

تأثیر پیتید ضد میکروبی پکسی گانان بر پایداری ساختاری نانوذرات طلا

نفیسه یزدانی چراتی^۱، مریم تبرزد*^۲، بهرام دارائی^۳، بیژن رنجبر*^۱

۱- گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات فن آوری پروتئین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

ranjbarb@modares.ac.ir • m_tabarzad@sbmu.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۴

دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۱۶

چکیده

مطالعه برهمکنش پروتئین-نانوذرات طلا اهمیت فراوانی در پزشکی، از جمله انتقال دارو، طراحی واکسن‌ها، زیست سنسورها، سنجش زیستی و تصویربرداری دارد. پیتیدهای ضد میکروبی (AMPs) توالی‌های کوتاه اسید آمینه‌ای هستند که در درمان دارویی عفونت‌های مقاوم به دارو از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. برهمکنش این پیتیدها با نانوذرات طلا (AuNPs) مزایایی مانند ذخیره طولانی مدت، انتقال هدفمند به داخل سلول‌ها و کاهش دوز مصرفی دارو را فراهم می‌کنند. لازمه این امر حفظ شکل و اندازه نانوذرات درگیر در برهمکنش می‌باشد. در مطالعه حاضر، برهمکنش نانوذرات طلا در غلظت $10^{-7} \times 2/28$ مولار با سه غلظت (۰/۸، ۲، ۴) میکرومولار از پکسی گانان به عنوان یک پیتید ضد میکروبی با طیف اثر وسیع، در حجم‌های مختلف ۲ تا ۱۰۰ میکرولیتر، برای مطالعه تغییرات شکل، بار و اندازه ذرات درگیر در برهمکنش توسط روش‌های طیف سنجی جذبی-فرابنفش، پراکندگی نور حرکتی (DLS) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) بررسی شد. در هر سه غلظت با افزایش غلظت پیتید که در اثر افزایش حجم محلول پیتیدی ایجاد شد، میزان بار سطحی ذرات مثبت‌تر شد و اندازه ذرات افزایش یافت. این امر به صورت ایجاد قله‌ای جدید در مقادیر بالای ۶۰۰ نانومتر در طیف جذبی نانوذرات مشاهده شد که در اثر میانکنش گروه آمین II (نوع دو) اسید آمینه لیزین پیتید با سطح نانوذرات و در نتیجه تجمع ذرات در غلظت‌های بالاتر پیتید بود.

کلید واژگان: نانوذرات طلا (AuNPs)، پیتید ضد میکروبی (AMPs)، برهمکنش پیتید-نانوذرات طلا، پراکندگی نور حرکتی (DLS)

۱- مقدمه

در سال‌های اخیر با پیشرفت علوم زیستی، کاربردهای مختلفی از پپتیدها به عنوان حامل دارو، واکسن، هورمون، نقش رسپتوری و ضد میکروبی توسعه یافته است. امروزه به دلیل افزایش مقاومت های آنتی بیوتیکی، ضرورت پیشرفت ترکیبات ضد میکروبی به شدت احساس می شود [۱]. از جمله این ترکیبات پپتیدهای ضد میکروبی می باشند [۲]. یکی از انواع این پپتیدها با خاصیت ضد میکروبی، پپتید پکسی گانان یا (MSI-78)، آنالوگ پپتید مگائینین ۲ با ترتیب اسیدهای آمینه $GIGKFLKAKKFGKAFVKILKK-NH_2$ است که به طور طبیعی از پوست نوعی قورباغه آفریقایی استخراج شده است [۳]. این پپتید در مجاورت غشا سلولی، لیپید دو لایه (سر آنیونی لیپید) دارای ساختار مارپیچ آلفا می شود و مکانیسم تخریب غشا توسط این پپتید از نوع تشکیل منافذ حلقوی است. از آنجایی که این پپتید، بر طیف وسیعی از باکتری ها و سایر ارگانسیم های پاتوژن مؤثر عمل می کند، در مقایسه با سایر پپتیدها ضد میکروبی در مطالعات داروسازی اهمیت ویژه ای دارد [۴]. از جمله بیماری هایی که در آن عفونت انواع باکتری ها مشاهده می شود، زخم پای دیابتی است که نیاز به درمان آنتی بیوتیکی با طیف اثر گسترده دارد. یکی از مشکلات درمان زخم های دیابتی تشکیل زیست لایه می باشد که مقاومت آنتی بیوتیکی برای باکتری های قسمت های درونی تر ایجاد می کند و نیاز به دوزهای بالاتری از ترکیب ضد میکروبی برای درمان ایجاد می شود [۵ و ۶]. از سویی دیگر استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی در غلظت بسیار بالا می تواند موجب آسیب به سلول های یوکاریوتی شود. اتصال به حامل های نانوذره ای می تواند در رفع این مشکلات مؤثر واقع شده و سبب افزایش نیمه عمر پپتید شود. بدین منظور، سیستم های انتقال دارویی همچون نانو حامل ها می توانند چنین محدودیت هایی را رفع کنند [۹-۹].

[۷]. گروهی از این ذرات که به عنوان نانو حامل کاربرد دارند، نانوذرات طلا هستند. نانو ذرات طلا به دلیل نسبت بالای سطح به حجم و سمیت پایین برای سلول های انسانی، مورد مناسبی به عنوان حامل های دارویی، ژن، پروتئین و آنزیم ها به شمار می آیند که در درمان های فتوترمال و رادیوتراپی حائز اهمیت هستند [۱۰]. تحقیقات نشان دادند که نانوذرات بار منفی طلا نسبت به بار مثبت سمیت سلولی کمتری دارند [۱۱]. لازمه داشتن برهمکنش مناسب بین پپتید و نانو ذرات، حفظ ساختار طبیعی ذرات درگیر در برهمکنش است؛ زیرا که با تغییر شرایط محیط از جمله تغییر غلظت یونی، بار و pH، نانو ذرات تجمع پیدا می کنند [۱۲]. تجمع نانوذرات در یکنواخت شدن توزیع و اندازه نانوذرات در محلول تأثیر می گذارد. این یکنواختی از ویژگی های الزامی برای داشتن برهمکنش مناسب بین ذرات و عامل متصل به آنها در دارورسانی و درمان است [۱۳]. بویلی و همکارانش در سال ۲۰۲۰ با بررسی برهمکنش کووالانسی میان نانوذرات طلا و پپتیدهایی که دارای گروه های عاملی آلدوست و آنگریز بودند، متوجه افزایش پایداری نانوذرات درگیر در میانکش شدند [۱۴]. پلگرینو و همکارانش در سال ۲۰۲۱ با مطالعه برهمکنش نانوذرات طلا با چندین توالی الیگوپپتیدی موفق به افزایش پایداری و نگه داری طولانی مدت نانوذرات طلا به صورت پودر شدند [۱۵]. در حالی که، چگل و همکارانش در سال ۲۰۱۱ با بررسی برهمکنش نانوذرات طلا با ترکیبات حاوی اسید آمینه و گروه های تیول متوجه ر سوب نانوذرات درگیر در برهمکنش شدند [۱۶]. در این مطالعه برهمکنش پپتید بار مثبت پکسی گانان با نانوذرات بار منفی طلا توسط روش های طیف سنجی مرئی-فرا بنفش، اندازه گیری پتانسیل زتا، پراش دینامیک نور (DLS) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) برای دستیابی به برهمکنش پایدار در pH فیزیولوژیک، در غلظت ها و حجم های مختلف پپتید پکسی گانان بررسی

مرحله صاف کردن انجام شد تا واکنشگرهای مصرف نشده و محصولات ثانویه محلول در محیط، خارج شوند. سپس، پس از پایان هر مرحله شسته شوی رزین توسط حلال های DMF و NMP انجام شد. اتصال سایر اسیدهای آمینه به زنجیره پپتیدی به روشی مشابه اتصال اولین اسیدآمینه انجام شد. در توالی پکسی گانان، اسیدهای آمینه لیزین موجود می باشد که در طول واکنش، گروه های عاملی موجود در شاخه های جانبی این اسیدآمینه با گروه (tert-butyl group; tBu) محافظت شده اند. پس از پایان مراحل سنتز پپتید بر روی رزین این گروه های محافظت کننده، همزمان با جدا شدن پپتید از رزین در طی فرایند شکاف از روی پپتید برداشته شدند. برای انجام فرایند شکاف، از کوکتل سرد شامل آب/TFA/TIS با درصد های ۲/۵، ۲/۵، ۹۵ درصد استفاده شد که قطره قطره در حمام آب سرد به رزین اضافه شد. پس از افزودن کامل کوکتل به رزین، این مخلوط از حمام آب سرد خارج شد و به مدت حدود ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه به آرامی تکان داده شد. برای به دست آوردن پپتید خام جدا شده از رزین، مخلوط واکنش فیلتر شد و حجم زیر صافی به کمک گاز نیتروژن به ۳ میلی لیتر کاهش یافت و قطره قطره به ۳۰ میلی لیتر MTBE سرد اضافه و رسوب سفید رنگ حاصله توسط دستگاه سانتریفیوژ (۴۰۰۰ rpm، ۵ دقیقه) جدا شد. رسوب به دست آمده در ۵ میلی لیتر آب دیونیزه حل و به مدت دو ساعت در فریزر -۸۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و در نهایت توسط دستگاه لیوفیلیزور خشک شد [۱۸].

۲-۲ تخلیص پپتید ضد میکروبی

روش مناسب برای تخلیص پپتیدهای سنتزی، preparative HPLC می باشد. در این مطالعه از ستون C18, Eurospher ۱۰ میکرومتر و ۲۵۰×۱۶ میلی متر برای خلص سازی استفاده شد. طول موج مورد استفاده در شنا ساگر ۲۷۵ نانومتر و فاز متحرک شامل محلول A: که

شد تا غلظت مناسبی از پپتید به دست آید که در آن شکل و ساختار نانو ذرات طلا پایدار باقی می ماند.

۲-مواد و روش ها

برای سنتز پپتید پکسی گانان:

اسیدهای آمینه (گلایسین، آلانین، لوسین، ایزولوسین، لیزین، والین، فنیل آلانین)، تریسوپرایرزالین (TIS)، ان-دی متیل آمین، پیریدین-۱-یل متیلن، ان-متیل متان آمینوم، هگزافلوروفوسفات ان-اکسید (HATU) خریداری شده از شرکت (جی ال- بایو کم؛ چین)، پپیریدین، ان-متیل پیرولیدون (NMP)، متانول، ایزوپروپانول، استونیتریل، دی کلرومتان (DCM)، ترت-بوتیل متیل اتر (MTBE)، دی متیل فرماید (DMF)، ان-ان-دیزوپروپیل اتیل آمین (DIEA)، استیک انیدرید، تری فلورواستیک اسید (TFA)، استیک اسید، نینهدرین، فنول خریداری شده از شرکت (مرک؛ آلمان)، برای سنتز بافر و نانوذرات طلا: هیدروکلرید تریس، سدیم کلرید، تتراکلورآریک اسید سه آبه و سدیم سیترات دو آبه (سیگما آلد ریچ؛ آمریکا) خریداری شدند، در تمامی محلول سازی ها از آب دیونیزه استفاده شد.

۲-۱ سنتز شیمیایی پپتید پکسی گانان

سنتز شیمیایی پپتید در فاز جامد به روش مریفیلد انجام شد [۱۷]، از رزین Rink Amid MBHA به عنوان بستر جامد استفاده شد. ابتدا ۲۰ میلی لیتر حلال DMF با دمیده شدن گاز نیتروژن به داخل راکتور اضافه و به مدت ۵ دقیقه هم زده شد. برای محافظت زدایی از انتهای گروه آمین اسیدهای آمینه، ۱۰ میلی لیتر محلول پپیریدین ۲۰ درصد اضافه شد. پس از آزاد شدن گروه آمین موجود در سطح رزین، اسیدآمینه اول (Fmoc-Lys-OH) در محلول DIEA ۱ مولار در NMP و HATU ۰/۳ مولار در DMF در دستگاه حل شد که منجر به اتصال اسیدهای آمینه به یکدیگر می شود. سپس، به مدت ۳۰ دقیقه با دمیدن نیتروژن هم زده شد. پس از هر مرحله اتصال اسیدآمینه،

توسط دستگاه Zetasizer Nano ZS (Malvern؛ انگلستان) استفاده شد.

۶-۲ میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

بررسی دقیق اندازه و شکل نانوذرات قبل و بعد از برهمکنش با پیتید توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM Zeiss-EM10C-100Kv؛ آلمان) انجام شد. ابتدا مقدار بسیار کمی از پودر سنتز شده را در یک شیشه محتوی حلال مناسب (اتانول، استن، آب مقطر و ...) نمونه مورد نظر حل کردیم، لازم به توضیح است که حلال مناسب حلالی است که با نمونه وارد واکنش نشود. سپس، شیشه حاوی نانوذرات در دستگاه فراصوت به مدت پنج دقیقه و توان متوسط دستگاه برای پراکنده کردن نانوذرات قرار گرفت. در ادامه با میکروپیت از شیشه حاوی نمونه چند قطره گرفته و روی صفحه مناسب که نگهدارنده نانوذرات برای دستگاه TEM می باشند، ریخته و چند دقیقه تا تبخیر کامل حلال از روی صفحه زمان داده شد و سپس آن را داخل دستگاه TEM قرار دادیم. نوع صفحه مصرف شده برای نمونه ها formvar carbon-coated grid Cu Mesh 300 (EMS؛ آمریکا) و دستگاه فراصوت Misonix-S3000 (آمریکا) بود.

۳- نتایج

۱-۳ تعیین جرم مولکولی پیتید سنتز شده توسط دستگاه

LC-Mass به روش الکترواسپری

در سیستم الکترواسپری در مد مثبت، یون های پیتیدی حاصل اتصال پروتون به جایگاه های بازی قوی در ساختمان پیتید تولید و وارد آنالایزر جرمی می شوند. این جایگاه های بازی شامل انتهای آمینی و زنجیره های جانبی اسیدهای آمینه آرژنین، لیزین و هیستیدین هستند.

جسمی با جرم مولکولی M می تواند به صورت های $[M + 1H]^+$ ، $[M + 2H]^2+$ ، $[M + 3H]^3+$ و $[M + 4H]^4+$ یونیزه شود. هر یک از گونه های فوق گرچه از مولکول های واحدی ساخته شده اند، اما دارای نسبت m/z (نسبت جرم

حاوی محلول آب-TFA ۰/۱ درصد و محلول B: حاوی استونیتریل-TFA ۰/۱ درصد و سرعت فاز متحرک ۱۵ میلی لیتر بر دقیقه بود. خلوص نهایی به روش الکتروفورز SDS-PAGE تأیید شد [۱۹]. برای تعیین جرم مولکولی پیتید سنتز شده از دستگاه LC-Mass استفاده شد [۲۰].

۳-۲ سنتز نانو ذرات با بار منفی طلا

سنتز نانو ذرات با بار منفی طلا از طریق احیا نمک تتراکلورآریک اسید ($HAuCl_4$) توسط نمک سدیم سترات به روش فرنز [۲۱ و ۲۲] با اعمال تغییراتی در غلظت هر دو نمک انجام شد. به اختصار، به ۲۵ میلی لیتر آب دیونیزه بر روی همزن و حرارت ۸۰ درجه سانتی گراد، یک سی سی محلول طلا با غلظت ۶/۴ میلی مولار اضافه شد، و بعد از حدود ۳ دقیقه یک سی سی محلول ۴/۱ میلی مولار سدیم سترات به ارلن اضافه شد. بین ۱۵-۱۸ دقیقه در دور بالای همزن مخلوط شد. رنگ محلول در دقیقه های ابتدایی از خاکستری روشن به تیره و سپس، از دقیقه ۵ به بعد به بادمجانی و در نهایت به قرمز بسیار روشن تغییر رنگ داد. پس از آن حرارت خاموش و با دور متوسط همزن تا سرد شدن کامل محلول هم زده شد.

۲-۴ طیف سنجی مرئی-فرا بنفش

طیف جذبی نانوذرات سنتز شده قبل و بعد از برهمکنش با پیتید پکسی گانان در محدوده ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر طیف سنج جذبی-فرا بنفش توسط دستگاه Cary ۱۰۰ (Agilent Technologies؛ آمریکا) بررسی شد. غلظت های (۰/۸، ۰/۲، ۰/۴) میکرومولار پیتید در حجم های ۱۰۰-۲ میکرولیتر به نمونه نانوذره با چگالی نوری یک افزوده و بررسی شدند. تمامی آزمایشات در بافر هیدروکلرید تریس ۴ میلی مولار در حضور نمک سدیم کلراید ۴۰ میلی مولار و pH برابر ۷/۴ انجام شد.

۲-۵ تکنیک پراکندگی نور حرکتی (DLS)

برای بررسی اندازه، بار و میزان پراکندگی نانوذرات قبل و بعد از برهمکنش با پیتید، از تکنیک پراکندگی نور حرکتی

میکروسکوپ الکترونی عبوری ۱۳ نانومتر محاسبه شد (شکل A-۲).

با استفاده از طیف سنجی نشر اتمی، تعداد اتم‌های طلا در یک سی سی از محلول نانوذرات طلا محاسبه شد که تحت عنوان N_{total} در معادله ۲ قرار گرفت، و در نهایت طبق معادله ۲ غلظت کلی نانوذرات طلا سنتز شده محاسبه شد [۲۴].

(۲)

$$C = \frac{N_{total}}{NVN_A}$$

طبق این فرمول N تعداد متوسط اتم‌های طلا، V حجم محلول به لیتر و N_A عدد آووگادرو است. با جایگزینی اعداد در معادله ها غلظت نانوذرات طلا سنتز شده $10^{-7} \times 2/28$ مولار محاسبه شد.

طیف جذبی نانوذره طلا با غلظت $10^{-7} \times 2/28$ مولار در نمودار ۱ قابل ملاحظه است، طیف شامل یک قله که نشان دهنده کروی بودن ذرات و با بیشترین جذب نوری در طول موج ۵۱۹ نانومتر، که این طول موج مشخصه ذرات با اندازه ۱۲-۱۵ نانومتر است [۲۵].

مولکولی به بار) متفاوتی خواهند بود و به همین برای توسط آنالیزر جرمی از یکدیگر تفکیک می‌شوند. پس از سنتز پپتید پکسی گانان (وزن مولکولی معادل ۲۴۷۶ دالتون) در فاز جامد، محصول سنتز شده توسط طیف‌سنجی جرمی شناسایی شد (شکل ۱). نسبت m/z (نسبت جرم مولکولی به بار) ۱۲۳۹ به یون دو بار پروتونه ($[M + 2H]^+$) و ۸۲۶ به یون سه بار پروتونه ($[M + 3H]^3+$) پکسی گانان تعلق دارد که در طیف جرمی مشاهده می‌شود. با توجه به اینکه طیف جرمی تا محدوده ۲۲۰۰ را اسکن کرده است، پیک مربوطه به فرم یون یکبار پروتونه ($[M + 1H]^+$) معادل ۲۴۷۷ در طیف قرار ندارد.

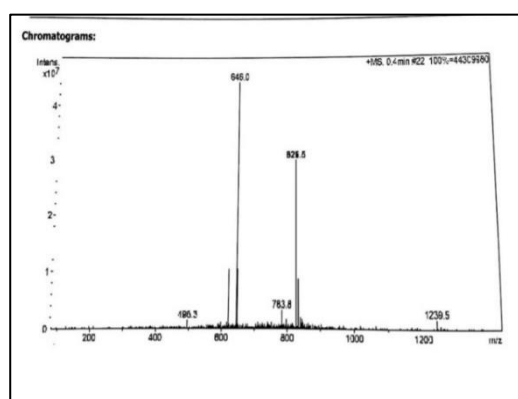
۲-۳ تعیین غلظت نانو ذرات طلا

در ابتدا تعداد اتم‌های موجود در هر ذره طلا طبق معادله ۱ محاسبه شد [۲۳]:

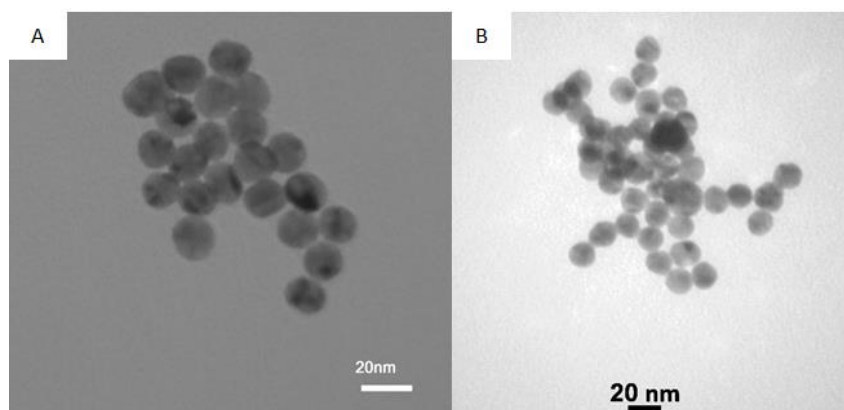
(۱)

$$N = \frac{\pi \rho D^3}{6M}$$

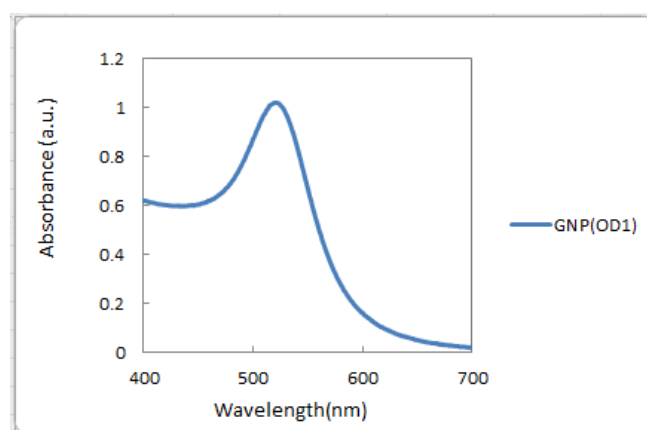
در این معادله، N تعداد متوسط اتم‌های طلا برای هر ذره می‌باشد، ρ چگالی طلا (۱۹/۳ گرم بر سانتی متر مکعب)، M وزن اتمی طلا (۱۹۷ گرم بر مول) و D متوسط قطر ذره است که متوسط قطر ذره از طریق داده های



شکل ۱ طیف جرمی پپتید پکسی گانان سنتز شده



شکل ۲ تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری: نانوذرات طلا به تنهایی (A)، نانوذرات طلا در برهمکنش با ۲۵ میکرولیتر پتید پکسی گانان در غلظت ۲ میکرومولار (B).



نمودار ۱ طیف جذبی نانوذرات طلا سنتز شده به روش اصلاح فرنز در غلظت $2/28 \times 10^{-7}$ مولار.

موج‌های بالاتر از ۶۰۰ نانومتر شکل گرفت. در پتید با غلظت ۰/۸ میکرومولار (نمودار ۲-A) تغییر شکل در طیف جذبی از حجم ۲۰ میکرولیتر پتید آغاز شد، در صورتی که این تغییر در مورد پتید با غلظت ۲ میکرومولار (نمودار ۲-B) و ۴ میکرومولار (نمودار ۲-C) به ترتیب در حجم‌های ۵ و ۲ میکرولیتر مشاهده شد، به نحوی که با افزایش حجم و در نتیجه، مقدار جرمی پتید در غلظت اولیه ۰/۸ میکرومولار تا حجم ۷۰ میکرولیتر شاهد طیف دو قله ای با ارتفاع تقریباً یکسان در هر دو قله هستیم

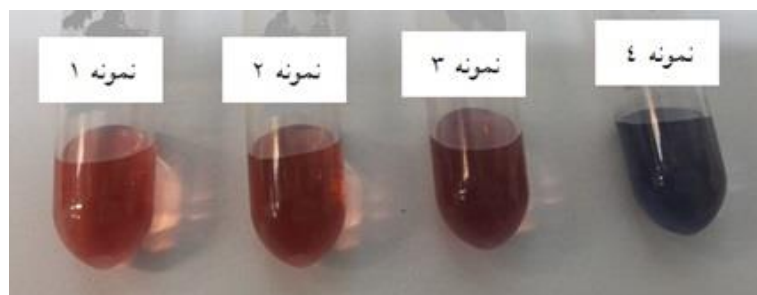
۳-۳ بررسی برهمکنش نانوذرات طلا با پتید

پکسی گانان با بررسی طیف ناحیه مرئی-فرابنفش

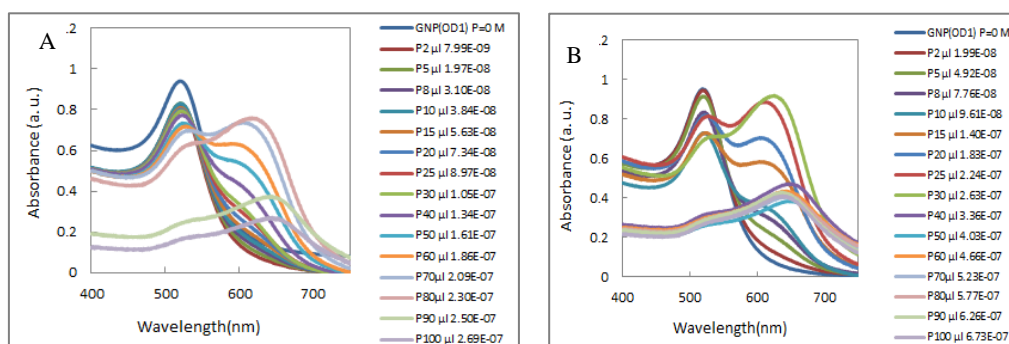
برهمکنش پتید پکسی گانان در غلظت‌های مورد بررسی با نانوذرات طلا با غلظت $2/28 \times 10^{-7}$ مولار در نمودار ۲ نمایش داده شده است. با افزایش حجم محلول پتیدی در هر سه غلظت، طیف جذبی از حالت تک قله خارج و به سمت دو قله‌ای پیش رفت مشابه آنچه بیشنوی و همکارانش در سال ۲۰۰۷ و چگل و همکارانش در سال ۲۰۱۱ مشاهده کردند [۱۶،۲۶]، قله جدید به سمت طول

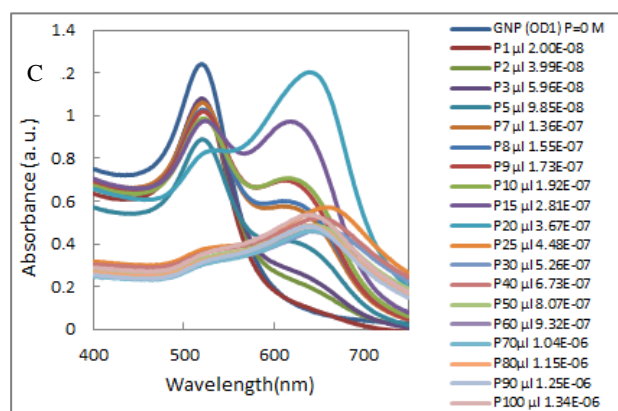
می‌دهد. همانگونه که مشخص است تغییر رنگ در نمونه ۲ نسبت به نمونه یک کمتر از نمونه (۳ و ۴) می‌باشد و در نمونه ۴ نانو ذرات تجمع یافته و به سمت رسوب پیش می‌روند؛ در حالی که بهترین برهمکنش با حفظ ساختار ذره در غلظت ۰/۸ میکرومولار ایجاد شد. نمودار ۴ تصویر طیف جذبی برهمکنش ذره-پیتید پکسی گانان را در این سه غلظت و حجم یکسان (۳۰ میکرولیتر) را نشان می‌دهد؛ طیف جذبی نانوذرات طلا در نمونه‌ای با غلظت اولیه ۰/۸ میکرومولار پیتید نسبت به طیف اصلی نانو ذرات طلا، تغییر کمتری در مقایسه با طیف جذبی ذرات در غلظت‌های ۲ و ۴ میکرومولار پیتید داشته است. از بین این سه غلظت با حجم یکسان بهترین برهمکنش با حفظ ساختار نانوذرات طلا تشکیل داده است.

(نمودار ۳-A). طیفی با این مشخصات در محلول پیتیدی ۲ و ۴ میکرومولار به ترتیب در حجم‌های ۲۵ و ۱۵ میکرولیتر مشاهده شدند. با افزایش حجم محلول پیتیدی در هر غلظت به تدریج شاهد کاهش قله پیک در ناحیه ۵۱۹ نانومتر و افزایش قله طیف در طول موج‌های ۶۲۰ نانومتر به بالا می‌باشیم، به نحوی که در غلظت‌های ۰/۸ و ۲ میکرومولار به ترتیب در حجم‌های ۸۰ و ۳۰ و ۲۰ میکرولیتر از پیتید بیشترین قله طیف در طول موج ۶۳۶ نانومتر به بالا قابل مشاهده است (نمودار ۳-B). در حجم‌های بالاتر از هر سه غلظت شاهد کاهش شدید قله در طول موج‌های بالای ۵۰۰ و ۶۰۰ نانومتر به دلیل تجمع نانوذرات طلا می‌باشیم (نمودار ۳-C). (شکل ۳) تاثیر حجم‌های یکسان (۳۰ میکرولیتر) از غلظت‌های مختلف پیتید پکسی گانان بر تجمع پذیری نانو ذرات طلا را نشان

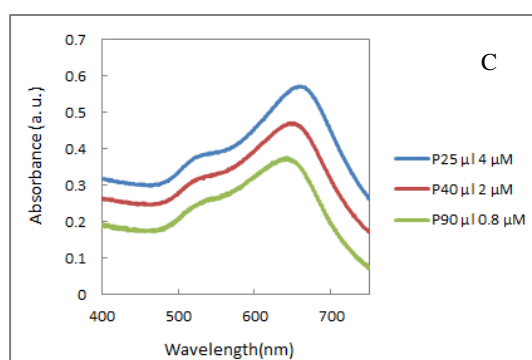
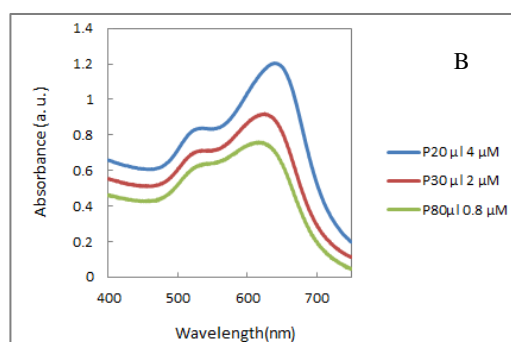
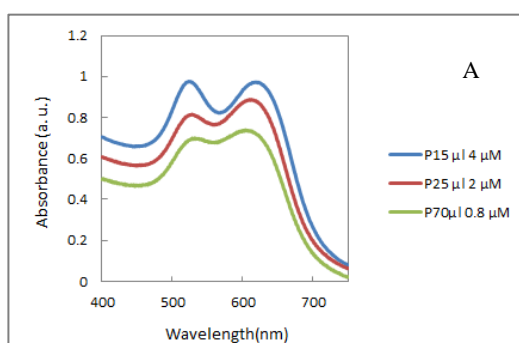


شکل ۳ نمونه (۱) نانوذرات طلا با غلظت $2/28 \times 10^{-7}$ مولار. نانو ذرات طلا با غلظت $2/28 \times 10^{-7}$ مولار در حضور: ۳۰ میکرولیتر پیتید پکسی گانان با غلظت ۰/۸ میکرومولار نمونه (۲)، ۳۰ میکرولیتر پیتید پکسی گانان با غلظت ۲ میکرومولار نمونه (۳)، ۳۰ میکرولیتر پیتید پکسی گانان با غلظت ۴ میکرومولار نمونه (۴).

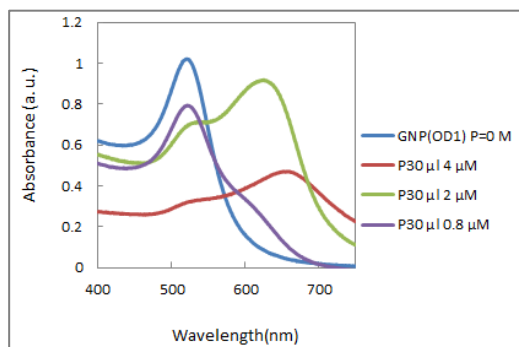




نمودار ۲ طیف جذبی نانوذرات طلا در حضور و عدم حضور پیتید پکسی گانان، در غلظت $2/28 \times 10^{-7}$ مولار ذره: نمودار A غلظت ۰/۸ میکرومولار پیتید پکسی گانان از حجم ۲-۱۰۰ میکرولیتر پیتید، نمودار B غلظت ۲ میکرومولار پیتید پکسی گانان از حجم ۲-۱۰۰ میکرولیتر پیتید، نمودار C غلظت ۴ میکرومولار پیتید پکسی گانان از حجم ۱-۱۰۰ میکرولیتر پیتید.



نمودار ۳ طیف جذبی نانوذرات طلا، در غلظت $2/28 \times 10^{-7}$ مولار در حضور غلظت‌های مختلف پیتید: نمودار A غلظت‌های (۰/۸، ۲، ۴) میکرومولار به ترتیب در حجم‌های (۱۵، ۲۵، ۷۰) میکرولیتر، نمودار B غلظت‌های (۰/۸، ۲، ۴) میکرومولار به ترتیب در حجم‌های (۲۰، ۳۰، ۸۰) میکرولیتر، نمودار C غلظت‌های (۰/۸، ۲، ۴) میکرومولار به ترتیب در حجم‌های (۲۵، ۴۰، ۹۰) میکرولیتر.

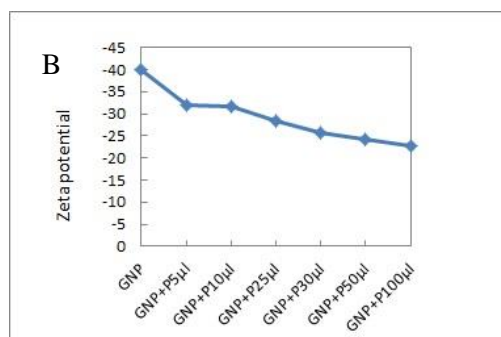
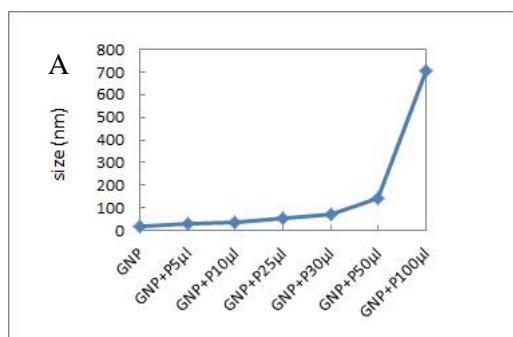


نمودار ۴ طیف جذبی نانوذرات طلا در غلظت $2/28 \times 10^{-7}$ مولار در حضور ۳۰ میکرولیتر از غلظت‌های (۰/۸، ۲، ۴) میکرومولار پپتید پکسی گانان

۳-۴ بررسی برهمکنش نانوذرات طلا با پپتید پکسی گانان به روش DLS

هر چه بار منفی سطح نانوذرات افزایش یابد، منجر به افزایش دافعه الکترواستاتیکی بین ذرات می‌شود، در نتیجه میزان تجمع نانوذرات کاهش می‌یابد [۱۴]. پپتید پکسی گانان دارای ۹ اسید آمینه لیزین است، این اسید آمینه حاوی گروه آمین نوع II است که از طریق این گروه با نانوذرات طلا برهمکنش می‌دهند و منجر به تشکیل قله در طول موج‌های بالاتر از ۶۰۰ نانومتر می‌شوند؛ این امر منجر به کاهش دافعه الکترواستاتیکی نانوذرات طلای

باردار منفی و در نتیجه تجمع ذرات می‌شود [۲۷]. برای تأیید این اثر، اندازه و بار نانوذرات طلا قبل و پس از برهمکنش با پپتید توسط روش پراکندگی نور حرکتی (DLS) در یک غلظت از پپتید در غلظت $2/28 \times 10^{-7}$ مولار ذره بررسی شد (نمودار ۵). همانگونه که انتظار می‌رفت طی برهمکنش با پپتید، با افزایش غلظت پپتید، اندازه ذرات (نمودار A-۵) از ۱۹ نانومتر به حدود ۷۰۰ نانومتر افزایش یافت و بار سطحی ذرات (نمودار B-۵) از (-۴۰) میلی‌ولت به (-۲۵) میلی‌ولت کاهش یافت که این کاهش بار منفی سطحی ذره در اثر برهمکنش با گروه‌های آمین نوع II ایجاد می‌شود.

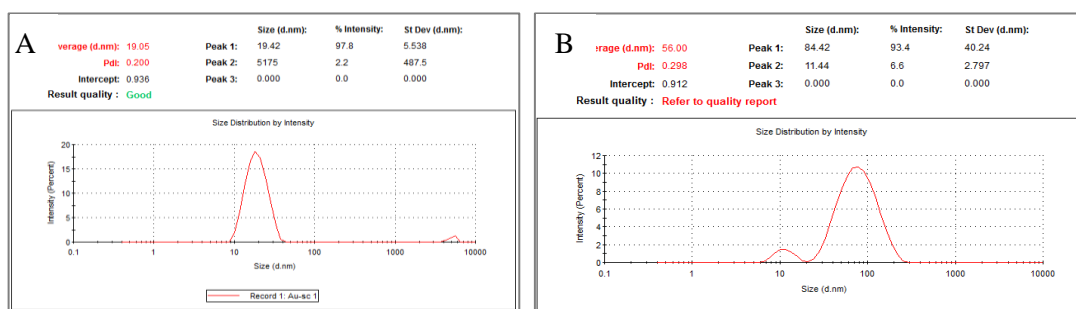


نمودار ۵ نمودار A تغییرات اندازه و نمودار B تغییرات بار سطحی نانوذرات طلا، در غلظت $2/28 \times 10^{-7}$ مولار قبل و پس از برهمکنش با پپتید پکسی گانان در غلظت ۲ میکرومولار در حجم‌های (۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰) میکرولیتر، توسط دستگاه زتا سایزر مالورن.

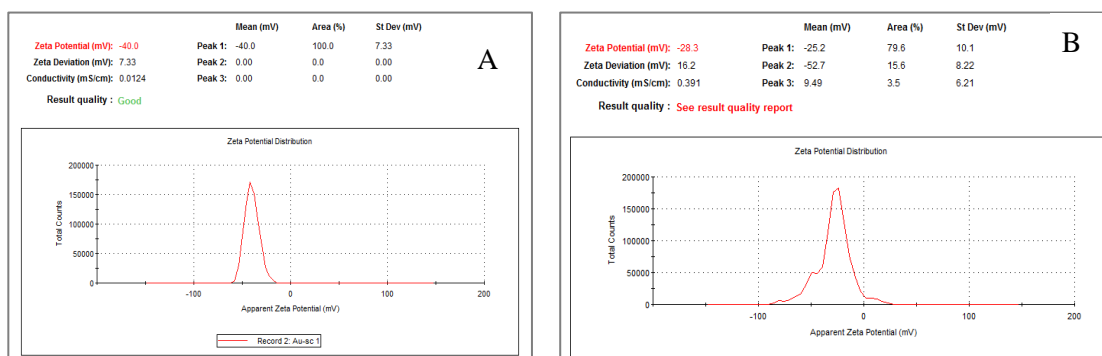
۳-۵ بررسی برهمکنش نانوذرات طلا با پیتید پکسی گانان به روش تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری

و کاهش دافعه بین آنها است. این پدیده در طیف جذبی نانوذرات طلا در برهمکنش با پیتید به صورت دو قله با ارتفاع تقریباً یکسان دیده شد، که بیشتر در (نمودار A-۳) نمایش داده شد. تغییر توزیع اندازه و بار نانوذرات طلا قبل و پس از برهمکنش با پیتید پکسی گانان در همان غلظت استفاده شده در میکروسکوپ الکترونی عبوری، توسط روش DLS مورد بررسی مجدد قرار گرفتند. اندازه نانو ذرات که به صورت شدت پراش نور نمایش داده شده است از متوسط ۱۹ نانومتر به متوسط ۵۶ نانومتر (شکل ۴) و بار ذرات از منفی ۴۰ میلی ولت به منفی ۲۸ میلی ولت کاهش پیدا کرد (شکل ۵) که این امر مؤید کاهش دافعه الکترواستاتیکی بین ذرات طلا در اثر برهمکنش با گروه‌های آمین نوع II و تجمع نانوذرات طلا است [۲۸].

برای اطمینان از عدم تغییر شکل ذرات از شکل کروی به سایر اشکال درحین برهمکنش و نیز تغییر توزیع اندازه ذرات، تصویر میکروسکوپ عبوری نانوذرات طلا قبل و پس از برهمکنش با پیتید در غلظت ۲ میکرومولار و حجم ۲۵ میکرولیتر تصویربرداری شد (شکل ۲). همانگونه که مشخص است نانوذرات طلا، کروی و با اندازه بین ۱۲-۱۵ نانومتر سنتز شدند؛ پس از برهمکنش با پیتید (شکل B-۲) حدود نیمی از ذرات با حفظ شکل کروی، اندازه بیشتر از ۲۰ نانومتر دارند، و حدود نیمی دیگر از ذرات تجمع یافته‌اند که این امر به دلیل کاهش بار سطحی ذرات



شکل ۴ نمودار A اندازه نانوذرات طلا سنتز شده، نمودار B اندازه نانوذرات طلا در حضور ۲۵ میکرولیتر پیتید پکسی گانان با غلظت ۲ میکرومولار.



شکل ۵ نمودار A بار نانوذرات طلا سنتز شده، نمودار B بار نانوذرات طلا در حضور ۲۵ میکرولیتر پیتید پکسی گانان با غلظت ۲ میکرومولار.

۴- نتیجه گیری

برهمکنش پپتید ضد میکروبی پکسی گانان با نانوذرات کروی طلا باردار منفی به منظور دستیابی به غلظت مناسبی از پپتید با هدف حفظ شکل و ساختار نانوذرات طلا در غلظت و حجم‌های مختلف پپتید پکسی گانان مورد مطالعه قرار گرفت. در هر غلظت ثابت با افزایش حجم محلول پپتیدی، طیف نانوذرات کروی طلا از حالت تک قله خارج و تبدیل به دو قله شد، به نحوی که با افزایش حجم به ترتیب شاهد کاهش شدید قله طیف در ناحیه ۵۰۰ نانومتر به بالا و سپس ۶۰۰ نانومتر به بالا هستیم. این امر در نتیجه کاهش دافعه الکتروستاتیکی بین ذرات در اثر برهمکنش با گروه‌های آمین نوع II پپتید است. در پپتید با غلظت ۰/۸ میکرومولار مناسب‌ترین برهمکنش تا حجم ۴۰ میکرولیتر قابل مشاهده است. با افزایش حجم محلول پپتیدی توزیع اندازه ذرات به سمت ذرات با اندازه بزرگتر پیش می‌رود به نحوی که از حجم ۹۰ میکرولیتر به بعد شاهد رسوب کامل ذرات هستیم. در غلظت‌های بالاتر پپتید (۲ و ۴ میکرومولار) به ترتیب شاهد تشکیل تجمع کامل ذرات در حجم‌های ۴۰ و ۲۵ میکرولیتر به بعد بودیم، به طور کل با افزایش غلظت پپتید میزان رسوب نانوذرات افزایش یافت.

تشکر و قدردانی: مطالعه حاضر در دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. نویسندگان از دانشگاه تربیت مدرس برای

کمک‌های مالی در راستای پیشبرد این پژوهش کمال تشکر را دارند.

تأییدیه اخلاقی: این مقاله نیازی به تأییدیه اخلاقی ندارد. **تعارض منافع:** هیچگونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: نفیسه یزدانی چراتی (نویسنده اول)، نگارنده مقاله/پژوهشگر اصلی (۵۰٪)؛ مریم تبرزد (نویسنده دوم)، تحلیلگر داده/بازبینی مقاله (۲۰٪)؛ بهرام

دارائی (نویسنده سوم) پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ بیژن رنجبر (نویسنده چهارم)، تحلیلگر داده/بازبینی مقاله (۲۰٪) **منابع مالی:** حمایت مالی مطالعه حاضر توسط معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تأمین شده است.

۵- منابع

- [1] M. Yasmin, H. MD, et al., Epidemiology of bloodstream infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a tertiary care hospital in New York, *American Journal of Infection Control* 44 (2016) 41-6.
- [2] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature* 415 (2002) 389-395.
- [3] J.M. Conlon, M. Mechkarska, Host-defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family pipidae, *Pharmaceuticals* 7(2014) 58-77.
- [4] M.H.Wu, E. Maier, R. Benz, R.E.W. Hancock, Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*, *Biochemistry* 38 (1999) 7235-7242.
- [5] L.M. Gottler, A. Rammamoorthy, Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan - A highly potent antimicrobial peptide designed from magainin, *Biochimica et Biophysica Acta* 1788 (2009) 1680-1686.
- [6] M.A. Biel, C. Sievert, et al., Antimicrobial photodynamic therapy treatment of chronic recurrent sinusitis biofilms, *Int. Forum Allergy Rhinol* 1(2011) 329-334.
- [7] J.M. Conlon, M. Mechkarska, Host-defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family pipidae, *Pharmaceuticals* 7(2014) 58-77.
- [8] X.L. Zhang, A. Jiang, Z. Ma, X. Li, et al., The synthetic antimicrobial peptide Pexiganan and its Nanoparticles (PNP_s) exhibit the anti-*Helicobacter pylori* activity in vitro and in vivo, *Molecules* 20 (2015) 3972-3985.
- [9] J. zong, S.L. Cobb, N.R. Cameron, Peptide-functionalized gold nanoparticles: versatile biomaterials for diagnostic and therapeutic applications, *Biomater. Sci* (2017) 1-15.
- [10] M.C. Daniel, D. Astruc, Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular

- Characterization and Application Protocols, Springer. P (2007) 3-55.
- [20] C. Ho, et al., Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications, *Clinical Biochemist Reviews* 24(1) (2003) 3-12.
- [21] G. Frens, controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature* 241 (1973) 20-22.
- [22] N. Farahani, M. Behmanesh, B. Ranjbar, A Comparative Study of DNA Loading on the Positive and Negative Surface Charge Gold Nanoparticles, *Modares Journal of Biotechnology* 10 (2019)447-454.
- [23] X. Liu, M. Atwater , et al., Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands, *Colloids Surf B Biointerfaces* 58 (2007) 3-7.
- [24] J.D. Herner, P.G. Green, M.J. Kleeman, Measuring the trace elemental composition of size-resolved airborne particles, *Environmental Science & Technology* 40 (2006) 1925-1933.
- [25] M.A. Dheyab, A.A. Aziz. et al., Monodisperse Gold Nanoparticles: A Review on Synthesis and Their Application in Modern Medicine, *Int. J. Mol. Sci* 23 (2022) 1-34.
- [26] J.A. Tullman, W.F. Finney, Y. Lin, S.W. Bishnoi, Tunable Assembly of Peptide-coated Gold Nanoparticles, *Plasmonics* 2 (2007) 119–127.
- [27] Z. Zhong, S. Patskovskky, p. Bouvrette, et al., The Surface Chemistry of Au Colloids and Their Interactions with Functional Amino Acids, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 4046-4052.
- [28] V. Borse, A.N. Konwar, Synthesis and characterization of gold nanoparticles as a sensing tool for the lateral flow immunoassay development, *Sensors International* 1 (2020) Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology, *Chem. Rev* 104 (2004) 293–346.
- [11] Ch.A. Mirkin, D.A. Giljohann, D.S. Seferos, et al., Gold Nanoparticles for Biology and Medicine, *Angew. Chem. Int. Ed* 49 (2010) 3280–3294.
- [12] P. Wang, X. Wang, L. Wang, et al., Interaction of gold nanoparticles with proteins and cells, *Sci. Technol. Adv. Mater* 16 (2015) 1-15.
- [13] Zh. Hou, Zh. Wang, R. liu, et al, The effect of phospho-peptide on the stability of gold nanoparticles and drug delivery, *Nanobiotechnol* 17 (2019) 1-11.
- [14] E.A. Egorova, M.J. van Rijt, N. Sommerdijk, et al., One Peptide for Them All: Gold Nanoparticles of Different Sizes Are Stabilized by a Common Peptide Amphiphile, *ACS Nano* 14 (2020) 5874–5886.
- [15] S. Locarno, R. Bucci, et al., Ultrashort Peptides and Gold Nanoparticles: Influence of Constrained Amino Acids on Colloidal Stability, *Frontiers in Chemistry* 9 (2021) 1-11.
- [16] V. Chegel, O. Rachkov, A. Lopatynskiy, et al., Gold Nanoparticles Aggregation: Drastic Effect of Cooperative Functionalities in a Single Molecular Conjugate, *J. Phys. Chem. C* 116 (2012) 2683–2690.
- [17] R.B. Merrifield, solid phase peptide synthesis, the synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc* 85 (1963) 2149-2154.
- [18] N.E. Robinson, A.B. Robinson, Use of Merrifield Solid Phase Peptide Synthesis in Investigations of Biological Deamidation of Peptides and Proteins, *Biopolymers, Pept Sci* 90 (2008) 297–306.
- [19] C.T. Mant, et al., HPLC analysis and purification of peptides, in *Peptide*

The effect of Pexiganan as an antimicrobial peptide on the structural stability of gold nanoparticles

Nafiseh Yazdani Cherati¹, Maryam Tabarzad^{*2}, Bahram Daraei³, Bijan Ranjbar^{*1}

1. Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Protein Technology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ranjbarb@modares.ac.ir, m_tabarzad@sbmu.ac.ir

Receipt: 2022/12/07

Accepted: 2023/04/24

Abstract

The study of protein-gold nanoparticles interaction has shown valuable role in medicine, including: drug delivery, vaccine design, biosensors, bioassays, and imaging. Anti-microbial peptides (AMPs) are short amino acid sequences that have important function in the medicinal treatment of multi drug resistant infections. Binding of AMPs to gold nanoparticles (AuNPs) is beneficial for long-term storage, targeted delivery into cells and reduction of drug dosage. This requires preserving the shape and size of the nanoparticles involved in the interaction. In this study, we investigated the interaction of AuNPs in concentration of 2.28×10^{-7} M with three concentrations (0.8, 2, 4 μ M) of the antimicrobial peptide Pexiganan in different volumes (2-100 μ L), in order to study the changes in the shape, charge and size of the particles involved in the interaction by UV-absorption spectroscopy, DLS and transmission electron microscopy (TEM). In all three concentrations, with the increase in peptide concentration resulted from increasing the volume of peptide solution, the surface charge of the particles became more positive and the size of the particles increased, this was observed in the form of a new peak at the values above 600 nm in the absorption spectrum of AuNPs, which is due to the interaction of the amin II group of the amino acid lysine in peptide sequence with the surface of nanoparticles. As a result, the aggregation of AuNPs was observed at higher concentrations of peptide.

Keywords: Gold nanoparticles (AuNPs); antimicrobial peptides (AMPs); interaction of peptide-gold nanoparticles; DLS