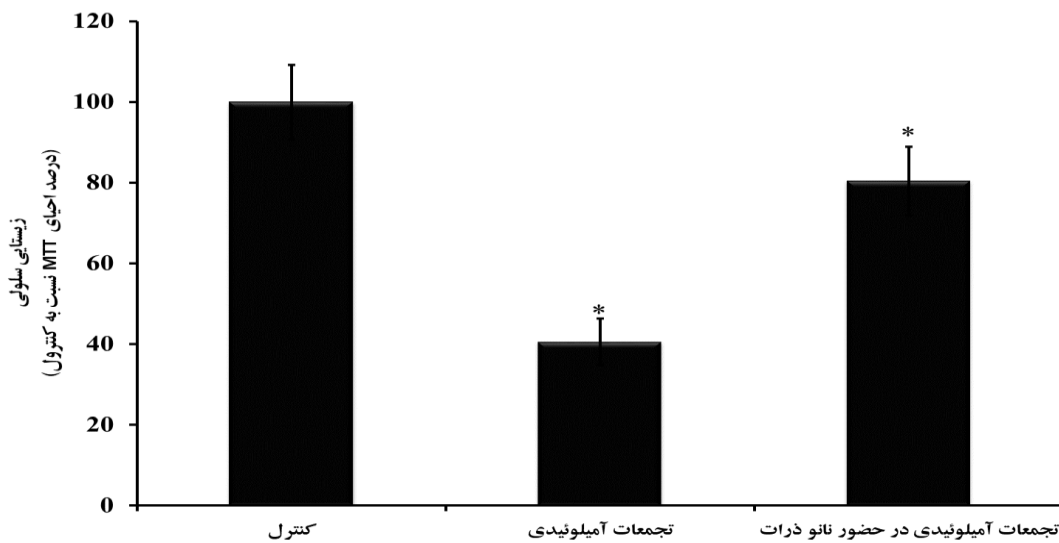


شکل ۴. شکل طیف جذبی کنگو رد، پیش (□) و پس (■) از اضافه کردن ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره- طلا در شرایط تشکیل آمیلوئید. طیف جذبی کنگو رد به تنهایی جهت مقایسه نیز آورده شده است (○).

۳,۳. کاهش سمیت فیبرهای آمیلوئیدی در حضور نانوذرات نقره

هردوی تجمعات تشکیل یافته لیزوزیم در حضور و فقدان نانوذرات به یک محیط فیزیولوژیک انتقال داده شدند و

سپس به محیط کشت سلول‌های PC12 در غلظت نهایی ۲ میکرومولار اضافه شدند. توانایی این تجمعات برای تخریب عملکرد سلول‌ها با ارزیابی احیای MTT براساس توضیحاتی که در قسمت روش‌ها داده شده انجام گرفت. همان طور که در شکل ۵ ملاحظه می‌شود.



شکل ۵. زیستایی سلول‌های تیمار شده با ۲ میکرومولار فیبرهای آمیلوئیدی حاصل از لیزوزیم در غیاب یا حضور ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات طلا- نقره

امروزه برای دست یافتن به کارآمدی بیشتر نانوذرات، نسل جدیدی از این ذرات که به جای یک فلز دارای دو فلز در ساختار آنها وجود دارد استفاده شده است [۲۵ و ۲۶]. برای مثال محققان نشان داده‌اند که خواص مغناطیسی یا خواص اپتیکی نانوذرات دو فلزی آهن- طلا بسیار بهتر از نانوذرات طلا یا آهن به تنهایی است [۲۵ و ۲۶]. امروزه براساس همین تفکر نانوذرات دوفلزی گوناگونی مثل طلا- نقره [۲۷]، طلا- مس [۲۸] و کوبالت- طلا [۲۹] سنتز و به منظور اهداف گوناگون استفاده می‌شوند [۳۰]. در مطالعه حاضر، از نانوذرات دوفلزی طلا- نقره برای مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی استفاده شد و امکان استفاده از این ذرات برای جلوگیری از بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی مطالعه گردید. شکل ۱ نشان داد که این نانوذرات در غلظت‌های بسیار پایین قادرند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی را مهار کنند و قدرت مهاری آنها با افزایش غلظت، کاهش می‌یابد. مطالعات ما نشان داد که این نانوذرات به تنهایی روی نشر فلورسانس تیوفلاوین T بی‌اثرند؛ بنابراین به راحتی از این روش برای بررسی اثر مهاری آنها می‌توان استفاده کرد (شکل ۲). اثر مهارکنندگی آنها به وسیله روش قرمز کنگو هم مورد تأیید قرار گرفت و نشان داده شد (شکل ۴) که در غلظت ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر این نانوذرات قادر به مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی هستند. مطالعات سینتیکی نشان داد این نانوذرات روی فاز تأخیر تأثیر ندارد ولی فاز رشد سریع تشکیل فیبر و همچنین فاز نهایی که فاز تعادل است را به طور مؤثری کاهش می‌دهند (شکل ۳).

زیستایی سلول‌هایی که با آمیلوئید لیزوزیم تیمار نشده‌اند برای کنترل آورده شده است. داده‌های حاصل، میانگین دو بار آزمایش مستقل و هر بار هر آزمایش چهار بار تکرار شده است ($p < 0.05$).

فیبرهای آمیلوئیدی لیزوزیم کاهش معنی‌داری را در احیای MTT در مقایسه با سلول‌های شاهد (که در مجاورت هیچ نوع تجمعی قرار نگرفته‌اند) نشان می‌دهد (به میزان ۵۹/۴ درصد کاهش) و تجمعات تشکیل شده در حضور نانوذرات نقره (با غلظت بهینه) به ترتیب به میزان ۱۹/۶ درصد کاهش احیای MTT را نشان می‌دهند. این نشان می‌دهد این نانوذرات، سمیت ناشی از فیبرهای آمیلوئیدی را کاهش داده و باعث جلوگیری از تخریب عملکرد سلول‌ها توسط فیبرهای آمیلوئیدی گشته‌اند.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

پدیده فیبری شدن پروتئین‌های محلول در اثر تجمع و رسوب آنها در مغز دلیل اصلی بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی از جمله بیماری‌هایی مثل آلزایمر، پارکینسون، هانتینگتون و اسفنجی شدن مغزی می‌باشد [۲۲]. در این تحقیق سعی شده است که اثرات مفید نانوذرات به‌عنوان یک استراتژی قدرتمند برای غلبه بر چنین بیماری‌هایی مورد مطالعه قرار گیرد. تعداد گوناگونی از نانوذرات فلزی مثل نانوذرات نقره، طلا، پالادیوم، سلیسیم، مس و پلاتین امروز به روش‌های شیمیایی یا بیولوژیکی به راحتی سنتز می‌شود و در دسترس قرار دارد [۲۳ و ۲۴].

آلزامی، الیگومرهای AB عامل اصلی سمیت سلولی هستند [۳۳] و نانوذرات قادرند به این الیگومرها متصل شوند و مانع از سمیت آنها برای سلول گردند [۳۲]. این ذرات به راحتی از سد عروقی - خونی می گذرند؛ بنابراین پتانسیل دارویی خوبی در این زمینه دارند (۸). با توجه به اینکه نانوذرات دوفلزی مثل طلا- نقره کارایی بیشتری نسبت به نمونه تک فلزی آنها دارند احتمالاً در آینده نزدیک می تواند در زمینه درمان بیماری های تحلیل برنده عصبی نقش مؤثری را ایفا کند.

سپاسگزاری

به این وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور به دلیل تصویب اعتبار پژوهشی لازم برای این طرح و نیز از سرکار خانم دکتر نسرین ملانیا بابت اهدای نانوذرات طلا- نقره، تقدیر و تشکر می شود.

References

- [1]. Zaman M, Ahmad E, Qadeer A, Rabbani G, Khan RH. Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation. *Int J Nanomed*. 2014; 9: 899-912.
- [2]. Gelperina S, Kisich K, Iseman MD, Heifets L. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172: 1487-1490.
- [3]. Chiang YD, Lian HY, Leo S-Y, Wang S-G, Yamauchi Y, Wu KCW. Controlling particle size and structural properties of mesoporous silica nanoparticles using the taguchi method. *J PhysChem C*. 2011; 115: 1358-13165.
- [4]. Zainala NA, Shukor SRA, Wab SRA, Razak KA. Study on the effect of synthesis parameters of silica nanoparticles entrapped with rifampicin. *AIDIC Conf Ser*. 2013; 11: 431-440.
- [5]. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297: 353.
- [6]. Tatini F, Pugliese AM, Traini C, Niccoli S, Maraula G, Ed Dami T, Mannini B, Scartabelli T, Pedata F, Casamenti F, Chiti F. Amyloid- β oligomer synaptotoxicity is mimicked by oligomers of the model protein HypF-N. *Neurobiol Aging* 2013;34:2100-9.
- [7]. Brambilla D, Verpillot R, Le Droumaguet B, Nicolas J, Taverna M, Kona J. PEGylated nanoparticles bind to and alter amyloid-beta peptide conformation: toward engineering of functional nanomedicines for Alzheimer's disease. *ACS Nano* 2012; 6: 5897-908.
- [8]. Farrall AJ, Wardlaw JM. Blood-brain barrier: ageing and micro vascular disease- systematic review and meta-analysis. *Neurobiol Aging* 2009; 30: 337-352.
- [9]. Gladvtz A, Abel B, Risselada HJ. Gold-Induced Fibril Growth: The Mechanism of Surface-Facilitated Amyloid Aggregation. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016; 55: 11242-6.
- [10]. Mahmoudi M, Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, et al. Magnetic resonance imaging tracking of stem cells in vivo using iron oxide nanoparticles as a tool for the advancement of clinical regenerative medicine. *Chem Rev*. 2011;111: 253-280.

همچنین مطالعات سمیت سلولی این نانوذرات نیز نشان داد که سمیت سلولی این فیبرها در مقایسه با فیبرهای تشکیل شده در حضور نانوذرات به طور معنی داری کاهش یافته است (شکل ۵). جلوگیری از تجمعات آمیلوئیدی، کاربردهای فراوانی در زیست شناسی و پزشکی دارد. این ذرات روی تجمعات آمیلوئیدی در بعضی شرایط اثر مهاری و در بعضی شرایط دیگر اثر تشدیدکنندگی دارند و مکانیسم دقیق اثر آنها در حال حاضر به روشنی تبیین نشده است. یکی از فرضیات این است که این نانوذرات به قسمت های آب گریز و مستعد تجمع پروتئین ها اتصال می یابد و باعث تاخوردگی مجدد پروتئین ها می شود و لذا مانع از اتصال این بخش ها و در نهایت، مانع از تجمع آنها می گردند. لذا از این نظر، این نانوذرات مثل چاپرون های طبیعی درون سلول عمل می کنند [۳۲ و ۳۱]. فرضیه دیگر این است که در بیماری های تحلیل برنده سیستم عصبی، این نانوذرات برای اتصال به پروتئین های طبیعی مونومر و الیگومرهای تجمع یافته با تمایل متفاوت، متصل می شوند. در بیماری

- [11]. Padmanabhan P, Kumar A, Kumar S, Chaudhary RK, Gulvas B. Nanoparticles in practice for molecular-imaging applications: an overview. *Acta Biomater*. 2016; 41: 1-16.
- [12]. Ramshini H, Moghaddasi AS, Aldaghi LS, Mollania N, Ebrahim-Habibi A. *Arch Ital Biol*. 2017; 155: 131-141
- [13]. Ramshini H, Moghaddasi AS, Mollania N, Khodarahmi R. Diverse antithetical effects of the bio-compatible Ag-NPs on the hen egg lysozyme amyloid aggregation: from an efficient inhibitor to obscure inducer *Journal of the Iranian Chemical Society*. *J Iran Chem Society* 2019; 16: 33-44
- [14]. Vural H, Demirin H, Kara Y, Eren I, Delibas N. Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease. *J Trace Elem Med Biol*. 2010; 24:169-173.
- [15]. Rita Cardoso B, Silva Bandeira V, Jacob-Filho W, FranciscatoCozzolino SM. Selenium status in elderly, relation to cognitive decline. *J Trace Elem Med Biol*. 2014; 28: 422-426.
- [16]. Kosik KS. Alzheimer's disease, a cell biological perspective. *Science* 1992; 256:780-783.
- [17]. Nazroglu M, Muhamad S, Pecze L. Nanoparticles as potential clinical therapeutic agents in Alzheimer's disease: focus on selenium nanoparticles. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2017; 10: 773-782.
- [18]. Toshima N, Yonezawa T. Bimetallic nanoparticles-novel materials for chemical and physical applications. *New J Chem*. 1998; 22: 1179-1201.
- [19]. Mesbahi-Nowrouzi M, Mollania M. Purification of selenite reductase from *Alcaligenes* sp. CKCr-6A with the ability to biosynthesis of selenium nanoparticle: Enzymatic behavior study in imidazolium based ionic liquids and organic solvent. *J Mol Liquids* 2018; 249: 1254-1262
- [20]. Ramshini H, mohammad-zadeh M, Ebrahim-Habibi A. Inhibition of amyloid fibril formation and cytotoxicity by a chemical analog of Curcumin as a stable inhibitor. *Int J Biol Macromol*. 2015; 78: 396-404.
- [21]. Nilsson MR. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods* 2004; 34: 151-60.
- [22]. Selkoe DJ. Folding proteins in fatal ways *Nature* 2004; 25;:428, 445.
- [23]. Iravani, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem*. 2011; 13: 2638-2650.

- [24]. Mittal A K, Chisti Y, Banerjee UC. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol. Adv.* 2013; 31: 346-356.
- [25]. Gao J, Ren X, Chen D, Tang F, Ren J. Bimetallic Ag-Pt hollow nanoparticles: Synthesis and tunable surface Plasmon resonance. *Scr. Mater.* 2007; 57: 687-690.
- [26]. Sun S, Murray CB, Weller D, Folks L, Moser A. Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices. *Science* 2000; 287: 1989-1992
- [27]. Vongsavat V, Vittur BM, Bryan WW, Kim J-H, Lee TR. Ultrasmall hollow gold-silver nanoshells with extinctions strongly red-shifted to the near-infrared. *ACS Appl Mater Interfaces* 2011; 3: 3616-3624.
- [28]. Sra AK, Schaak RE. Synthesis of atomically ordered AuCu and AuCu₃ nanocrystals from bimetallic nanoparticle precursors. *J Am Chem Soc.* 2004; 126: 6667-6672.
- [29]. Cheng G, Hight Walker AR. Synthesis and characterization of cobalt/gold bimetallic nanoparticles. *J Magn Mater* 2007; 311: 31-3.
- [30]. Yuan L, Hu W, Zhang H, Chen L, Wang J, Wang Q. Cu₅FeS₄ nanoparticles with tunable plasmon resonances for efficient photothermal therapy of cancers. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020; 8: 21.
- [31]. Javed I, Peng G, Xing Y, Yu T, Zhao M, Kakinen A, Faridi A, Parish CL, Ding F, Davis TP, Ke PC, Lin S. Inhibition of amyloid beta toxicity in zebrafish with a chaperone-gold nanoparticle dual strategy. *Nat Commun.* 2019; 10: 3780.
- [32]. Parveen R, Shamsi TN, Fatima S. Nanoparticles-protein interaction: Role in protein aggregation and clinical implications. *Int J Biol Macromol.* 2017; 94: 386-395
- [33]. Siddiqi MK, Malik S, Majid N, Alam P, Khan RH. Cytotoxic species in amyloid-associated diseases: oligomers or mature fibrils. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2019; 118: 333-369.

Identification of Bimetallic Au/Ag Nanoparticles on lysozyme Amyloid Fibrillization and Prevent Its cytotoxicity

Hassan Ramshini^{1*}

1. Associate Professor, Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: The accumulation of amyloid aggregates in the brain are associated with numerous neurodegenerative disorders. Several nanoparticles (NP) have been using for treatment of neurological disease. Metal nanoparticles can be modified through the construction of bimetallic architectures consisting of two distinct metals that their properties can be dramatically different from those of the corresponding single-component particles. At the present study, we evaluated the effect of the bimetallic Au/Ag nanoparticles on hen lysozyme amyloid aggregation as a model protein for amyloid formation.

Materials and Methods: In this experimental study, to induce amyloid formation, Acidic pH and high temperatures were used. Hen egg white lysozyme (HEWL) was dissolved at 2 mg/mL in 50mM glycine buffer (pH 2.5), and then incubated at 57 °C for the specified durations. The inhibitory effect of the nanoparticles against HEWL fibrillation using and ThT (thioflavin T), Congo red and MTT assay was investigated.

Results: ThT assay showed that the particles are able to inhibit HEWL aggregation in a pattern of inverse dose-dependent inhibition and with the best inhibitory concentration 0.01 µg/ml. Kinetic study of showed that the particles caused lag phase do not change but stationary phase decreased and also cytotoxic activity of HEWL aggregates in presence of Au/Ag nanoparticles was significantly diminished ($P < 0.05$).

Conclusions: We anticipate that based on obtained insights in design of new bimetallic nanoparticles, rationally design of effective NP-based therapeutics for neurodegenerative diseases may be a feasible perspective.

Received: 2020/02/29

Accepted: 2020/04/26

Keywords: Amyloid aggregation, Gold-silver nanoparticles, Hen egg white lysozyme, Cell toxicity.