مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری
دوره ۹، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲
صفحات ۱۱۰-۹۲

Online ISSN: ۲۴۷۶-۴۴۹۳
Print ISSN: ۲۵۳۸-۲۰۲۰
www.irijournals.com

بررسی بیوانفورماتیکی و تغییرات ساختاری تاو پس از برهم کنش با نانوذرات اکسید منگنز

مجتبی فلاحتی[۱]، طیبه اکبری توچ[۲]

[۱]هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران
[۲]کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی گرایش بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران

چکیده

علی‌رغم مزایای نانوفناوری و نقش مهم آن در پیشرفت علوم مختلف، نانوذرات می‌توانند دارای اثرات سوء نیز باشند. با توجه به گسترش روزافزون نانوفناوری در این پژوهش برهمکنش پروتئین تاو (که در نواحی مختلف مغز بیان شده و رسوب آن با بمیاری‌های تحلیل برنده‌ی عصبی به ویژه آلزایمر همراه است) با نانوذره اکسید منگنز مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور برهمکنش نانوذرات و پروتئین تاو توسط فلورسنت ThT، فلورسنت تیروزین، اسپکتروفتومتری UV-vis، طیف سنجی جذبی congo red و طیف سنجیCD و همچنین داکینگ مولکولی بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که حضور نانوذره اکسید منگنز، باعث افزایش سرعت تشکیل فیبریلاسیون و تولید فیبریل های آمیلوئیدی می‌شود. فلورسنت ThT نشان داد حضور نانوذره اکسید منگنز باعث تشکیل فیبریل آمیلوئید و افزایش ثابت سرعت فیبریلاسیون می‌شود. فلورسنت تیروزین نشان داد نانوذرات اکسید منگنز باعث تغییرات ساختاری پروتئین تاو و همچنین باعث تجمع پروتئین تاو به سمت فیبریل‌های آمیلوئیدی و افزایش قسمت‌های آبگریز می‌شوند. اسپکتروفتومتری UV-vis نشان دهنده افزایش تجمع تاو در حضور نانوذرات اکسید منگنز بود. طیف‌سنجی جذبی Congo Red نشان داد حضور نانوذرات اکسید منگنز باعث تشکیل فیبریل-های آمیلوئید در پروتئین تاو می‌گردد. طیف‌سنجی CD نیز نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات اکسید منگنز در پروتئین تاو، تشکیل آمیلوئید افزایش یافت. داکینگ مولکولی با استفاده از نرم‌افزار Autodock برهمکنش بین نانوذره و پروتئین را تایید کرد.

کلمات کلیدی: پروتئین تاو، نانوذره اکسید منگنز، طیف‌سنجی، داکینگ مولکولی

مقدمه

فناوری نانو یکی از شاخه های نوین و جذاب پژوهشی است که فرصت های قابل توجهی را برای تحولات جدید در شاخه های مختلف علوم عرضه می کند. در سال های اخیر طب مدرن تبدیل به یکی از شاخه های اصلی پژوهش های فناوری نانو شده و در آینده، علم پزشکی می‌تواند تا حد زیادی از این فناوری بهره مند شود (۱). نانوفناوری پزشکی حوزه‌ی کاربرد، رویکردها، نظریه‌ها، دستگاه‌ها و ادوات مقیاس نانو و نانوساختارهای ویژه به منظور شناخت، پیشگیری و یا درمان بیماری‌ها از طریق آشکارسازی، ترمیم و بازسازی بافت‌های زیستی آسیب دیده در سطوح مولکولی است (۲). علیرغم پیشرفت‌های جدی در علم و فناوری سنتی پزشکی در عرض یک صد سال گذشته، این حوزه با محدودیت‌های بسیاری در شناخت و درمان بنیادی بیماری‌ها و در ابزار شناسائی آنها روبرو بوده است. هدف فناوری نانو در پزشکی، ارائه امکانات آسیب شناسی و درمان آن‌ها در مقیاس‌های بنیادی، یعنی مولکولی و یا حتی ریزمولکولی است (۳).

تاو[1] پروتئینی است که بیشتر در آکسون نورون‌ها وجود دارد اما در الیگودندروسیت‌ها نیز وجود دارد. فرم هایپرفسفریله تاو به صورت نامحلول است که در این حالت تمایل آن برای اتصال به میکروتوبول‌ها کم شده و بطور خود به‌خودی ساختارهای دورشته‌ای به هم پیچیده‌ای را تشکیل می‌دهند. آنزیم‌های مسئول اضافه کردن یا جدا کردن گروه‌های فسفات، تنظیم کننده تشکیل کلاف‌ها می‌باشند. رشته‌های درهم پیچیده نوروفیبریلاری که به صورت کلاف درهم بیرون سلول‌های عصبی تجمع می‌کنند از مشخصات بیماری آلزایمر و دیگر بیماری‌های درگیر کننده سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد. این نوع بیماری‌ها به تاوپاتی معروف هستند. تعداد رشته‌های نوروفیبریلاری از عوامل تعیین کننده شدت بیماری می‌باشد. اجزای اصلی تشکیل دهنده این کلاف‌های در هم پیچیده فرم هایپرفسفریله و تجمع یافته پروتئین تاو می‌باشد. همانند الیگومرهای آمیلوئید بتا، تجمعات حدواسط پروتئین غیرطبیعی تاو نیز اثر مخرب روی سلول‌ها دارند و سبب اختلال در سیستم شناختی می‌شوند. رشته‌های به هم پیچیده نامحلول ممکن است فاقد اثر سوء باشند اما کاهش انتقال سیناپسی و کاهش تعداد نورون‌ها در نتیجه تخریب میکروتوبول‌ها از اثرات سوء تشکیل کلاف‌های نوروفیبریلاری می‌باشد. در بیماری پارکینسون بیش از ۳۰ موتاسیون در ژن تاو روی کروموزوم ۱۷ شناخته شده است. برخلاف این، موتاسیون در پروتئین تاو در بیماری آلزایمر وجود ندارد و تشکیل کلاف‌های نوروفیبریلاری در نتیجه موتاسیون در پروتئین تاو نیست. با وجود این، افزایش میزان فسفریلاسیون و افزایش مقدار تاو در مایع مغزی-نخاعی با کاهش میزان نمره در تست‌های شناختی رابطه مستقیم دارد. افزایش میزان تاو فسفریله در مایع مغزی-نخاعی می‌تواند به عنوان یک بیومارکر مناسب در پیشگویی و تشخیص مراحل ابتدایی آلزایمر در بیماران با نقص سیستم شناختی به کار برود. شواهد آزمایشگاهی نشان می‌دهد که تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی مقدم‌تر است و تشکیل پلاک سبب تحریک تشکیل کلاف‌های نوروفیبریلاری می‌شود. به هرحال شواهد نشان می‌دهد که تخریب سلول‌ها در محیط کشت و نقص حافظه در حیوانات آزمایشگاهی مبتلا به بیماری شبیه آلزایمر به واسطه آمیلوئید بتا نیازمند وجود تاو می‌باشد. افزایش استرس‌های اکسیداتیو، نقص در تاخوردگی پروتئین‌ها در شبکه آندوپلاسمی و همچنین نقص در پاکسازی پروتئین‌های آسیب دیده، مخصوصاً پروتئین‌های آسیب دیده در رابطه با افزایش سن، سبب تسریع در تجمع آمیلوئید و پروتئین تاو در بیماری آلزایمر می‌شود (۱۳).

متغیرهای مورد بررسی

۱. بررسی تجمع پروتئین که توسط توسط طیف سنجی UV-visible بررسی خواهد شد. متغیر میزان جذب بصورت کمی و پیوسته و وابسته خواهد بود.

۲. بررسی برهم کنش که توسط توسط داکینگ مولکولی بررسی خواهد شد. مقدار انرژی پیوند و نوع اسیدهای آمینه درگیر در پیوند نانوذره –پروتئین مشخص خواهد شد.

[1] Tau

پیشینه پژوهش‌های مرتبط

حاج‌سلیمی و همکاران در سال ۲۰۱۸، طی یک مطالعه آزمایشگاهی تعامل نانوذرات آهن با سیستم عصبی را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، تعامل نانوذرات آهن (Fe-NPs) با پروتئین تاو و سلول PC12، به عنوان مدل‌های سیستم عصبی بالقوه، با طیف وسیعی از تکنیک‌ها از جمله پراکندگی نور پویا، طیف سنجی فلورسنت ذاتی، طیف سنجی رنگ‌تابی دورانی، آزمون دی‌فنیل تترازولیوم بروماید و روش رنگ‌آمیزی دوگانه AO/EB[۲] مورد بررسی قرار گرفت. همبستگی معکوس بین ثابت استرن و ولمر (KSV[۳]) و درجه حرارت نشان داد که مکانیسم فرونشست ایستا بین پروتئین تاو و Fe-NP وجود دارد. تعداد سایت اتصال (n = ۰/۸۶) نشان داد که تقریباً یک سایت اتصال Fe-NP در هر پروتئین وجود دارد. همچنین، Fe-NP ها ساختار مارپیچ تصادفی پروتئین تاو را تثبیت کردند. علاوه بر این، Fe-NPs زنده ماندن سلول‌های PC12 با قطعه قطعه شدن DNA به روش آپوپتوز را کاهش داد (۸۵).

رحمانی و همکاران در سال ۲۰۱۸، برهمکنش نانوذرات نقره با پروتئین تاو و رده سلولی نوروبلاستوما به عنوان مدل‌های سیستم عصبی را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، فعل و انفعال نانوذرات نقره (AgNPs) با پروتئین تاو و رده سلول-های نوروبلاستوما SH-SY5Y، به عنوان مدل‌های بالقوه سیستم عصبی، با طیف وسیعی از تکنیک‌ها از جمله طیف سنجی فلورسنت ذاتی، طیف سنجیCD، روش (۴،۵-دی متیل تیازول-۲-یل) -۲،۵-دی فنیل تترازولیم برومید (MTT) و روش رنگ آمیزی دوتایی آکریدین اورانج / اتیدیم بروماید (AO / EB) مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه فلورسنت نشان داد که AgNPs با قطر حدود ۱۰-۲۰ نانومتر به طور خود به خود از طریق پیوندهای هیدروژنی و فعل و انفعالات وان در والس یک مجموعه ایستا با پروتئین تاو تشکیل می‌دهند. آزمایش CD نشان داد که AgNP ها ساختار مارپیچ پروتئین تاو را تغییر نمی‌دهند. علاوه بر این، نشان داده شد که AgNPs مرگ و میر سلول نوروبلاستوما SH-SY5Y را از طریق قطعه قطعه شدن DNA که یک ویژگی اصلی آپوپتوز است، القا می‌کند (۸۶).

کرمانی و همکاران در سال ۲۰۱۸، تغییرات ساختاری پروتئین تاو و سمیت سلولی سلول‌های نوروبلاستوما در حضور نانوذرات اکسید آلومینیوم (Al_2O_3 NPs) را مورد بررسی قرار دادند. بدین صورت که ابتدا نانوذرات اکسید آلومینیوم (Al_2O_3 NPs) سنتز شده و سپس با بررسی‌های بالقوه XRD، TEM، DLS و Zeta مشخصه‌یابی شدند. پس از آن، تعامل Al_2O_3 NPs با پروتئین تاو با استفاده از روش‌های فلورسنت و طیف سنجی CD بررسی شد. داکینگ مولکولی و دینامیک مولکولی نیز برای کشف محل اتصال و تغییرات کنفورماسیونی تاو پس از تعامل با خوشه Al_2O_3 اجرا شد. علاوه بر این، MTT، LDH، کاسپاز -۹ / -۳ و روش فلوسایتومتری برای کشف سمیت سلولی ناشی از Al_2O_3 NPs در برابر سلولهای SH-SY5Y انجام شد. مشخص شد که نانوذرات Al_2O_3 به پروتئین تاو متصل می‌شوند و یک مجموعه ایستا را تشکیل می‌دهند و ساختار تاو را به سمت یک ساختار بسته بندی شده‌تر جمع می کنند. تحقیقات داکینگ مولکولی و دینامیک مولکولی نشان داد که نانوذرات داخلی به زائده‌های آبگریزی بخش‌های تاو متصل می‌شوند و برخی از فولدینگ ساختاری حاشیه‌ای بخش تاو را ترویج می‌کنند. سنجش سلولی نشان داد که نانوذرات Al_2O_3 می‌توانند از طریق نشت غشایی، فعال سازی کاسپاز -۹ / -۳ و القاء آپوپتوز و نکروز، منجر به مرگ و میر سلول شوند (۸۷).

روشنفکر و همکاران در سال ۲۰۱۹، تاثیر نانوذرات سیلیس در ایجاد تغییرات در پروتئین تاو و استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در رده سلولی نوروبلاستوما را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه اثرات جانبی نانوذرات SiO2 بر ساختار پروتئین تاو با استفاده از چندین روش از جمله CD، فلورسنت ANS، UV-vis (۳۶۰ نانومتر)، جذب رنگ قرمز کنگو، TEM و دینامیک مولکولی بررسی شد. همچنین، اثرات سمیت سلولی نانوذرات SiO2 در برابر رده سلولی SH-SY5Y با استفاده از MTT، ROS و آزمایشات آپوپتوز بررسی شد. بررسی‌های دینامیک مولکولی و طیفی نشان داد که ساختار فولد نشده تاو در حضور SiO2 NP ها آشکارا منجر به یک ساختار جمع شده تا حدی تا خورده و آمورف می‌شود. روش سلولی نشان داد که SiO2 NP ها از طریق تجمع ROS و القای آپوپتوز بر روی سلول‌های SH-SY5Y اثر سمیت سلولی دارند (۹۰)

[2] acridine orange/ethidium bromide
[3] Stern and Volmer

مهدی زاده و همکاران در سال ۲۰۱۹ در طی یک مطالعه بیوفیزیکی، دینامیک مولکولی، سلولی و مولکولی، فولدینگ تاو و سمیت سلول‌های نوروبلاستوما در حضور نانوذرات اکسید منگنز را مورد بررسی قرار دادند. بدین صورت که آن‌ها در این مطالعه، سمیت نانوذرات MN_2O_3 در برابر پروتئین تاو و سلول‌های نوروبلاستوما (SH-SY5Y) در شرایط آزمایشگاهی را بررسی کردند. طیف سنجی رنگ‌تابی دورانی (CD^4)، طیف سنجی فلورسنت، اتصال مولکولی و مطالعات دینامیک مولکولی برای بررسی تغییرات ساختاری پروتئین استفاده شد. آزمایش‌های مبتنی بر سلول، مانند زنده ماندن، فعال سازی کاسپاز -۳ / -۹، آپوپتوز و بیان ژن (Bax و Bcl-2) در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. روش‌های طیفی و مطالعات دینامیکی مولکولی نشان داد که نانوذرات MN_2O_3ها می‌توانند ساختار تاو را به سمت یک ساختار بیشتر بسته بندی شده جمع کنند. همچنین نانوذرات Mn_2O_3 زنده ماندن سلول را به روشی وابسته به دوز کاهش دادند. در واقع، فعال سازی کاسپاز -۳ و کاسپاز-۹، ارتفاع نسبت Bax / Bcl-2 و القای آپوپتوز پس از قرار گرفتن SH-SY5Y در معرض نانوذرات Mn_2O_3 مشاهده شد (۹۱).

حاجی‌محمدجعفری و همکاران در سال ۲۰۱۹، در طی یک مطالعه بیوترمودینامیک و مولکولی، اثرات نانوذرات اکسید نیکل بر پروتئین تاو و سلول‌های شبه نورون را مورد بررسی قرار دادند. بدین صورت که پارامترهای ترمودینامیکی تاو بر اثر تعامل با NiO NP توسط طیف سنجی فلورسنت تعیین شد. همچنین، مطالعات داکینگ مولکولی برای کشف میل‌های اتصال خوشه-های NiO NPs با اندازه‌های مختلف ۳۰Å و ۵۰ Å نسبت به تاو اجرا شد. همچنین، فعالیت سمیت سلولی NiP NPs در برابر رده سلولی SH-SY5Y با MTT، LDH، فعالیت کاسپاز-۳/۹ و بیان ژن‌های آپوپتوز Bax و Bcl-2 تعیین شد. مطالعه DLS نشان داد که محلول NiO از پایداری کلوئیدی خوبی برخوردار است. مطالعه فلورسنت نشان داد که مقادیر KSV به ترتیب $۲/۹۵±۰/۳۵\times۱۰^۴$، $۳/۳۱±۰/۵۹\times۱۰^۴$ و $۳/۹۲±۰/۶۵\times۱۰^۴$ در K۲۹۸، K ۳۱۰ و K۳۱۵ بود. همچنین مقادیر ΔG° (کیلوژول بر مول)، ΔH° (کیلوژول بر مول) و $T\Delta S^\circ$ (کیلوژول بر مول) در ۲۹۸ درجه کلوین به ترتیب ۱۳/۲۷±۱/۱۵۷، ۱/۹۸±۰/۱۴ و ۱۵/۲۵±۲/۰۱ بود. مطالعات نظری نشان می‌دهد که افینتی بخش 5O3T به NiO NP (30Å) بالاتر از NiO NP (50 Å) است. علاوه بر این، NiO NPs افزایش قابل توجهی در مرگ و میر سلول‌های SH-SY5Y به روشی آپوپتوتیک نشان داد (۹۲).

حسینعلی و همکاران در سال ۲۰۱۹، برهمکنش پروتئین تاو با نانوذرات اکسید نیکل را توسط مطالعات بیوفیزیکی، دینامیک مولکولی و مطالعات سلولی مورد بررسی قرار دادند. بدین صورت که، اثرات منفی نانوذرات NiO بر ساختار تاو با استفاده از روش‌های فلورسنت و طیف سنجی CD و همچنین مطالعه TEM مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، مطالعه دینامیک مولکولی برای گسترش داده‌های تجربی انجام شد. فعالیت سیتوتوکسیک NiO NPs در برابر رده سلولی SH-SY5Y با استفاده از دفع رنگ تریپان بلو، مورفولوژی سلول، ROS و سنجش‌های آپوپتوز مشخص شد. ANS، آزمون نیل قرمز، ThT و بررسی میکروگراف الکترونی نشان داد که NiPNP ها می‌توانند قسمت‌های آبگریزی تاو را افزایش داده و باعث ایجاد تجمعات تاو آمورف شوند. روش طیف سنجی CD دور و نزدیک نشان داد که NiO NP می‌تواند به ترتیب ساختار ثانویه و سوم تاو را تغییر دهد. مطالعات نظری نشان می‌دهد که NiO NP منجر به جمع شدن ساختار تاو می‌گردد. از نظر سلولی، NiO NP باعث اثرات مرگ و میر و مورفولوژیکی قابل توجهی در برابر سلول‌های SH-SY5Y می‌شود. همچنین نانوذرات NiO تأثیر قابل توجهی در تولید ROS داخل سلولی و القاء آپوپتوز دارند (۹۳).

فردانش و همکاران در سال ۲۰۱۹، با استفاده از مطالعات بیوفیزیکی، محاسباتی و سلولی، تجمع آمورف تاو در حضور نانوذرات دی اکسید تیتانیوم را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه برای آشکار کردن اینکه چگونه تغییرات ساختاری پروتئین تاو می‌تواند سمیت سلولی NP های دی اکسید تیتانیوم (TiO2) را در برابر سلول‌های عصبی (SH-SY5Y) تغییر دهد، از چندین تکنیک بیوفیزیک (طیف سنجی فلورسنت خارجی و ذاتی، طیف سنجی رنگ‌تابی دورانی (CD)، طیف سنجی اشعه ماورا بنفش (UV))، تحقیقات میکروسکوپ الکترونی عبوری (۹۴)، مطالعات اتصال مولکولی و دینامیک مولکولی و سنجش های سلولی MTT استفاده شد. نشان داده شد که نانوذرات TiO2 منجر به فعل و انفعالات آب‌دوست، تغییرات ساختاری

[4] Circular dichroism

ثانویه و سوم و تشکیل توده‌های تاو آمورف می‌شود. تغییرات ساختاری تاو سمیت سلولی ناشی از TiO2 NP ها را افزایش می‌دهد. این داده‌ها نشان داد که پروتئین جاذب دناتوره شده روی سطح نانوذرات ممکن است سمیت سلولی NP را تقویت کند (۹۴).

مواد مورد استفاده

لیست موادی که در آزمایش حاضر مورد استفاده قرار گرفتند، در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱- مواد مورد استفاده در تحقیق

مواد	شرکت سازنده / کشور
پروتئین تاو	سیگما / آمریکا
رنگ ThT	سیگما / آمریکا
Congo red	سیگما / آمریکا
نانوذره اکسید منگنز	US nano / آمریکا

دستگاه‌های مورد استفاده

نام دستگاه‌هایی که در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفتند، در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- دستگاه‌های مورد استفاده در تحقیق

دستگاه‌ها	شرکت سازنده / کشور
میکروسکوپ الکترونی عبوری	Zeiss- EM10C, 80 KV / آلمان
طیف سنج UV-vis	MPF-4model (Hitachi) / ژاپن
طیف سنج دورنگ‌نمایی دورانی	Model 215, Aviv, Lakewood, NJ / آمریکا
طیف سنج فلورسنت	Cary Eclipse VARIAN / استرالیا
pHمتر	متراهم / سوییس
دستگاه آب مقطرگیری	بارنستد / آمریکا
ورتکس	هایدولف / آلمان
ترازوی دیجیتال	سارتوریس / آلمان

آماده‌سازی نانوذرات

نانوذرات اکسید منگنز مورد استفاده در این تحقیق از شرکت یواس نانو خریداری شد. نانوذرات اکسید منگنز در بافر فسفات قابل حل می‌باشند. بنابراین پس از خریداری در بافر فسفات حل شده و تا زمان استفاده در دمای اتاق نگهداری شدند. برای تهیه بافر فسفات ۸/۵ گرم نمک سدیم کلرید، ۱/۲۴ گرم نمک پتاسیم کلرید، ۱/۱۵ نمک سدیم دی‌هیدروژن فسفات و ۰/۲۴ گرم نمک پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات با ترازوی دقیق وزن شد. سپس در آب دو بار تقطیر حل شده و به حجم یک لیتر رسید. pH این بافر ۷/۵ می‌باشد که به شرایط فیزیولوژیک بدن بسیار نزدیک بوده و به این ترتیب نتایج کار با نمونه‌ی واقعی قابل مقایسه می‌گردد.

بررسی ساختاری نانوذرات اکسید منگنز به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM (FESEM)

شکل ظاهری و اندازه‌ی نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مورد ارزیابی قرار گرفت. میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی FESEM نوعی میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM است که دارای تفنگ الکترونی انتشار میدانی می باشد. تفنگ الکترونی نشر میدانی Field Emission به انرژی حرارتی برای غلبه بر پتانسیل سطحی نیازی ندارد و با اعمال میدان الکتریکی بسیار بالا به سطح نمونه، الکترون ها را از سطح جدا می کند. میکروسکوپ الکترونی روبشی انتشار میدانی FESEM تصاویری واضح تر با رزولوشن بالاتر را فراهم می کند. میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی Field

Emission نسبت به میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM رزولوشن بهتری را در ولتاژهای پایین تر ارائه می دهد. میکروسکوپ الکترونی FESEM برای تصویربرداری نانوذرات مناسب می باشد (شکل ۱) (۹۵).

شکل ۱- میکروسکوپ الکترونی FESEM

در تحقیق حاضر برای ثبت تصویر نانوذره اکسید منگنز توسط میکروسکوپ FESEM، ابتدا نمونهٔ مورد نظر (نانو ذره اکسید منگنز) در حلال اتانول و در دمای اتاق، به وسیلهٔ سونیکاتور به مدت ۳۰ دقیقه سونیکه شد تا سوسپانسیون نانوذره تهیه شود. دستگاه میکروسکوپ FESEM، روی ۱۰۰ کیلوولت تنظیم و سوسپانسیون تهیه شد، سپس اندازه و شکل نانوذره به وسیله‌ی میکروسکوپ بررسی و عکس‌برداری انجام شد.

تهیه محلول پروتئین و نانوذره در شرایط آمیلوئیدژنیک

برای بررسی برهمکنش پروتئین تاو با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید منگنز، ابتدا پروتئین به مدت ۴۵ ساعت در محیط آمیلوئیدژنیک با pH=۲ و غلظت ۱۰۰ میکرومولار در غیاب نانوذره و در حضور نانوذره با غلظت‌های µg/ml ۱، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ انکوبه شد. آنالیزهای بعدی مطابق روش‌های که در ادامه ذکر شده است، انجام گرفت.

بررسی برهمکنش پروتئین تاو و نانوذرات اکسید منگنز به وسیله طیف‌سنجی فلورسنت برای بررسی ساختار دوم پروتئین

از تکنیک خاموشی فلورسنت[5] جهت بررسی برهمکنش بین پروتئین تاو و نانوذرات اکسید منگنز استفاده شد. این روش یک تکنیک مهم برای اندازه‌گیری میل پیوندی بین لیگاند و پروتئین است. خاموشی فلورسنت عبارت از کاهش بازده کوانتومی فلورسنت حاصل از یک فلوئوفور است که ناشی از انواع برهمکنش‌های مولکولی با مولکول‌های خاموش‌کننده می‌باشد. خاموشی فلورسنت می‌تواند با مکانیسم‌های مختلفی اتفاق بیفتد که رایج‌ترین آن‌ها عبارتند از:

۱. خاموشی دینامیکی یا خاموشی ناشی از برخورد که در آن برخورد تصادفی غیرتکرار پذیر یک مولکول کوچک می‌تواند منجر به فعال شدن حالت برانگیخته فلوئوفور شود.

۲. خاموشی استاتیک که در آن یک مولکول کوچک منجر به ایجاد یک کمپلکس حالت پایه با فلوئوفور می‌شود و در نتیجه به شکل غیر فلورسنت در می‌آید.

[5] Flurescence quenchy

دامنه خاموشی دینامیک وابسته به دسترس پذیری فلوئوفور برای خاموش کننده است. در نتیجه داده‌های خاموشی می‌توانند ایده‌ای را در مورد دسترس‌پذیری حلال فلوئوفور ارائه کنند و گزارشی را از تغییرات سوم و چهارم ساختار درشت مولکول به دست بدهند (۷۷).

پروتئین‌ها به واسطه‌ی اسیدهای آمینه‌ی تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین دارای فلورسنت ذاتی هستند. خاصیت فلورسنت هر یک از این اسیدهای آمینه در یک طول موج بخصوص ظاهر می‌گردد (۹۶). با این حال ماکرومولکول ها همیشه فلوئوفور طبیعی یا موردنظر را برای مطالعه ندارند و در نتیجه گاهی یک ماده فلورسنت به جایگاهی از ماکرومولکول پیوند می‌خورد و یا توسط یک فرایند شیمیایی ایجاد می‌شود، که افزودن ماده فلورسنت به ماکرومولکول برای مطالعه آرایش فضایی، فلورسنت محیطی یا اکتسابی نام دارد (۹۷). پروتئین تاو فاقد تریپتوفان است و به همین دلیل در تحقیق حاضر از فلورسنت تیروزین استفاده شد.

فلورسنت تیوفلاوین (ThT[6]) برای بررسی تجمع پروتئین

تیوفلاوین برای اولین بار در رنگ‌آمیزی فیبریل‌های آمیلوئیدی در نمونه‌های بافت‌شناسی مورد استفاده قرار گرفته و رنگی برای تشخیص تجمع آمیلوئید است. در این تحقیق تشکیل فیبریل با استفاده از فلورسنت ThT توسط یک طیف‌سنج فلورسنت Cary Eclipse VARIAN تعیین شد. ۲ میکرومولار پروتئین تاو برداشته و با محلول ۱۵ میکرومولار ThT مخلوط شد. طول موج‌های تحریک و نشر به ترتیب در ۴۴۰ و ۴۸۵ نانومتر در حضور و غیاب نانوذره و در شرایط آمیلوئیدژنیک ثبت شدند.

فلورسنت تیروزین برای بررسی تغییرات ساختار سوم

جهت انجام آزمایش، از غلظت محلول پروتئینی ۲ میکرومولار و غلظت‌های مختلف نانوذرات (۱ μg/ml، ۱۰، ۲۰ و ۵۰) استفاده شد. آزمایش‌های انجام شده جهت اندازه‌گیری شدت فلورسنت، در غیاب و حضور نانوذرات انجام شد. این مطالعه به منظور تاثیر لیگاندهای مختلف بر ساختار پروتئین تاو با اندازه‌گیری شدت فلورسنت مورد مطالعه قرار گرفت. طول موج برانگیختگی برابر با ۲۷۰ نانومتر و طول موج نشر بین ۲۸۵ تا ۴۵۰ نانومتر تنظیم شد. پروتئین تاو، فاقد اسیدآمینه‌ی تریپتوفان می‌باشد، بنابراین میزان جذب، در طول موج مربوط به اسید آمینه تیروزین یعنی ۲۷۰ نانومتر اتفاق می‌افتد و نشر نیز در ۳۰۲ نانومتر اتفاق می‌افتد.

اسپکتروفتومتری UV-vis برای بررسی تجمع فیبریل‌ها در طول موج ۳۶۰ نانومتر

در آزمایشگاه‌ها، بخش گسترده‌ای از اندازه گیری‌ها بر اساس واکنش‌های جذب سنجی صورت می‌پذیرد. فعالیت طیف وسیعی از آنالیت‌ها با کاربردهای بالینی و تحقیقاتی، طیف وسیعی از داروها و بخش گسترده‌ای از متابولیت‌ها با اسپکتروفتومتری قابل سنجش است. در دستگاه طیف‌سنج نوری یا اسپکتروفتومتری مریی، جذب یا انتقال ماده می‌تواند به وسیله رنگ مشاهده شده تعیین شود. برای نمونه محلولی که نور را در بالاتر از طیف مریی است و هیچ طول موج مریی را عبور نمی‌دهد به‌طور تئوری به رنگ سیاه است. از سویی دیگر اگر همه طول مرئی را عبور دهد و هیچ نوری را جذب نمی‌کند نمونه محلول به رنگ سفید است. اسپکتروفتومترهای مرئی در عمل از منشوری برای خرد کردن طیف معینی از طول موج استفاده می‌کنند (فیلتر امواج نوری دیگر) به همین دلیل شعاع ویژه‌ای از نور از طریق نمونه محلول عبور می‌کند. به منظور بررسی تجمع پروتئین تاو، جذب محلول ۳ میکرومولار پروتئین در غیاب و حضور غلظت‌های ۱ μg/ml، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ نانوذرات اکسید در شرایط آمیلوئیدژنیک روی در طول موج ۳۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-vis اندازه‌گیری شد. در طول موج ۳۶۰ نانومتر تجمع پروتئین از طریق اندازه‌گیری جذب کدر شدن محلول بررسی می‌گردد.

طیف‌سنجی Congo Red

کنگو رد یک ترکیب ارگانیک و نمک سدیم بنزیدین‌دی‌آزو-بیس-۱-نفتیل‌آمین-۴-سولفونیک اسید است. کنگو رد یک رنگ آزو بشمار می‌رود و محلول در آب است و می‌تواند یک محلول کلوئیدی قرمز رنگ را به دست بدهد. با این حال استفاده از

[6] Thioflavin

کنگورد مدت‌ها پیش به‌واسطه ویژگی‌های سرطان‌زایی آن، کنار گذاشته شده است. در هیستولوژی و بررسی‌های میکروسکوپی، کنگو رد برای رنگ‌آمیزی آمیلوئیدوز، دیواره‌های سلولی گیاهان و قارچ‌ها و غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی استفاده می‌شود (۹۸).

همانطور که بیان شد کنگو رد رنگی برای تشخیص حضور آمیلوئید در بخش‌های بافت می‌باشد. پروتئین تاو به مدت ۴۵ ساعت با غلظت‌های µg/ml ۱، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ نانوذره اکسید منگنز در شرایط آمیلوئیدژنیک انکوبه شد. سپس ۵ میکرومولار از استوک ۱۰۰ میکرومولار پروتئین تاو برداشته شد و با مقدار مشخصی از رنگ کنگو رد مخلوط شد. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای محیط و در تاریکی، طیف‌های جذب در محدوده ۴۵۰ تا ۶۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible خوانده شدند.

طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی دور[۷] برای بررسی ساختار دوم

دو رنگ نمایی دورانی روشی است که بر اساس تفاوت در میزان جذب نور قطبیده راست‌گرد و نور قطبیده چپ‌گرد توسط مولکول فعال از لحاظ نوری، استوار است. CD مانند فلورسنت دارای منبع نور، کروموفور، کووت و آشکارساز بوده و از آن برای بررسی ساختارهای دوم پروتئین (آلفا هلیکس و بتا شیت) استفاده می‌گردد. طیف سنجی CD بر اساس اختلاف نور پلاریزه چپ‌گرد و راست‌گرد می‌باشد و این طیف‌سنجی از دو قسمت تشکیل شده است: طیف‌سنجی دو رنگ نمایی دور که برای تعیین ساختار دوم پروتئین استفاده می‌شود و طیف‌سنجی دو رنگ نمایی نزدیک که برای تعیین ساختار سوم استفاده می‌گردد. طیف‌ها در ناحیه‌ی فرابنفش (۲۶۰-۱۹۰ نانومتر) که منطبق بر جذب پیوندهای پپتیدی است توسط درجه‌ی بیضی‌واری بررسی می‌شوند.

هدف از این آنالیز دسترسی به میزان ساختارهای دوم پروتئین تاو بود. طیف CD در طول موج‌های ۱۹۰ تا ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروپلاریمتر مشخص شد و تغییرات ساختار دوم تاو با غلظت ۵ میکرومولار بر اساس تغییر درجه بیضی‌واری مطابق رابطه‌ی زیر به دست آمد.

$$(\theta) = (100 \times (MRW) \times \theta_{obs} / cl)$$

θ_{obs}: درجهٔ بیضی‌واری مشاهده شده در طول موج مورد نظر،

C: غلظت پروتئین بر حسب mg/ml،

L: طول مسیر نور در سل،

MRW: میانگین وزن یک دنبالهٔ اسید آمینه در پروتئین.

روش داکینگ مولکولی برای بررسی اسیدهای آمینه

مطالعه داکینگ مولکولی به عنوان یکی از مهم‌ترین ابزارهای محاسباتی در تحقیقات بیولوژیکی به منظور بررسی تعامل گیرنده-لیگاند و طراحی داروهای بالقوه در نظر گرفته شده‌است. به منظور بررسی برهمکنش میان نانوذرات اکسید منگنز با پروتئین تاو، داکینگ مولکولی انجام شد. به این منظور ابتدا ساختار نانوذرات اکسید منگنز با استفاده از نرم‌افزار ChemDraw 19.0 رسم شد. بهینه‌سازی این ساختار با نرم‌افزار Gaussian 16 انجام گرفت. سپس ساختار کریستالی و سه بعدی پروتئین تاو از پایگاه داده Protein Data Bank (RCSB PDB)[۸] دریافت شد. به منظور انجام مطالعه داکینگ‌مولکولی، قطعات ساختاری سه‌بعدی کریستالوگرافی پرتوی ایکس از پروتئین تاو (با شناسه 2MZ7، 4E0N، 5O3T) از بانک داده پروتئین آنلاین بارگیری شده است. سپس این ساختارها با نرم‌افزار Discovery Studio 4.5 ادیت شد به نحوی که مولکول‌های آب و لیگاندها حذف و هیدروژن‌های قطبی اضافه شدند. داکینگ مولکولی با استفاده از نرم‌افزار AutoDock Vina 1.1.2 انجام شد. در نهایت ساختار سه بعدی حاصل از داکینگ، با استفاده از PYMOL رسم گردید و مقدار انرژی پیوند و همچنین نوع برهم کنش بین نانوذره و پروتئین مشخص شد.

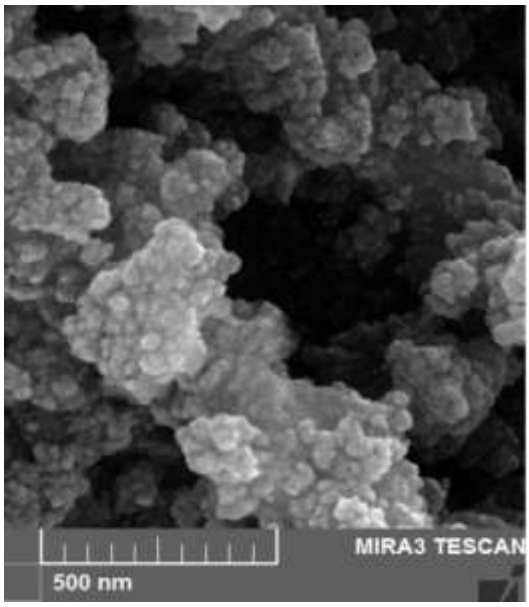
[7] Far- UV CD

[8] http://www.pdb.org

تحلیل نتایج پژوهش

نتایج بررسی ساختار نانوذرات اکسید منگنز

نتایج حاصل از بررسی نانوذرات اکسید منگنز با استفاده از میکروسکوپ الکترونی FESEM در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، قطر تقریبی نانوذرات بین ۵۰-۳۰ نانومتر بوده و میزان یکنواختی نانوذرات، هموژن و یک‌دست بودن آن‌ها را نشان می‌دهد.

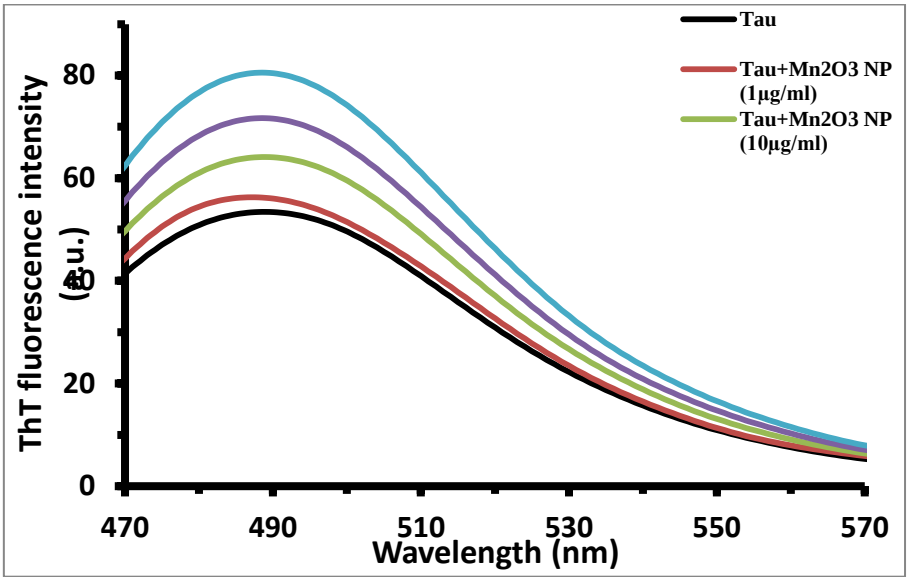


شکل ۲- تصویر میکروسکوپی نانوذرات اکسید منگنز با استفاده از میکروسکوپ FESEM

نتایج خاموشی فلورسنت

فلورسنت ThT برای بررسی تجمع پروتئین

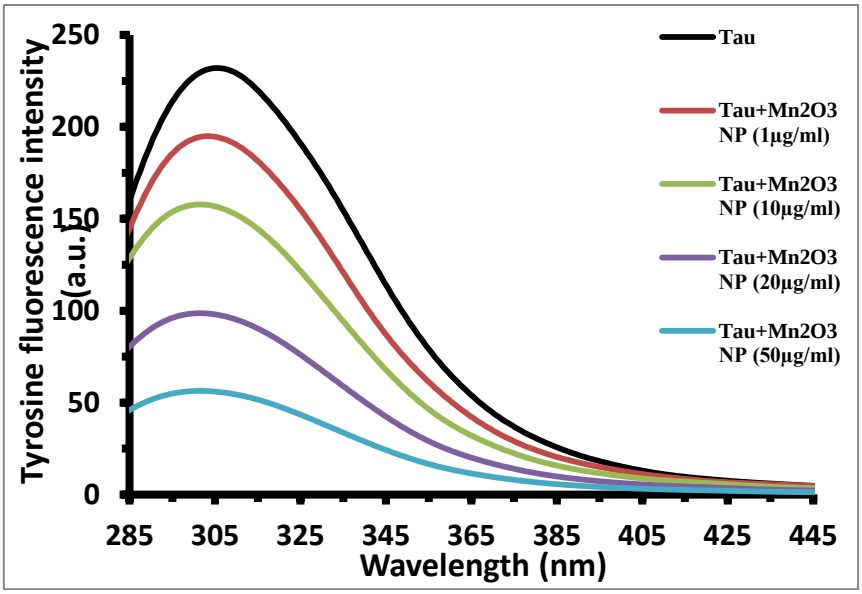
فلورسنت ThT برای بررسی تشکیل فیبریل تاو در حضور و عدم حضور نانوذرات اکسید منگنز مورد بررسی قرار گرفت. همان-طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، شدت فلورسنت در حضور نانوذرات اکسید منگنز افزایش یافته و این افزایش وابسته به دوز بوده است. در واقع هرچه غلظت نانوذرات بیشتر شده، شدت فلورسنت ThT نیز بیشتر شده است. نتایج حاصل از بررسی فلورسنت ThT نشان می‌دهد که نانوذرات اکسید منگنز موجب همچنین افزایش تشکیل فیبریل تاو می‌گردند.



نمودار ۱- تاثیرات نانوذرات اکسید منگنز بر تغییرات فیبریلاسیون تاو در حضور و عدم حضور نانوذرات اکسید منگنز بعد از ۴۵ ساعت با فلورسنت ThT در محیط آمیلوئیدژنیک

فلورسنت تیروزین برای بررسی تغییرات ساختار سوم

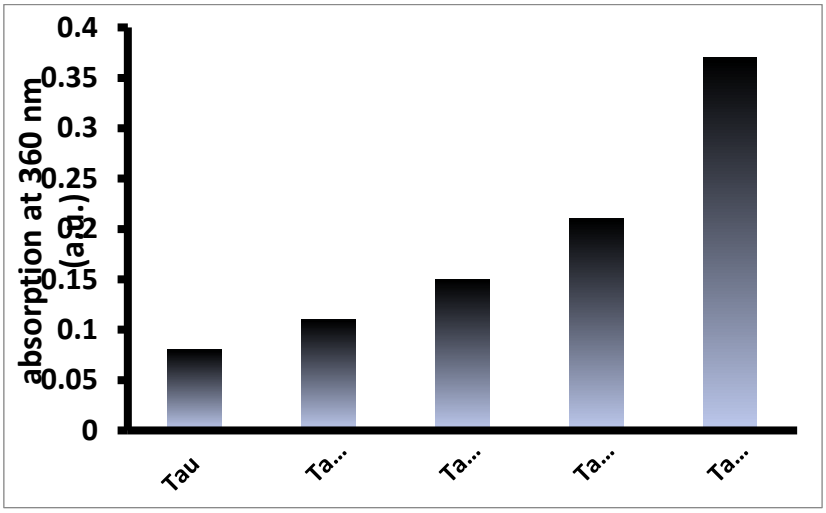
بررسی فلورسنت تیروزین در یک محیط آمیلوئیدژنیک انجام شد. اندازه‌گیری شدت فلورسنت تیروزین به منظور اندازه‌گیری تاثیر لیگاندهای مختلف (نانوذرات اکسید منگنز) بر ساختار پروتئین تاو صورت گرفت. چنان که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود بیشترین شدت فلورسنت تیروزین در طول موج ۳۰۲ نانومتر است که در حضور پروتئین تاو بیشترین مقدار و در حضور پروتئین تاو همراه با نانوذرات اکسید منگنز کمترین مقدار را دارد. با افزایش غلظت نانوذرات، شدت فلورسنت کاهش پیدا کرده است. در واقع نانوذرات اکسید منگنز موجب تغییر ساختاری تاو و همچنین تجمع آن به سمت فیبریل‌های آمیلوئیدی و افزایش قسمت‌های آب‌گریز می‌شوند.



نمودار ۲- تاثیرات نانوذرات اکسید منگنز بر تغییرات کنفورماسیونی پروتئین تاو در حضور و عدم حضور نانوذرات اکسید منگنز بعد از ۴۵ ساعت انکوباسیون در محیط آمیلوئیدژنیک با فلورسنت تیروزین

نتایج اسپکتروفتومتری UV-vis برای بررسی تجمع فیبریل‌ها در طول موج ۳۶۰ نانومتر

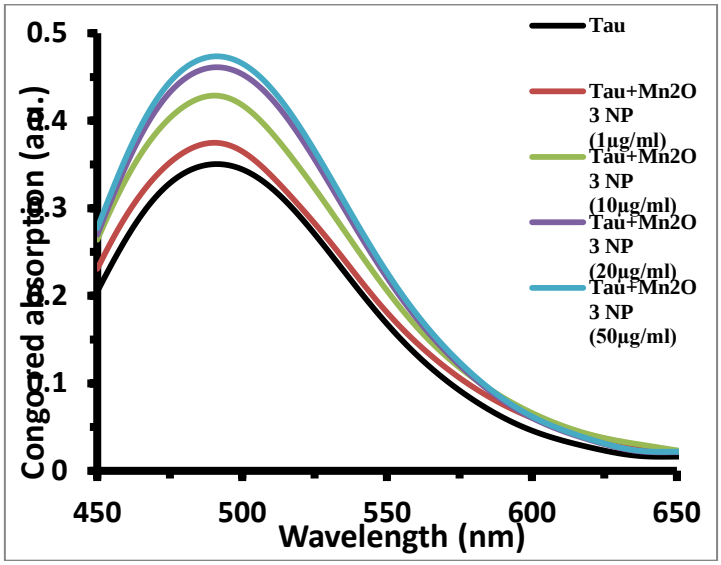
انتظار می‌رفت که حضور نانوذرات اکسید منگنز موجب تغییر کانفورماسیونی پروتئین تاو شود. در این صورت شرایطی که ساختار پروتئین را بی ثبات می‌کند سبب القای تجمع تاو می‌شوند. برای ارزیابی این فرضیه پروتئین تاو با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید منگنز به مدت ۲ دقیقه انکوبه شد. سپس تجمع تاو در حضور نانوذرات اکسید منگنز با اسپکتروفتومتری UV-vis در طور موج ۳۶۰ نانومتر بررسی شد چرا که در طول موج ۳۶۰ نانومتر تجمع پروتئین از طریق اندازه‌گیری جذب کدر شدن محلول بررسی می‌گردد. همان‌طور که در نمودار ۳- نشان داده شده است، افزایش غلظت نانوذرات اکسید منگنز، پروتئین تاو منومری را به سمت تجمع یافتن سوق داده است. در واقع نانوذرات می‌توانند موجب القای تجمع تاو گردند.



نمودار ۳- جذب نوری پروتئین تاو در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید منگنز در محیط آمیلوئیدژنیک

نتایج طیف‌سنجی جذبی Congo Red

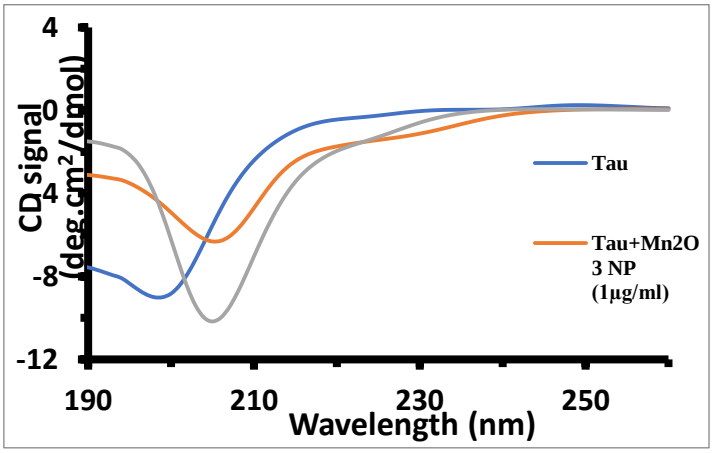
طیف‌سنجی کنگو رد در یک محیط آمیلوئیدژنیک انجام شد. از این آزمون برای تشخیص حضور فیبریل آمیلوئید استفاده شد که در محدودهٔ بین ۴۵۰ تا ۶۵۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود پروتئین تاو که با کنگو رد انکوبه شده، در طول موج ۵۰۰ نانومتر در حضور نانوذرات اکسید منگنز با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین مقدار آمیلوئید را نشان می‌دهد که در این طول موج حضور آمیلوئید حدوداً ۷۴ درصد بیشتر از عدم حضور نانوذرات اکسید منگنز مشخص شده است. در واقع در حضور نانوذرات اکسید منگنز به صورت وابسته به دوز، میزان آمیلوئید افزایش یافته است که می‌توان نتیجه گرفت در حضور نانوذرات اکسید منگنز فیبریل‌های آمیلوئید تاو تشکیل می‌شوند.



نمودار ۴- طیف جذب کنگو رد برای تاو در حضور و عدم حضور نانوذرات اکسید منگنز پس از ۴۵ ساعت انکوباسیون در محیط آمیلوئیدژنیک

نتایج طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی CD برای بررسی ساختار دوم

برای آنکه تغییرات ساختاری پروتئین تاو در محیط آمیلوئیدژنیک در حضور نانوذرات اکسید منگنز را بررسی کنیم، طیف-سنجی دو رنگ‌نمایی دورانی انجام شد. در طیف‌سنجی دو رنگ‌نمایی دورانی، جذب در ۱۹۵ نانومتر سیگنال ساختار رندوم کویل و در ۲۰۵ نانومتر سیگنال ساختارهای آلفا هلیکس و بتا شیت در نظر گرفته می‌شود. مطابق نتایج به دست آمده که در نمودار ۵ نشان داده شده است، طیف‌سنجی CD برای منومر تاو و آمیلوئید تاو پس از ۴۵ ساعت انکوباسیون در طول موج ۱۹۵ نانومتر نشان دهنده‌ی ساختار random coil است اما ساختار آمیلوئید تاو در حضور نانوذرات اکسید منگنز به سمت ساختارهای آلفا هلیکس و بتا شیت شیفت می‌کند که در طول موج ۲۰۵ نانومتر مشاهده می‌گردد. بنابراین نانوذرات اکسید منگنز قادر هستند که تشکیل آمیلوئید را افزایش دهند.



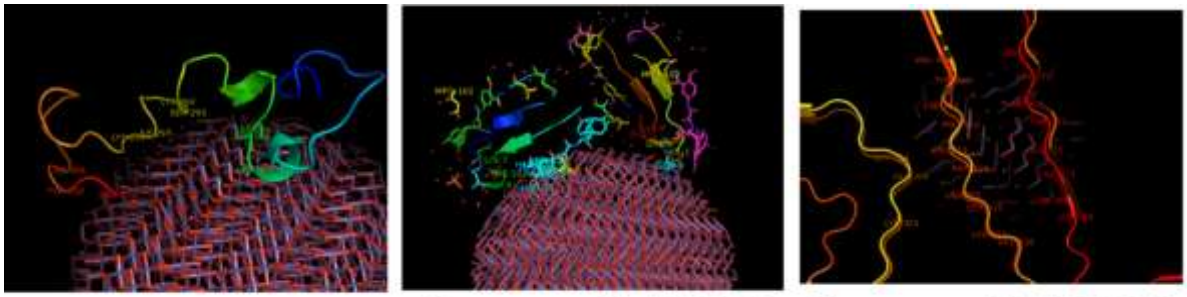
نمودار ۵- تاثیر نانوذرات اکسید منگنز بر ساختار دوم پروتئین تاو با طیف‌سنجی CD بعد از ۴۵ ساعت انکوباسیون در محیط آمیلوئیدژنیک

نتایج داکینگ مولکولی برای بررسی اسیدهای آمینه

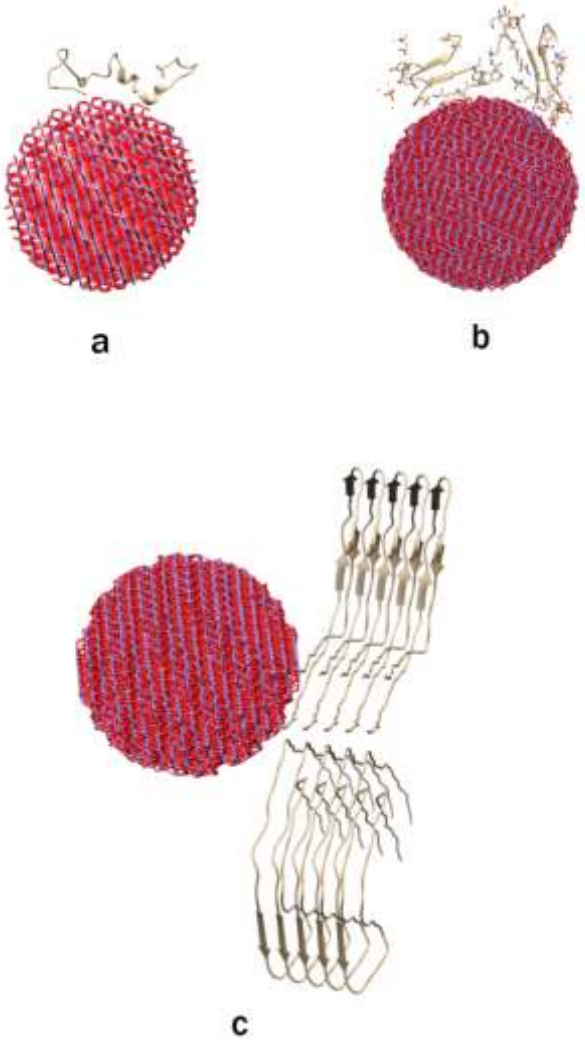
داکینگ‌مولکولی با خوشه کروی نانوذرات اکسید منگنز با قطر ۵ نانومتر به عنوان مدلی از نانوذرات اکسید منگنز انجام شد. انرژی‌های محاسبه شده در جدول ۳ خلاصه شده است. تجسم‌سازی محل داک‌شده با استفاده از ابزار گرافیکی PYMOL

انجام شده است. نانوذرات Mn_2O_3 NP با اسیدهای آمینه اطراف آن در ۴Å در شکل ۳ نشان داده شده است. بخش‌های TP docked- Mn_2O_3 NP در شکل ۳ نشان داده شده‌است. نزدیکترین اسیدهای آمینه واکنشی در جدول ۳ جمع‌آوری شده-است.

از جدول ۳ می‌توان نتیجه گرفت که کلاستر Mn_2O_3 بیشترین اتصال را به 5O3T segment با مقدار انرژی- ۵۴۷/۹۶- نشان می‌دهد. در واقع بخش 5O3T در ساختار کریستالوگرافی پروتئین تاو جمع شده است. به نظر می رسد که خوشه نانوذرات اکسید منگنز به بقایای آب‌دوست گونه‌های جمع شده مانند Thr، Glu، Lys، Tyrو Asp متصل می‌شود. در واقع نانوذرات می‌توانند تجمع پروتئین را تسریع کرده و یا مرحله فاز هسته‌سازی را تسریع کنند و تشکیل آمیلوئید را افزایش دهند. این توانایی برای تغییر جمعیت پروتئین به سمت تجمع یا تفکیک پروتئینی به پارامترهای مختلفی از جمله غلظت نانوذرات، غلظت پروتئین، نوع نانوذرات و pH بستگی دارد.



شکل ۳- نانوذرات اکسید منگنز با اسیدهای آمینه اطراف آن که با استفاده از نرم‌افزار PYMOL بررسی گردید



شکل ۴- داکینگ کمپلکس نانوذرات اکسید منگنز با a: 2MZ7، b: 4E0N و c: 5O3T

جدول ۳- نتایج داکینگ مولکولی کلاستر نانوذرات اکسید منگنز با پروتئین تاو

نانوذرات	شناسه PDB رسپتور	امتیاز داکینگ (E-value)	اسیدآمینه‌های درگیر در میانکنش
Mn_2O_3	2MZ7	-411.96	Pro-312, Ile-308, Ile-298, Ser-293, Leu-284,Asp-283,Leu-282,Lys-281
Mn_2O_3	4E0N	-487.41	Glu-9.D, Phe-10.B, Ser-1.C, Glu-9.B
Mn_2O_3	5O3T	-547.96	Leu-376.J,Lys-375.J,His-374.J,Thr-373.J,Glu-372.J,Ile-371.J,Ile-308.J, Val-306.J, Val-309.J,Val-311.J, Tyr-310.J, Lys-311.J,Pro-312.J,Val-318.J, Asp-314.J, Leu-315.J

بحث

زمانی که مواد به مقیاس نانو تبدیل می‌شوند در خواص شیمیایی، زیستی و فعالیت‌های کاتالیستی آن‌ها تغییراتی ایجاد می‌شود. موادی که در حالت توده‌ای بی‌خطر هستند زمانی که به حالت نانو تبدیل می‌شوند ممکن است سمی و خطرناک

باشند. به‌علاوه اندازه کوچک نانوذرات باعث می‌شود تا این مواد بتوانند بر سدهای دفاعی بدن غلبه کنند (۹۹). در ارزیابی خطرات مواجهه با نانوذرات مواردی مانند اندازه و توزیع، شکل، خواص، بار سطحی، جرم، غلظت و توزیع آن‌ها در بدن مؤثر است. این نانوذرات برای سلامت انسان و سایر موجودات کاملاً بی‌خطر نیستند. به دلیل جذب سریع نانوذرات از طریق پوست، تنفس و سلول‌های مخاطی غشا و سپس توزیع در بافت‌های هدف، نانوذرات باعث اختلال در عملکرد قسمت‌های مختلف بدن می‌شوند (۱۰۰, ۱۰۱). ارتباط بین اندازه ذرات می‌تواند روی ویژگی‌های زیستی و راه‌های مختلف مواجهه اثر بگذارد. کاهش اندازه ذرات باعث افزایش ناگهانی در جذب یا سمیت می‌شود، این اثرات ابتدا کم و جزئی هستند ولی چنان‌چه ورود نانوذرات به بدن ادامه یابد به اثرات غیرقابل‌برگشت تبدیل می‌شوند. علاوه بر این به دلیل جدید بودن این مواد، مسمومیت‌های جدید و ناشناخته‌ای ممکن است به وجود آید (۱۰۲).

در تحقیق حاضر برهمکنش پروتئین تاو با نانوذرات اکسید منگنز مورد بررسی قرار گرفت. تاو پروتئین بسیار مهمی است که در سیستم اعصاب مرکزی دیده شده و تجمعات آن می‌تواند منجر به بیماری‌های تحلیل برنده‌ی عصبی همچون آلزایمر شود. فرض تحقیق حاضر این بود که نانوذرات اکسید منگنز از طریق برهمکنش با این پروتئین، موجب تغییر ساختاری آن و در نتیجه رسوب پروتئین تاو می‌گردند. به منظور ارزیابی این فرضیه، تغییرات ساختاری و بیوانفورماتیکی تاو پس از قرار گرفتن در معرض نانوذرات اکسید منگنز توسط فلورسنت ThT، فلورسنت تیروزین، اسپکتروفتومتری UV-vis، طیف سنجی جذبی congo red، طیف سنجی CD و داکینگ مولکولی بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که حضور نانوذره اکسید منگنز، باعث افزایش سرعت تشکیل فیبریلاسیون و تولید فیبریل های آمیلوئیدی می‌شود. فلورسنت ThT نشان داد که حضور نانو ذره اکسید منگنز باعث تشکیل فیبریل آمیلوئید و افزایش فیبریلاسیون می‌شود. اسپکتروفتومتری UV-vis نشان داد که نانوذرات اکسید منگنز موجب القای تجمع پروتئین تاو می‌گردند. نتایج فلورسنت تیروزین نشان دهنده‌ی آن بود که نانوذرات اکسید منگنز باعث تغییرات ساختاری پروتئین تاو و همچنین باعث تجمع پروتئین تاو به سمت فیبریل‌های آمیلوئیدی و افزایش قسمت‌های آبگریز می‌شوند. پس از انکوبه شدن پروتئین تاو در محیط آمیلوئیدژنیک، افزایش قابل توجهی در جذب Congo Red مشاهده شد. در واقع حضور نانوذرات اکسید منگنز باعث تشکیل فیبریل‌های آمیلوئید در پروتئین تاو شده بودند. طیف‌سنجی CD بیانگر آن بود که با افزایش غلظت نانوذرات اکسید منگنز در پروتئین تاو، تشکیل آمیلوئید افزایش می‌یابد. با استفاده از نرم‌افزار Autodock برهمکنش بین نانوذره و پروتئین انجام شد، که این برهمکنش توسط نرم افزار تا جایی ادامه پیدا کرد که در یک نقطه توقف کند که در آن نقطه نانوذره بیشترین تمایل با کمترین انرژی به ساختار پروتئین نشان می‌دهد. نتایج این بخش از تحقیق نیز مانند سایر مراحل تایید کننده‌ی میانکنش نانوذرات اکسید منگنز با پروتئین تاو بود.

تحقیقات مشابهی در این زمینه انجام شده است که همگی بر اثرات سمی نانوذرات فلزی بر پروتئین تاو اشاره دارند.

حاج‌سلیمی و همکاران در سال ۲۰۱۸، طی یک مطالعه آزمایشگاهی تعامل نانوذرات آهن (Fe-NPs) با پروتئین تاو و سلول PC12 را به عنوان مدل‌های سیستم عصبی بالقوه مورد بررسی قرار دادند. همبستگی معکوس بین ثابت استرن و ولمر (KSV[9]) و درجه حرارت نشان داد که مکانیسم فرونشست ایستا بین پروتئین تاو و Fe-NP وجود دارد. تعداد سایت اتصال (n = ۰/۸۶) نشان داد که تقریباً یک سایت اتصال Fe-NP در هر پروتئین وجود دارد. همچنین، Fe-NP ها ساختار مارپیچ تصادفی پروتئین تاو را تثبیت کردند. علاوه بر این، Fe-NPs زنده ماندن سلول‌های PC12 با قطعه قطعه شدن DNA به روش آپوپتوز را کاهش داد (۸۵). نتایج این تحقیق با تحقیق حاضر مبنی بر سمیت نانوذرات برای پروتئین تاو همخوانی دارد.

رحمانی و همکاران در سال ۲۰۱۸، برهمکنش نانوذرات نقره با پروتئین تاو و رده سلولی نوروبلاستوما به عنوان مدل‌های سیستم عصبی را مورد بررسی قرار دادند. مطالعه فلورسنت نشان داد که AgNPs با قطر حدود ۱۰-۲۰ نانومتر به طور خود به خود از طریق پیوندهای هیدروژنی و فعل و انفعالات واندروالس یک مجموعه ایستا با پروتئین تاو تشکیل می‌دهند. علاوه بر این، نشان داده شد که AgNPs مرگ و میر سلول نوروبلاستوما SH-SY5Y را از طریق قطعه قطعه شدن DNA که یک

[9] Stern and Volmer

ویژگی اصلی آپوپتوز است، القا می‌کند (۸۶). در مطالعه‌ی حاضر نیز همسو با مطالعه‌ی ذکر شده نشان داده شد که نانوذرات اکسید منگنز با پروتئین تاو برهمکنش دارند.

کرمانی و همکاران در سال ۲۰۱۸، تغییرات ساختاری پروتئین تاو و سمیت سلولی سلول‌های نوروبلاستوما در حضور نانوذرات اکسید آلومینیوم (Al_2O_3 NPs) را مورد بررسی قرار دادند. مشخص شد که نانوذرات Al_2O_3 به پروتئین تاو متصل می‌شوند و یک مجموعه ایستا را تشکیل می‌دهند و ساختار تاو را به سمت یک ساختار بسته بندی شده‌تر جمع می کنند. تحقیقات داکینگ مولکولی و دینامیک مولکولی نشان داد که نانوذرات داخلی به زائده‌های آبگریزی بخش‌های تاو متصل می‌شوند و برخی از فولدینگ ساختاری حاشیه‌ای بخش تاو را ترویج می‌کنند. سنجش سلولی نشان داد که نانوذرات Al_2O_3 می‌توانند از طریق نشت غشایی، فعال سازی کاسپاز -۹ / -۳ و القاء آپوپتوز و نکروز، منجر به مرگ و میر سلول شوند (۸۷). نتایج این تحقیق نیز با نتایج تحقیق حاضر هم‌راستا بوده و تایید کننده‌ی اثرات سمی نانوذرات بر پروتئین تاو می‌باشد.

نوری و همکاران در سال ۲۰۱۸، تغییرات ساختاری پروتئین تاو و سمیت سلولی سلول‌های PC-12 پس از قرار گیری در معرض نانوذرات اکسید کبالت را مورد بررسی قرار دادند. تحقیقات فلورسنت نشان داد که نانوذرات Co_3O_4 به طور خودبه‌خود واسطه تشکیل یک مجموعه ایستا با پروتئین تاو از طریق پیوندهای هیدروژنی و نیروهای واندروالسی است. همچنین مطالعه داکینگ نشان داد که آمینواسیدهای Ser و Gln نقش مهمی در ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین تاو و نانوذرات Co_3O_4ها دارند. اندازه گیری UV-CD دور نشان داد که نانوذرات Co_3O_4 ساختار آشکار پروتئین تاو را به سمت یک شکل تا خورده‌تر تغییر داده‌اند. علاوه بر این، نشان داده شد که نانوذرات Co_3O_4 باعث کاهش زنده ماندن سلول PC-12 از طریق نشت غشاء، تکه تکه شدن DNA، آپوپتوز و نکروز می‌شوند (۸۸). نتایج این تحقیق کاملاً با نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر انطباق دارد.

شریعتی و همکاران در سال ۲۰۱۸، تعامل نانوذرات سیلیس با پروتئین‌های تاو و سلول‌های PC12 را توسط مطالعات پایداری کلوئیدی، ترمودینامیکی، داکینگ و مطالعات سلولی، مورد بررسی قرار دادند. بررسی‌های بالقوه TEM، DLS و zeta نشان داد که تاو می‌تواند پایداری کلوئیدی نانوذرات SiO_2 را کاهش دهد. مطالعه طیف سنجی فلورسنت نشان داد که نانوذرات SiO_2ها از طریق پیوندهای هیدروژنی و فعل و انفعالات واندروالس با تمایل زیاد به پروتئین تاو متصل می‌شوند. همچنین مطالعه داکینگ مشخص کرد که آمینواسیدهای Ser، Thr و Tyr یک ریز محیط قطبی را برای تعامل SiO_2 NPs/تاو فراهم می‌کند. مطالعات سلولی نشان داد که نانوذرات SiO_2 می‌توانند مرگ و میر سلول را از طریق مکانیسم آپوپتوز و نکروز القا کنند (۸۹). در تحقیق حاضر نیز هم‌راستا با این تحقیق نشان داده شد که نانوذرات اکسید منگنز با پروتئین تاو برهمکنش دارند.

روشنفکر و همکاران در سال ۲۰۱۹، تاثیر نانوذرات سیلیس در ایجاد تغییرات در پروتئین تاو و استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در رده سلولی نوروبلاستوما را مورد بررسی قرار دادند. بررسی‌های دینامیک مولکولی و طیفی نشان داد که ساختار فولد نشده تاو در حضور SiO2 NP ها آشکارا منجر به یک ساختار جمع شده تا حدی تا خورده و آمورف می‌شود. روش سلولی نشان داد که SiO2 NP ها از طریق تجمع ROS و القای آپوپتوز بر روی سلول‌های SH-SY5Y اثر سمیت سلولی دارند (۹۰). نانوذرات اکسید منگنز نیز اثری مشابه نانوذرات سیلیس در تغییر ساختار تاو نشان دادند که با این تحقیق هم‌سو می‌باشد.

مهدی زاده و همکاران در سال ۲۰۱۹ در طی یک مطالعه بیوفیزیکی، دینامیک مولکولی، سلولی و مولکولی، فولدینگ تاو و سمیت سلول‌های نوروبلاستوما در حضور نانوذرات اکسید منگنز را مورد بررسی قرار دادند. روش‌های طیفی و مطالعات دینامیکی مولکولی نشان داد که نانوذرات MN_2O_3ها می‌توانند ساختار تاو را به سمت یک ساختار بیشتر بسته بندی شده جمع کنند. همچنین نانوذرات Mn_2O_3 زنده ماندن سلول را به روشی وابسته به دوز کاهش دادند. در واقع، فعال سازی کاسپاز -۳ و کاسپاز-۹، ارتفاع نسبت Bax / Bcl-2 و القای آپوپتوز پس از قرار گرفتن SH-SY5Y در معرض نانوذرات Mn_2O_3 مشاهده شد (۹۱). این تحقیق نیز هم‌راستا با تحقیق حاضر بیان کننده‌ی اثر سمی نانوذرات اکسید منگنز بر پروتئین تاو بود.

حاجی‌محمدجعفری و همکاران در سال ۲۰۱۹، در طی یک مطالعه بیوترمودینامیک و مولکولی، اثرات نانوذرات اکسید نیکل بر پروتئین تاو و سلول‌های شبه نورون را مورد بررسی قرار دادند. مطالعه DLS نشان داد که محلول NiO از پایداری کلوئیدی خوبی برخوردار است. مطالعه فلورسنت نشان داد که مقادیر KSV به ترتیب $۲/۹۵\pm۰/۳۵\times۱۰^{۴}$، $۳/۳۱\pm۰/۵۹\times۱۰^{۴}$ و $۳/۹۲\pm۰/۶۵\times۱۰^{۴}$ در K۲۹۸، K ۳۱۰ و K۳۱۵ بود. همچنین مقادیر ΔG° (کیلوژول بر مول)، $\Delta^{\circ}H$ (کیلوژول بر مول) و $T\Delta S^{\circ}$ (کیلوژول بر مول) در ۲۹۸ درجه کلوین به ترتیب ۱/۱۵۷±۱۳/۲۷، ۰/۱۴±۱/۹۸ و ۲/۰۱±۱۵/۲۵ بود. مطالعات نظری نشان می‌دهد که افینتی بخش 5O3T به NiO NP (30Å) بالاتر از NiO NP (50 Å) است. علاوه بر این، NiO NPs افزایش قابل توجهی در مرگ و میر سلول‌های SH-SY5Y به روشی آپوپتوتیک نشان داد (۹۲). نتایج این تحقیق به ویژه نتایج مربوط به افینیتی رسپتورها کاملاً با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد.

حسینعلی و همکاران در سال ۲۰۱۹، برهمکنش پروتئین تاو با نانوذرات اکسید نیکل را توسط مطالعات بیوفیزیکی، دینامیک مولکولی و مطالعات سلولی مورد بررسی قرار دادند. ANS، آزمون نیل قرمز، ThT و بررسی میکروگراف الکترونی نشان داد که NiPNP ها می‌توانند قسمت‌های آبگریزی تاو را افزایش داده و باعث ایجاد تجمعات تاو آمورف شوند. روش طیف سنجی CD دور و نزدیک نشان داد که NiO NP می‌تواند به ترتیب ساختار ثانویه و سوم تاو را تغییر دهد. مطالعات نظری نشان می‌دهد که NiO NP منجر به جمع شدن ساختار تاو می‌گردد. از نظر سلولی، NiO NP باعث اثرات مرگ و میر و مورفولوژیکی قابل توجهی در برابر سلول‌های SH-SY5Y می‌شود. همچنین نانوذرات NiO تأثیر قابل توجهی در تولید ROS داخل سلولی و القاء آپوپتوز دارند (۹۳). نتایج تحقیق حاضر با نتایج این تحقیق هم‌راستا بود.

فردانش و همکاران در سال ۲۰۱۹، با استفاده از مطالعات بیوفیزیکی، محاسباتی و سلولی، تجمع آمورف تاو در حضور نانوذرات دی اکسید تیتانیوم را مورد بررسی قرار دادند. نشان داده شد که نانوذرات TiO2 منجر به فعل و انفعالات آب‌دوست، تغییرات ساختاری ثانویه و سوم و تشکیل توده‌های تاو آمورف می‌شود. تغییرات ساختاری تاو سمیت سلولی ناشی از TiO2 NP ها را افزایش می‌دهد. این داده‌ها نشان داد که پروتئین جاذب دناتوره شده روی سطح نانوذرات ممکن است سمیت سلولی NP را تقویت کند (۹۴). نتایج این تحقیق نیز با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد.

نتیجه گیری کلی

به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که نانوذره اکسید منگنز باعث ایجاد تغییر ساختار پروتئین تاو شده و در نتیجه باعث تجمع این پروتئین می شود که این تغییر ساختار پروتئینی می تواند در آینده باعث ایجاد بیماری های تحلیل برنده‌ی عصبی به ویژه آلزایمر شود. نانوذرات به دلیل ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی به عنوان یکی از آلاینده‌های مهم در ایجاد سمیت بر عضوهای مختلف بدن مطرح هستند، تحقیقات بیشتری برای شناسایی خطرهای زیست-محیطی و ایمنی نانوذرات مورد نیاز است چرا که امکان استنشاق نانوذرات و جذب آن‌ها از راه‌های مختلف و تجمع آن‌ها در بدن و محیط‌زیست وجود دارد که می‌تواند سلامتی افراد را تحت‌الشعاع قرار دهد. ارزیابی نوع مواجهه و شناسایی ویژگی‌های خطر برای نانوذرات، نیازمند در نظر گرفتن ایمنی افراد در طی تماس شغلی برای تولید نانوذرات بسته به شرایط ساخت، فرمولاسیون، حمل‌ونقل، ذخیره و طول مدت زمان تماس در مصرف‌کنندگان دارد و باید به خطرهای بالقوه نانومواد توجه کرد. ایمنی نانوذرات نیازمند آگاهی در رابطه با اثرات این مواد بر انسان و محیط‌زیست، شناخت کامل مواد و اثرات سم‌شناسی آن‌هاست؛ به هرحال آگاهی عمومی و اطلاع‌رسانی به طور قابل‌توجهی برای جنبه‌های سم‌شناختی نانوذرات حائز اهمیت است. به‌طورکلی نانوذرات همانند یک شمشیر دولبه دارای اثرات مفید و مضر هستند که می‌توان با رعایت اصول صحیح کار با نانوذرات از خطرات آن‌ها کم کرد. تحقیقات در زمینه نانو و توسعه و ارتقای این فناوری به‌طور گسترده‌ای در دهه‌های اخیر افزایش یافته است ولی اطلاعات کمی در زمینه خطرات بالقوه انسانی وجود دارد. گرچه فناوری نانو باعث انقلاب و تحول گسترده‌ای در بسیاری از زمینه‌ها شده است، با این‌حال کاهش سمیت و خطرات مواجهه با نانوذرات از اهداف اصلی این حوزه است که امید می‌رود در تحقیقات آتی به طور گسترده به آن پرداخته شود.

پیشنهادات

- بررسی اثر غلظت‌های پایین‌تر نانوذره اکسید منگنز بر پروتئین تاو به منظور دستیابی به غلظت ایمن
- بررسی بیان ژن‌های مرتبط با بیماری آلزایمر در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید منگنز در شرایط in vitro
- بررسی اثر نانوذرات اکسید منگنز بر سایر پروتئین‌های مهم دخیل در بیماری‌ها

منابع

1. Bhushan B. Introduction to nanotechnology. Springer handbook of nanotechnology: Springer; 2017. p. 1-19.
2. Kumar CS. Nanotechnology Characterization Tools for Tissue Engineering and Medical Therapy: Springer; 2019.
3. Kumar CS. Nanotechnology characterization tools for biosensing and medical diagnosis: Springer; 2018.
4. Solaiman S, Yamauchi Y, Kim JH, Horvat J, Dou SX, Alici G, et al. Nanotechnology and its medical applications: revisiting public policies from a regulatory perspective in Australia .Nanotechnology Reviews. 2017;6(3):255-69.
5. Obaid MSA, Singh P, editors. Nanotechnology and its impact on Medical diagnosis. 2020 International Conference on Intelligent Engineering and Management (ICIEM); 2020: IEEE.
6. Mirzaei M. Nanotechnology for science and engineering. Advanced Journal of Science and Engineering. 2020;1(3):67-8.
7. Bhagyaraj SM, Oluwafemi OS. Nanotechnology: the science of the invisible. Synthesis of inorganic nanomaterials: Elsevier; 2018. p. 1-18.
8. Azadeh N, Hooshmandi Z, Setorki M. Effect of Fe4NiO4Zn nanoparticles on serum urea-uric acid and creatinine in male rat. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services. 2015;37(3):6-11.
9. Jaimand K, Assareh M, Mirza M, Nadery M, Karimi S, Parsa E. Seasonal fluctuation of the essential oil and 1, 8-cineole compound in adapted Eucalyptus species in Fars province. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 2013;29(4.(
10. Mathys H, Davila-Velderrain J, Peng Z, Gao F, Mohammadi S, Young JZ, et al. Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. Nature. 2019;570(7761):332-7.
11. Khyade VB, Khyade SV, Jagtap SG. Alzheimer's Disease: Overview. International Academic Institute for Science and Technology. 2016;3(12):23-38.
12. Zali H, Samaneh Sadat S, Rashidy Pour A, Rezaei Tavirani M. Epidemiology and Etiology of Alzheimer's disease. Koomesh. 2016:119-27.
13. Soheili M, Ara L, Bani Taba Bidgoli SM, Salami M. A Review on Amyloid Beta Peptides and Tau Proteins Involved in the Alzheimer's Disease. Journal Of Neyshabur University Of Medical Sciences. 2017;5(3):1-8.
14. Salam MA. Synthesis and characterization of novel manganese oxide nanocorals and their application for the removal of methylene blue from aqueous solution. Chemical Engineering Journal. 2015;270:50-7.
15. Benedetti TM, Bazito FF, Ponzio EA, Torresi RM. Electrostatic layer-by-layer deposition and electrochemical characterization of thin films composed of MnO2 nanoparticles in a room-temperature ionic liquid. Langmuir. 2008;24(7):36.۱۰-۰۲
16. Prasad R. Fungal nanotechnology: applications in agriculture, industry, and medicine: Springer; 2017.

17. Cuervo Blanco T, Sierra CA, Zea HR. Nanostructured MnO2 catalyst in E. crassipes (water hyacinth) for indigo carmine degradation. Revista Colombiana de Química. 2016;45(2):30-8.
18. Bottger G, Geddes A. The infrared spectra of the crystalline tetramethylammonium halides. Spectrochimica Acta. 1965;21(10):1701-8.
19. Kruis FE, Fissan H, Rellinghaus B. Sintering and evaporation characteristics of gas-phase synthesis of size-selected PbS nanoparticles. Materials Science and Engineering: B. 2000;69:329-34.
20. Jung JH, Oh HC, Noh HS, Ji JH, Kim SS. Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area. Journal of aerosol science. 2006;37(12):1662-70.
21. Zhang H, Wu J, Zhang J, He J. 1-Allyl-3-methylimidazolium chloride room temperature ionic liquid: a new and powerful nonderivatizing solvent for cellulose . Macromolecules. 2005;38(20):8272-7.
22. Lotfi L, Zaghari M, Zeinoddini S, Shivazad M, Davoodi D, editors. Comparison dietary nano and micro manganese on broilers performance. Proceedings of the 5th International Conference on Nanotechnology: Fundamentals and Applications; 2014.
23. Ramos AP, Cruz MA, Tovani CB, Ciancaglini P. Biomedical applications of nanotechnology. Biophysical reviews. 2017;9(2):79-89.
24. Lu L, Luo X, Ji C, Liu B, Yu S. Effect of manganese supplementation and source on carcass traits ,meat quality, and lipid oxidation in broilers. Journal of animal science. 2007;85(3):812-22.
25. Mondal D, Das S, Paul BK, Bhattacharya D, Ghoshal D, Gayen AL, et al. Size engineered Cu-doped α-MnO2 nanoparticles for exaggerated photocatalytic activity and energy storage application. Materials Research Bulletin. 2019;115:159-69.
26. García-Soriano D, Amaro R, Gutiérrez L, Navío C, Salas G. Hybrid Fe3O4@ MnO2 nanoparticles for hyperthermia and MRI applications. 2019.
27. Johnson CP, Myers SM. Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders. Pediatrics. 2007;120(5):1183-215.
28. Bondy SC. Low levels of aluminum can lead to behavioral and morphological changes associated with Alzheimer's disease and age-related neurodegeneration. Neurotoxicology. 2016;52:222-9.
29. Abbondante S, Baglietto-Vargas D, Rodriguez-Ortiz CJ, Estrada-Hernandez T, Medeiros R, LaFerla FM. Genetic ablation of tau mitigates cognitive impairment induced by type 1 diabetes. The American Journal of Pathology. 2014;184(3):819-26.
30. Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Particle and fibre toxicology. 2005;2(1):8.
31. Lara Y, Nguyen T, Marilena L, Alexander M. Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles. Nano Today. 2011;6:585-607.
32. Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Particle and fibre toxicology. 2006;3(1):11.