مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا | سال دهم | شماره ۲ | تابستان ۱۳۹۹

مقاله پژوهشی

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

آزاده حکمت*، زهرا روشنی

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

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۹/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۱/۱۲

چکیده

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

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

نتایج: خاموشی نشر فلورسانس نشان داد نانوذرات نقره حاوی ماتریس پراکنده اتیلن گلیکول با ثابت اتصال (K_a) بالاتر ($۵۶\times۱۰^{۴}M^{-1}$) در مقایسه با دو نوع نانوذره دیگر با HSA برهمکنش می‌دهند. مطالعات CD نشانگر کاهش محتوای آلفا هلیکس پروتئین به‌ویژه پس از افزودن نانوذرات نقره حاوی ماتریس پراکنده اتیلن گلیکول (از ۵۱/۴۵٪ به ۴۱/۷۱٪) است. آنالیز پتانسیل زتا بیانگر کاهش بار سطحی HSA به‌ویژه پس از افزودن نانوذرات نقره حاوی ماتریس پراکنده اتیلن گلیکول از (۱۶/۷۳ mV- به ۱۱/۷۹ mV-) است.

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

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

مقدمه

گسترش فناوری نانو در دهه اخیر موجب پیشرفت شگرفی در صنایع مختلف شده است. نانوذرات به دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فردشان ازجمله افزایش نسبت سطح به حجم، زیست‌سازگاری، پایداری شیمیایی و زیستی بالا در صنایع دارویی، پزشکی و محیط‌زیست استفاده می‌شوند. در میان نانوذرات فلزی، نانوذرات نقره (AgNPs) به علت خواص ویژه‌شان توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است. نانوذرات نقره به دلیل دارا بودن خواص ضد میکروبی خود جهت درمان زخم‌ها، سوختگی‌ها و عفونت‌های میکروبی به کار می‌روند. به‌عبارت‌دیگر فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره علت اصلی گسترش استعمال آن‌ها در صنایع مختلف است. بیش از ۸۰۰ محصول صنعتی شامل نانو ذرات نقره هستند. به‌عنوان‌مثال در بسته‌بندی محصولات غذایی و مکمل‌های غذایی، صنعت نساجی، صنایع الکترونیک، وسایل آرایشی و بهداشتی، ضدعفونی‌کننده‌های آب و اسپری‌های خانگی از نانو نقره استفاده می‌شود (۱). نانوذرات نقره همچنین نقش ویژه‌ای در درمان سرطان دارند. مطالعات پیشین نشان داده است نانوذرات نقره (با ابعاد کوچک) می‌تواند به درون سلول سرطانی نفوذ کنند و موجب القای آپاپتوز در آن‌ها گردند (۲). همچنین نانوذرات نقره می‌توانند با بیوماکرومولکول‌ها (به‌ویژه پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک) برهمکنش دهند و موجب تغییرات ساختاری در آن‌ها گردند (۵-۳).

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

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

Email: hekmat@ut.ac.ir

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

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.15.7]

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

روش‌های متعددی جهت سنتز نانوذرات نقره وجود دارد. یکی از روش‌های تولید نانوذرات نقره روش احیای شیمیایی است که احیاکننده یکی از ارکان اصلی تولید نانو ذرات در این روش است. احیاکننده، الکترون موردنیاز برای تبدیل یون نقره به فلز نقره را مهیا می‌کند. احیاکننده می‌تواند یک عامل شیمیایی، زیست ماده استخراجی گیاهی و یا حاصل از روش‌های پرتو تابی باشد که یون‌های لازم برای احیای یون نقره به فلز نقره را فراهم می‌آورد (۷). سدیم بوروهیدرید، هیدرازین، اسکوربیک اسید، سیترات سدیم، فرمالدئید و لیگاندهای کمپلکس‌کننده آنیونی ازجمله عوامل شیمیایی احیا هستند (۱۰-۸). اخیراً از اتیلن گلیکول و گلیسیرین نیز به‌عنوان حلال استفاده‌شده است و این دو عامل به‌طور هم‌زمان وظیفه احیا را انجام می‌دهند (۱۱). سیترات سدیم با فرمول شیمیایی $Na_3C_6H_5O_7$ شناخته می‌شود. این نمک اندکی شور و ترش‌مزه است. به همین دلیل سیترات‌های فلزی قلیایی و قلیایی خاک (برای مثال سیترات سدیم و سیترات کلسیم) معمولاً نمک ترش نامیده می‌شوند. سدیم سیترات نمک آلی مهمی در بیوتکنولوژی غذایی، داروسازی و کشاورزی است (۱۲). اتیلن گلیکول زیست سازگار، غیر سمی و زیست‌تخریب‌پذیر است که جهت استفاده در مواد غذایی و دارویی مورد تائید سازمان غذا و دارو (FDA) است. این ترکیب به‌منظور آماده‌سازی میکرو و نانوذرات برای پوشش دهی آن‌ها استفاده‌شده و تا به امروز مورداستفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر این پلیمر اتیلن گلیکول توانایی بالایی در بارگذاری بالای دارو، حفاظت از ساختارهای کپسوله کننده و آنالیت درون آن‌ها و حفاظت از خاصیت نانوذرات مغناطیسی را دارا است (۱۳).

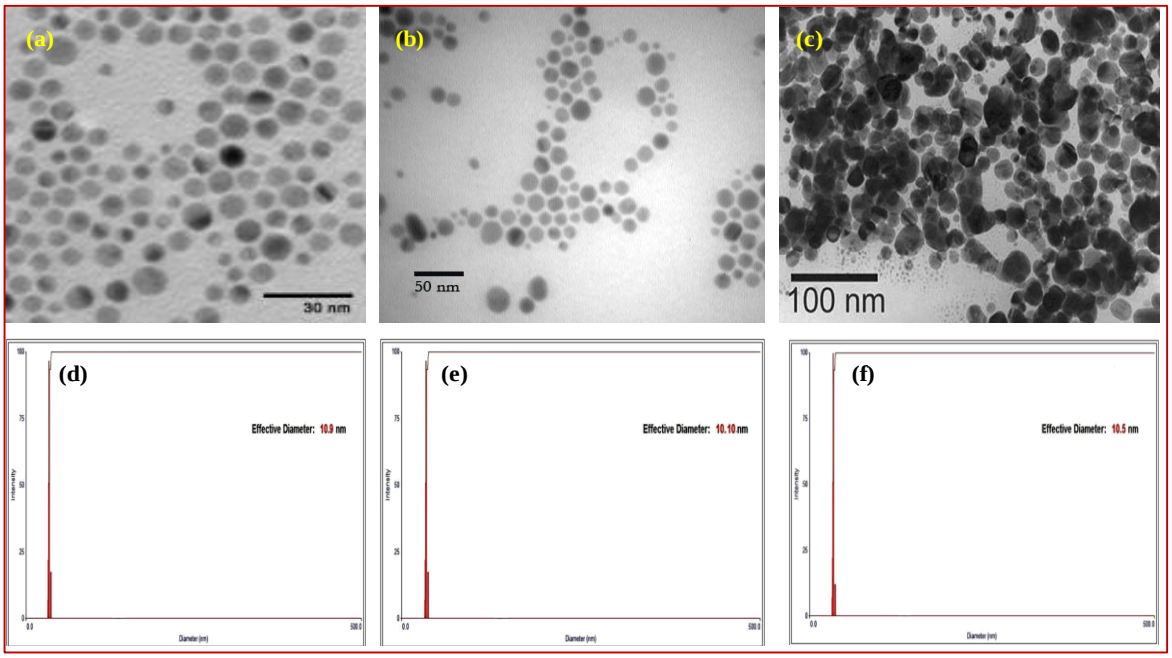
نانوداروها پس از ورود به سیستم خون با احتمال بالا با پروتئین‌های خون به‌ویژه HSA برهمکنش خواهند داشت. لذا بررسی مقدار و نوع این برهمکنش‌ها با این پروتئین حیاتی خون ضروری است زیرا اگر میزان اتصال نانوداروها به این پروتئین زیاد باشد نه‌تنها موجب تغییر ساختار این پروتئین و تغییر اعمال آن می‌شود بلکه میزان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

مواد و روش‌ها

مواد

پروتئین سرم آلبومین انسانی (به‌صورت پودر لیوفیلیزه و فاقد چربی) و نانوذرات نقره (با اندازه ۱۰ نانومتر، کروی شکل، دارای سدیم سیترات به‌عنوان پایدارکننده، ۰/۰۲ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر بافر آبی و دانسیته ۰/۹۹۷ گرم بر میلی‌لیتر) (شکل a۱ و d) از شرکت سیگما آلدریچ (آمریکا) تهیه شدند. نانوذرات نقره (با اندازه ۱۰ نانومتر به حالت کلوئیدی و به شکل کروی حلال در آب) (شکل b۱ و e) از شرکت نانو پارمیس فناور، پارک علم و فناوری دانشگاه تهران (ایران) و نانوذرات نقره (با اندازه ۵ تا ۱۰ نانومتر، به شکل مایع و ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول با pH ۸-۵) (شکل c۱ و e) از شرکت بیوسرا (کره جنوبی) خریداری شدند. Tris hydroxymethyl aminomethane (Tris-base) از شرکت سیناژن (ایران) خریداری گردید. تائید اندازه نانوذرات با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری پراکندگی نور پویا (DLS) Brookhaven Instruments Corporation (ساخت آمریکا) انجام شد. تمام آزمایش‌ها در بافر Tris-base ۰/۱ مولار با pH ۷/۴ انجام شد. آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.15.7]



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

مطالعات طیف‌سنجی نشر فلورسانس

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

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

که در این معادله F_{obs} و F_{corr} بیانگر شدت نشر فلورسانس مشاهده‌شده و شدت نشر فلورسانس تصحیح‌شده است. Ab_{ex} و Ab_{em} بیانگر جذب محلول در طول‌موج‌های تحریک و نشر است.

مطالعات طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD)

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

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.15.7]

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

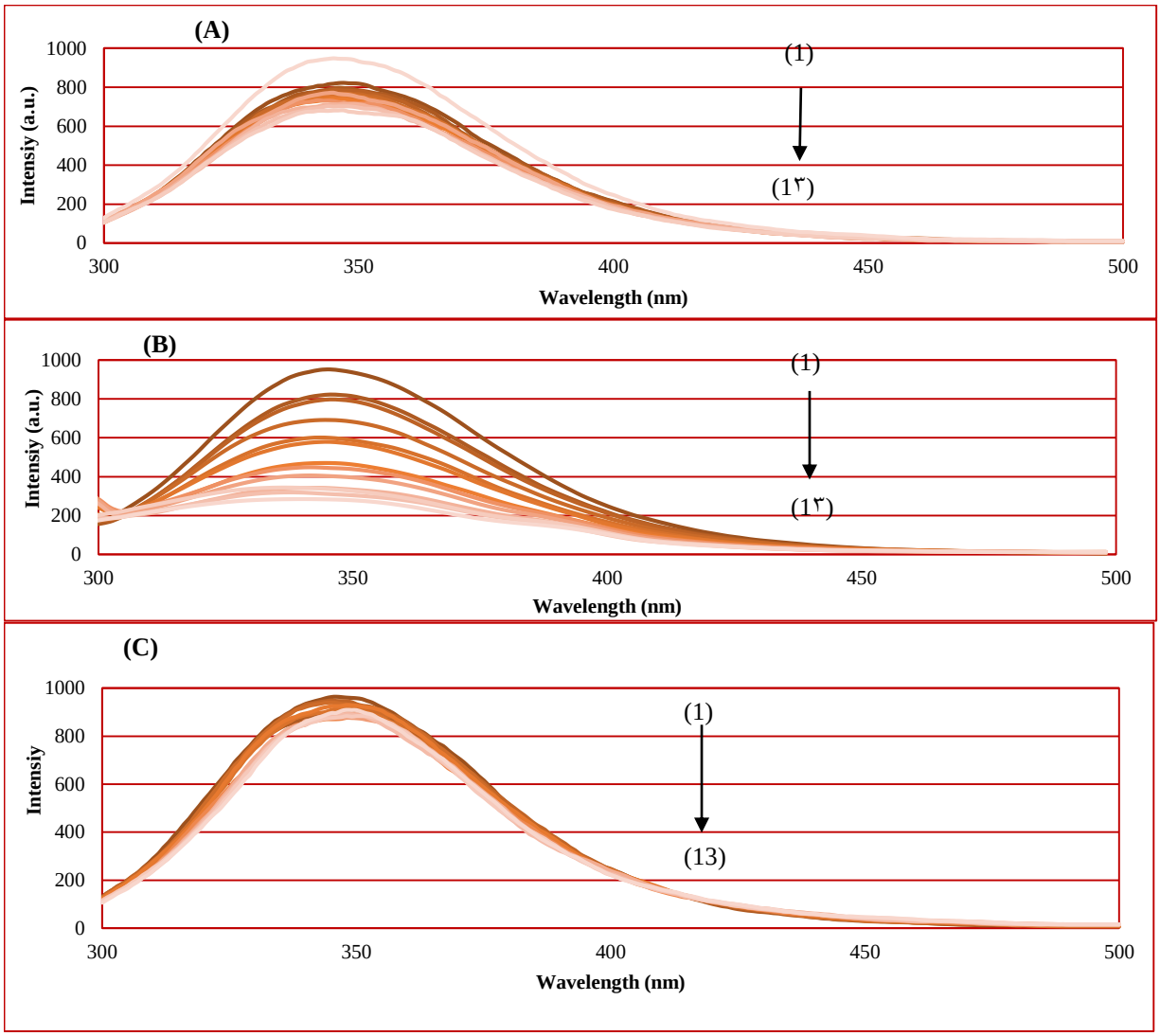
مطالعات پتانسیل زتا (ζ)

اختلاف‌پتانسیل بین آخرین لایه محلول دربرگیرنده ذرات کلوئید و اولین لایه غیر متحرک از حلال اطراف ذرات کلوئید را پتانسیل الکتروسینتیک یا پتانسیل زتا می‌نامند. پتانسیل زتا، مقدار دافعه بین ذره مجاور را نشان می‌دهد پتانسیل زتا نمونه‌های HSA (۳/۷۶ میکرومولار) در حضور و عدم حضور هر سه نوع نانوذرات نقره (۲۱۴ میکرومولار) به‌وسیله دستگاه Zetasizer Nano-ZS مدل MALVERN (ساخت انگلیس) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد.

نتایج

مطالعات نشر فلورسانس

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



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

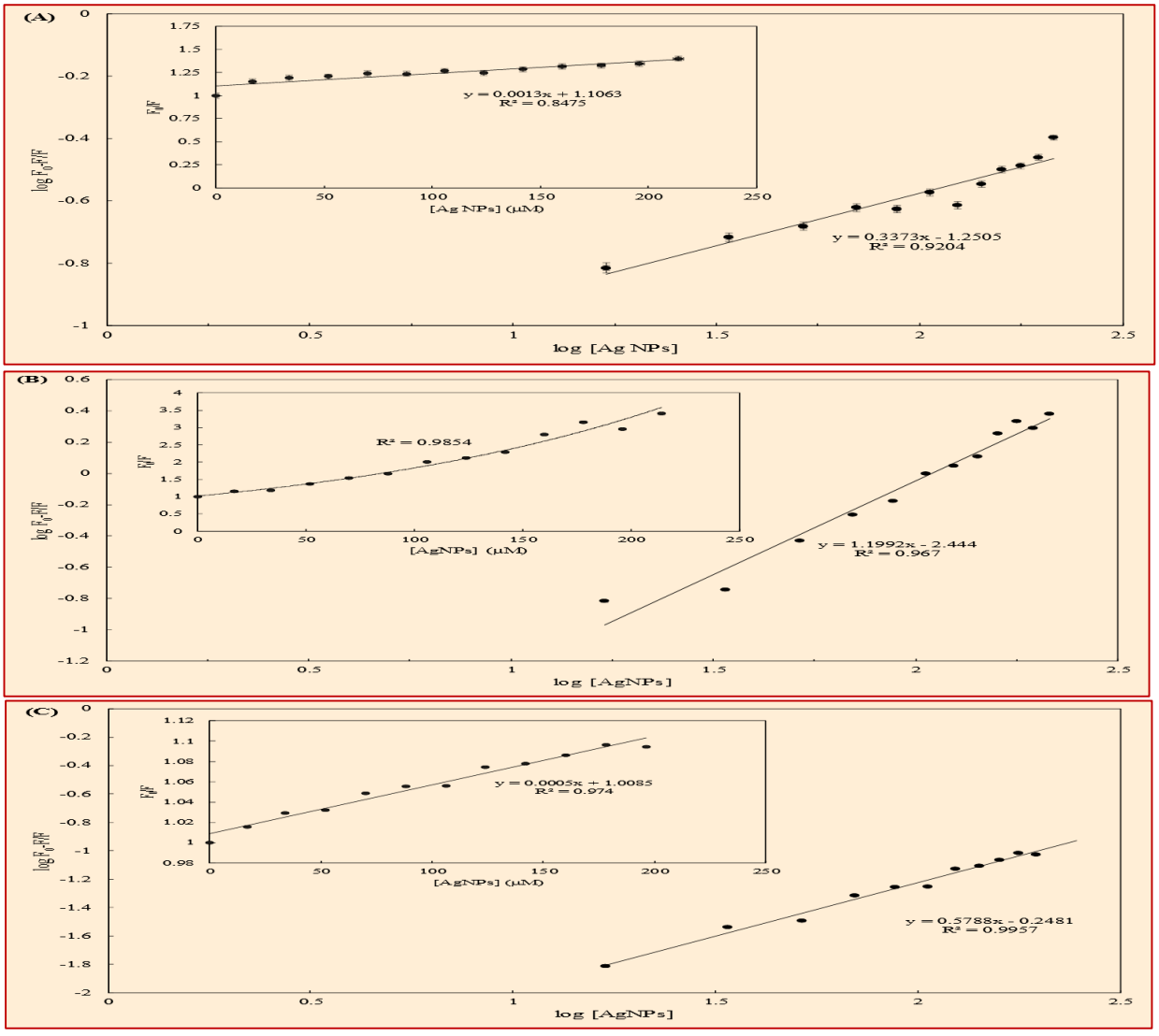
[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.15.7]

انجام یافت. فلورسانس ذاتی HSA تنها توسط Trp ایجاد می‌شود. HSA تنها یک اسیدآمینه (رزیدو) Trp در موقعیت ۲۱۴ دارد (۱۴). هرگونه تغییر در قطبیت اطراف Trp را می‌توان با تغییر در حداکثر قله نشر فلورسانس ارزیابی نمود (۱۴).

نمودار ۱ تغییرات در نشر HSA با افزایش غلظت نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه، نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات و نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌گردد با افزایش غلظت هر سه نوع نانوذرات نقره شدت نشر HSA در طول‌موج ۳۴۸ نانومتر کاهش یافت. این در حالی است که جابجایی اندکی در طول‌موج بیشینه به سمت طول‌موج‌های کمتر (blue shift) مشاهده می‌شود. واضح است که کاهش نشر فلورسانس (خاموشی فلورسانس)، ناشی از کاهش قرارگیری سطح رزیدو Trp در معرض حلال قطبی است (۱۵).

تعیین پارامترهای اتصال

هنگامی‌که در محیط مولکول‌های تحریک‌شده حضورداشته باشند بسیاری از اتفاقات بین مولکول و محیط (حلال) روی می‌دهد که موجب تغییر در مشاهده نشر فلورسانس می‌شود. طبق گزارش‌ها موارد بسیاری سبب کاهش شدت فلورسانس می‌گردد از آن جمله، انتقال انرژی، انتقال بار، برخورد مولکول‌ها



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

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.15.7]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

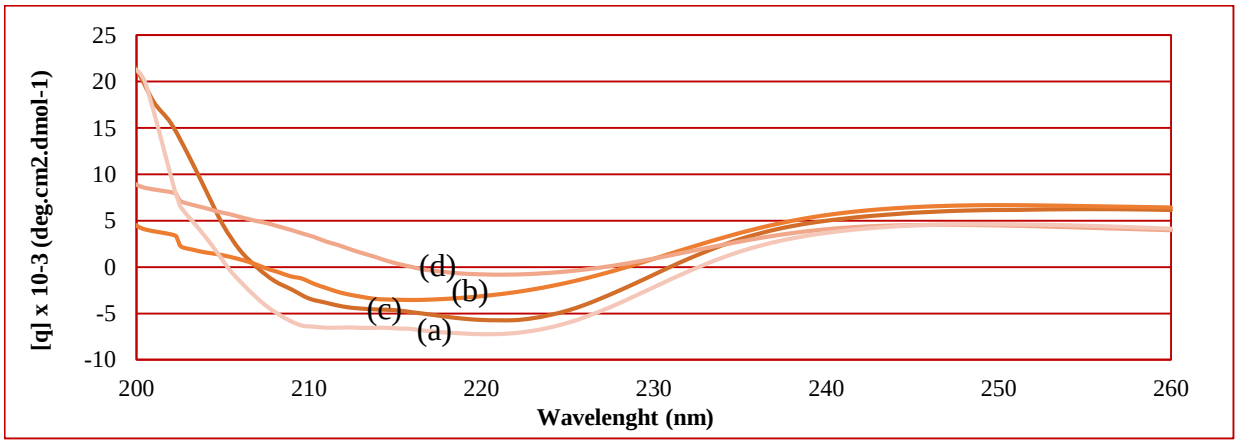
	K_A (M^{-1})	n	K_q ($M^{-1}S^{-1}$)	K_{sv} (M^{-1})	ΔG° (kJ mol^{-1})
نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه	۵/۶×۱۰^{۴}	۰/۴۴	۵/۹×۱۰^{۱۰}	۱۳×۱۰^{۲}	-۲۸/۱۹
نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات	۳۶×۱۰^{۲}	۱/۱۹	-	-	-۲۱/۱۱
نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول	۵۶×۱۰^{۴}	۰/۶	۲/۲۷×۱۰^{۱۰}	۵×۱۰^{۲}	-۳۴/۱۲

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

مطالعات طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD)

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

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.15.7]



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

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

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

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

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

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

مطالعات پتانسیل زتا

پتانسیل زتا، مقدار دافعه بین ذره مجاور را نشان می‌دهد. جدول ۳ پتانسیل زتا HSA را در غیاب و حضور هر سه نوع نانوذرات نقره را نشان می‌دهد. میزان پتانسیل زتا در HSA برابر با ۱۶/۷۳ mV- است. این مقدار با مطالعات پیشین تطابق دارد (۶، ۱۸). نتایج حاصل از مطالعه پتانسیل زتا نشان می‌دهد در حضور نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات میزان بار سطحی کاهش (۱۳/۹۰ mV-) می‌یابد این حالت بیانگر تغییر

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.15.7]

ساختار HSA است. در حضور نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول بار سطحی کاهش بیشتری می‌یابد (۱۱/۷۹ mV-) و در حضور نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه میزان تغییر بار کمتر مشاهده می‌گردد (۱۴/۵۵ mV-).

بحث

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

پس از ورود داروها به درون خون، آن‌ها از طریق HSA جمع‌آوری‌شده و به قسمت‌های مختلف بدن حمل می‌شوند. جذب، توزیع، متابولیسم، دفع و سمیت داروها می‌تواند درنتیجه اتصال آن‌ها به HSA به میزان قابل‌توجهی تغییر کند. درنتیجه، HSA به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان یک پروتئین مدل در ارزیابی اثر متقابل پروتئین و دارو مورداستفاده قرار می‌گیرد. میزان اتصال نانوذرات یا نانوداروها به HSA بر میزان دسترسی بافت‌های هدف به دارو یا نانوذرات مؤثر است. درنتیجه، بسیاری از شرکت‌های دارویی مطالعه اتصال دارو با HSA را به‌عنوان اولین مرحله طراحی دارو به کار می‌برند. تکنیک‌هایی مانند طیف‌سنجی جذب UV-Vis، طیف‌سنجی فلورسانس و CD می‌تواند به مطالعه تعامل بین مولکول‌های کوچک و پروتئین‌ها کمک شایانی می‌کنند. در این مطالعه با استفاده از تکنیک‌های طیف‌سنجی به بررسی تأثیر نوع پوشش نانوذرات نقره در هنگام اتصال به HSA و تأثیر نوع پوشش نانوذرات نقره با اندازه یکسان در ایجاد تغییرات ساختاری در پروتئین در شرایط *in vitro* پرداخته شد.

طیف‌سنجی فلورسانس یک تکنیک بسیار قوی برای مطالعه ساختار و خصوصیات ماکرومولکول‌های موجود در محلول است، لذا در این مطالعه با کمک تکنیک طیف‌سنجی فلورسانس مطالعه اتصال نانوذرات نقره به پروتئین HSA انجام شد. پروتئین‌ها به دلیل حضور آمینواسیدهای تریپتوفان، تیروزین و فنیل‌آلانین (فلوروفور) دارای نشر فلورسانس ذاتی هستند. پروتئین سرم آلبومین انسانی تک زنجیره، با ۵۸۵ اسیدآمینه و ۱۷ پیوند دی سولفیدی است و تنها دارای یک تریپتوفان (تریپتوفان ۲۱۴) است. فلورسانس ذاتی پروتئین سرم آلبومین انسانی اساساً از باقیمانده‌های (رزیدوهای) تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین ایجاد می‌شود. ازآنجاکه فلورسانس اسیدآمینه فنیل آلانین بسیار کم و فلورسانس تیروزین نیز تقریباً هنگامی‌که این اسیدآمینه یونیزه می‌شود و یا نزدیک یک گروه آمینو یا کربوکسیل تریپتوفان است خاموش می‌شود، پس فقط باقی‌مانده تریپتوفان ۲۱۴ حساس به لیگاندی است که متصل می‌شود؛ بنابراین شدت فلورسانس فقط به باقی‌مانده تریپتوفان ۲۱۴ نسبت داده می‌شود. اسیدآمینه تریپتوفان در پروتئین سرم آلبومین انسانی در نزدیکی سطح پروتئین، در مارپیچ ۲ از زیر دمین IIA قرار دارد (۱۴). شکل ۱ کاهش شدت بیشینه نشر فلورسانس HSA همراه با اندکی جابجایی به سمت چپ (طول‌موج پایین‌تر) با افزایش غلظت هر سه نوع نانوذرات نقره را نشان می‌دهد. قابل‌توجه است که تغییر در حداکثر طول‌موج نشر به دلیل تغییرات قطبیت در اطراف دنباله‌های کروموفور است و انتقال به سمت طول‌موج‌های بالاتر نشان‌دهندهٔ این است که به‌طور متوسط زیر واحد تریپتوفان، بیشتر در معرض حلال قرارگرفته است، درحالی‌که انتقال به سمت طول‌موج‌های پایین‌تر نتیجه انتقال زیرواحدهای تریپتوفان به محیط آبگریزتر است (۱۵، ۲۰)؛ بنابراین در مطالعه حاضر انتقال به سمت طول‌موج پایین‌تر در بیشینه طول‌موج نشر می‌تواند ناشی از تغییر کوچک در محیط اطراف تریپتوفان پروتئین باشد این نتایج با مشاهدات Voicescu و همکاران (۲۱)

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.15.7]

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

با آنالیز تغییرات در نشر فلورسانس می‌توان اطلاعاتی درباره تأثیر برخورد مولکول تحریک‌شده با محیط اطراف به دست آورد. شدت نشر فلورسانس یک مولکول می‌تواند تحت تأثیر انواع برهمکنش‌ها کاهش یابد. این برهمکنش‌ها، شامل برهمکنش‌های حالت تحریک‌شده (excited – state)، آرایش دوباره مولکولی، انتقال انرژی، ایجاد کمپلکس‌های حالت پایه (ground-state) و خاموشی تصادفی (Collisional) می‌باشند. به چنین کاهش در شدت نشر فلورسانس پدیده فرونشانی یا خاموشی (Quenching) گفته می‌شود. برخی مقالات پدیده خاموشی در نشر فلورسانس را به دودسته بزرگ خاموشی دینامیک و خاموشی استاتیک تقسیم‌بندی می‌کنند. اساس تقسیم‌بندی فوق، چگونگی رابطه بین شدت نشر فلورسانس و غلظت خاموش‌کننده است که آیا کاملاً با معادله استرن - ولمر همخوانی دارد (خاموشی دینامیک) یا ندارد (خاموشی استاتیک). پدیده خاموشی دینامیک زمانی اتفاق می‌افتد که یک اتم یا مولکول با فلوروفور در حالت تهیجی، برخورد نموده و سبب بازگشت فلوروفور به حالت پایه، بدون انتشار گردد. پدیده خاموشی استاتیک زمانی اتفاق می‌افتد که فلوروفور با مولکول دیگری کمپلکس ایجاد نماید و بازگشت به حالت پایه برای فلوروفور فاقد هرگونه انتشار باشد. در این حالت وابستگی میزان نشر به‌عنوان تابعی از غلظت خاموش‌کننده است (۲، ۱۴، ۱۷). در مطالعه حاضر هر سه نوع نانوذرات نقره قادر به کاهش شدت نشر فلورسانس HSA بوده‌اند یا به‌عبارت‌دیگر هر سه نوع نانوذرات نقره فوق به‌عنوان خاموش‌کننده نشر فلورسانس HSA عمل کرده‌اند که جداگانه مکانیسم خاموشی هر یک بحث خواهد شد. جهت یافتن پارامترها و مکانیسم دخیل در پدیده خاموشی از معادله استرن- ولمر استفاده شد. نمودار $\frac{F_0}{F}$ علیه نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول به‌صورت خط راست شد. به‌عبارت‌دیگر اتصال نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول به HSA موجب خاموشی فلوروفور می‌گردد و در این پدیده سهم خاموشی، مخلوطی از خاموشی استاتیک و خاموشی دینامیک است. جهت نتیجه‌گیری بهتر مقدار k_q از طریق معادله ۲ محاسبه گردید. ازآنجاکه مقدار k_q محاسبه‌شده برای نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول بیشتر از مقدار محدودکننده 1×10^{10} $M^{-1}S^{-1}$ است (۲۳)، بنابراین خاموشی نشر فلورسانس HSA در حضور نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول از نوع استاتیک (از طریق ایجاد کمپلکس حالت پایه) است (جدول ۱). نمودار $\frac{F_0}{F}$ علیه نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه نیز به‌صورت خط راست شد. به‌عبارت‌دیگر اتصال نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه به HSA موجب خاموشی فلوروفور می‌گردد و در این پدیده سهم خاموشی، مخلوطی از خاموشی استاتیک و خاموشی دینامیک است. ازآنجاکه مقدار k_q محاسبه‌شده برای نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه نیز بیشتر از مقدار محدودکننده 1×10^{10} $M^{-1}S^{-1}$ است (۲۳)، بنابراین خاموشی نشر فلورسانس HSA در حضور نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه نیز از نوع استاتیک است (جدول ۱). نمودار $\frac{F_0}{F}$ علیه نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات به‌صورت انحراف مثبت از خط راست شد. به‌عبارت‌دیگر اتصال نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات موجب خاموشی فلوروفور می‌گردد و در این پدیده سهم تشکیل کمپلکس غیر فلورسانس (خاموشی استاتیک) بیش از خاموشی دینامیک است (۲۳).

ازآنجاکه خاموشی برای هر سه نوع نانوذرات نقره از نوع استاتیک تشخیص داده شد، پارامترهای اتصال با استفاده از رابطه مدیفای شده استرن- ولمر تعیین شدند. مقادیر n و ثابت اتصال نانوذرات نقره مختلف به مولکول HSA متفاوت بوده و مقدار ثابت اتصال برای نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول (M^{-1} $5/6\times10^{4}$) بیشتر از دو نانوذره نقره (M^{-1} 36×10^{2}) برای نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات و M^{-1} $5/6\times10^{4}$ برای

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.15.7]

نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه) به دست آمد. به‌عبارت‌دیگر نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول تمایل بیشتری به اتصال با HSA نسبت به نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات و نانوذرات بدون پوشش ویژه دارند. بر طبق جدول ۱ مقدار ΔG° اتصال برای هر سه نوع نانوذرات نقره منفی به دست آمد که بیانگر خودبه‌خودی بودن فرآیند اتصال نانوذرات نقره با HSA است (۱۷). همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود مقدار ΔG° برای نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول ($-۲۸/۱۹\ kJ\ mol^{-1}$) نسبت به دو نانوذره نقره دیگر بیشتر است که دلیل بر ایجاد کمپلکس قوی‌تر این نوع نانوذره نقره با HSA است (۲۴).

به کمک طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی می‌توان ساختمان فضایی ماکرومولکول‌ها را در محلول‌ها و همچنین برهمکنش‌های ماکرومولکولی را مطالعه نمود. طیف‌های CD در ناحیه far-UV جهت مطالعه تعیین ساختار دوم استفاده می‌شود که این طیف‌ها ناشی از جذب پیوند پپتیدی پروتئین می‌باشند. مقدار بیضی‌واری مولی در ۲۲۲ نانومتر و ۲۰۸ نانومتر یا نسبت این دو برای تعیین میزان مارپیچ آلفا و مقدار بیضی‌واری مولی در ۲۱۷ نانومتر به‌عنوان شاخصی برای میزان صفحات بتای موجود در پروتئین استفاده می‌گردد (۱۴). همان‌طور که در نمودار ۳ قابل‌مشاهده است، طیف CD به‌دست‌آمده برای HSA دو قله منفی در حدود طول‌موج‌های ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر را نشان می‌دهد. همان‌گونه که ذکر شد طیف CD پروتئین‌های دارای ساختار غالب آلفا هلیکس دارای دو قله منفی در حدود طول‌موج‌های ۲۰۸ نانومتر و ۲۲۲ نانومتر است. انرژی و شدت این قله‌ها مربوط به زوایای پیوند پپتیدی (Ψ و Φ) است؛ بنابراین بر طبق مطالعات حاضر پروتئین سرم آلبومین انسانی دارای درصد بالایی از آلفا هلیکس در ساختار دوم خود است (۵۱/۴۵٪). این نتیجه با مطالعات پیشین مبنی بر آلفا هلیکس بودن HSA تطابق دارد (۱۴، ۲۲). درصد ساختارهای دوم HSA توسط نرم‌افزار CDNN محاسبه گردید. نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که در اثر میانکش نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول با HSA ناپایداری در ساختار دوم پروتئین روی می‌دهد و محتوای آلفا هلیکس از ۵۱/۴۵٪ به ۴۱/۷۱٪ کاهش می‌یابد. محتوای آلفا هلیکس ساختار دوم پروتئین در اثر میانکش با نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه نیز از ۵۱/۴۵٪ به ۴۴/۶۴٪ کاهش یافت و محتوای رندوم کویل و صفحات بتا افزایش یافت. Wang و همکاران (۲۵) و Fu و همکاران (۲۶) گزارش کرده‌اند هنگامی‌که میزان بیضی‌واری HSA پس از افزودن لیگاند تا حدی کاهش یابد، نشان‌دهنده از دست رفتن برخی از ساختارهای آلفا هلیکسی پروتئین است. همچنین این کاهش درصد در ساختار آلفا هلیکس نشان می‌دهد لیگاند قادر است با باقی‌مانده اسیدآمینه‌های زنجیره پلی پپتید HSA برهمکنش دهد و شبکه پیوند هیدروژن را تا حدودی از بین ببرد. همچنین در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که قله منفی در حدود طول‌موج ۲۲۲ نانومتر با میزان پیوندهای هیدروژنی ساختار آلفاهلیکس ارتباط دارد (۲۷)؛ بنابراین بر پایه این گزارش‌ها در حضور نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول و نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه میزان پیوندهای هیدروژنی در پروتئین کاهش‌یافته است و این کاهش می‌تواند درنتیجه شکسته شدن و حذف برخی از پیوندهای هیدروژنی و تشکیل پیوندهای هیدروژنی جدید با ساماندهی کمتر (تشکیل صفحات بتا و رندوم کویل) باشد که این امر موجب تغییر محتوای ساختار دوم پروتئین و کاهش پیوند هیدروژنی گردیده است. محتوای آلفا هلیکس پروتئین در حضور نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات نیز از ۵۱/۴۵٪ به ۴۷/۰۸٪ کاهش می‌یابد؛ اما ذکر این نکته حائز اهمیت است که تغییرات ساختار دوم در حضور هر سه نوع نانوذرات نقره بسیار چشمگیر نیست و باعث تغییرات اساسی در ساختار دوم پروتئین نشده‌اند. به‌عبارت‌دیگر اتصال نانوذرات نقره موردمطالعه در این پژوهش تغییرات در سطح ساختار سوم پروتئین ایجاد می‌کنند اما موجب تغییر در ساختار دوم پروتئین نمی‌شوند.

در اتصال لیگاند به پروتئین چهار نوع برهمکنش غیرکوالانسی شامل پیوندهای هیدروژنی، نیروی واندروالسی، میان کنش‌های هیدروفوبی و الکتروستاتیک می‌توانند دخیل باشند. مطالعه انجام‌شده توسط Ragi و همکاران نشان داد در حضور اتیلن گلیکول تغییرات ساختاری در ساختار دوم HSA ایجاد می‌شود و محتوای صفحات بتا در HSA افزایش می‌یابد. همچنین آن‌ها گزارش کردند که اتیلن گلیکول از طریق پیوند هیدروژنی به HSA متصل می‌شود (۲۸)؛ بنابراین ازآنجاکه تغییرات مشاهده‌شده توسط اتیلن گلیکول بر ساختار HSA با تغییرات مشاهده‌شده در ساختار HSA در حضور نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول تطابق دارد، می‌توان نتیجه گرفت که پوشش اتیلن گلیکول بر میزان برهمکنش نانوذرات نقره و ایجاد تغییرات ساختاری در پروتئین سرم آلبومین انسانی

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.15.7]

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

پتانسیل الکتروسینتیک یا پتانسیل زتا اختلاف‌پتانسیل بین آخرین لایه محلول دربرگیرنده ذرات کلوئید و اولین لایه غیر متحرک از حلال اطراف ذرات کلوئید است. پتانسیل زتا، مقدار دافعه بین ذره مجاور را نشان می‌دهد. میزان پتانسیل زتا اندازه‌گیری شده در HSA برابر با ۱۶/۷۳ mV- به دست آمد که با عدد گزارش‌شده در مطالعات پیشین تطابق دارد (۶، ۱۸). کاهش پتانسیل زتا HSA در حضور نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول از ۱۶/۷۳ mV- به ۱۱/۷۹ mV- احتمالاً به علت ایجاد برهمکنش غیر کووالانسی و از نوع هیدروژنی با زنجیره جانبی اسیدهای آمینه پروتئین است (۲۸). کاهش پتانسیل زتا HSA در حضور نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات از ۱۶/۷۳ mV- به ۱۳/۹۰ mV- احتمالاً به علت وجود جفت یون سیترات سدیم و ایجاد پیوند الکترواستاتیک با پروتئین است، البته از برهمکنش‌های هیدروفوبی نمی‌توان چشم‌پوشی کرد. پروتئین HSA دارای ۵۹ اسیدآمینه لیزین و ۲۴ اسیدآمینه آرژینین است و اکثر اسیدهای آمینه‌های لیزین بر سطح این پروتئین قرار دارند (۳۰). این زنجیره‌های جانبی باردار در اسیدهای آمینه می‌توانند با گروه‌های باردار برهمکنش الکترواستاتیک ایجاد نمایند. برهمکنش الکترواستاتیک می‌تواند منجر به شکل‌گیری ساختارهای جدید با ویژگی‌های جدید گردد. Roy و Das (۳۱) نشان دادند برهمکنش بین نانوذرات نقره با سرم آلبومین گاوی از طریق برهم‌کنش‌های هیدروفوب و الکتروستاتیک انجام می‌شود؛ بنابراین نوع پوشش نانوذرات نقره در نوع برهمکنش و میزان اتصال نانوذرات نقره با HSA مؤثر است، به‌عبارت‌دیگر برهمکنش نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول با HSA احتمالاً از نوع برهم‌کنش‌هیدروژنی و نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات احتمالاً از نوع هیدروفوب و الکتروستاتیک است.

مطالعه Navarro و همکاران (۳۲) در شرایط *in vivo* نشان داد نانوذرات نقره با پوشش اتیلن گلیکول در غلظت بالا سمیت بیشتری ایجاد می‌کنند و نانوذرات نقره با پوشش سیترات سمیت کمتری را در این شرایط از خود نشان می‌دهند. این نتایج کاملاً با نتایج *in vitro* به‌دست‌آمده در این مطالعه تطابق دارد؛ بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، نانوذرات نقره با ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول نسبت به نانوذرات نقره حاوی پایدارکننده سدیم سیترات و نانوذرات نقره بدون پوشش ویژه با HSA برهمکنش قوی‌تری دارند. این پژوهش می‌تواند اطلاعات مناسبی را برای درک مکانیسم دخیل در اتصال نانوذرات نقره با پوشش‌های مختلف با HSA در اختیار محققین و فعالان در حوزه دارورسانی بگذارد. همچنین تأثیر نوع پوشش انتخابی در هنگام سنتز نانوذرات نقره را در میزان انتقال و پخش نانوذرات نقره در سیستم خون نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

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

تشکر و قدردانی

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

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.15.7]

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

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

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

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.15.7]

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

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.15.7]

Original Article

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

Hekmat A*, Roshani Z

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

Received: 17 Dec 2019 Accepted: 31 Mar 2020

Abstract

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

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

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

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

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

***Corresponding Author: Hekmat Azadeh,** Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email: hekmat@ut.ac.ir
https://orcid.org/ 0000-0003-0123-1575

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.15.7]