تأثیر پپتید ضدمیکروبی پکسی‌گانان بر پایداری ساختاری نانوذرات طلا

نفیسه یزدانی‌چراتی[۱]، مریم تبرزد*[۲]، بهرام دارائی[۳]، بیژن رنجبر*[۱]

۱- گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات فن‌آوری پروتئین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳- دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
٤- گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

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

دریافت: ۱٤۰۱/۰۹/۱٦ پذیرش: ۱٤۰۲/۰۲/۰٤

چکیده

مطالعه برهمکنش پروتئین-نانوذرات طلا اهمیت فراوانی در پزشکی، از جمله انتقال دارو، طراحی واکسن‌ها، زیست سنسورها، سنجش زیستی و تصویربرداری دارد. پپتیدهای ضدمیکروبی (AMPs) توالی‌های کوتاه ا سید آمینه‌ای ه ستند که در درمان دارویی عفونت‌های مقاوم به دارو از اهمیت ویژه‌ای برخوردار ند. برهمکنش این پپتید ها با نانوذرات طلا (AuNPs) مزا یایی 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 می‌با شد. در مطالعه حا ضر، برهمکنش نانوذرات طلا در غلظت $۲/۲۸ \times ۱۰^{-۷}$ مولار با سه غلظت (۰/۸، ۲، ٤) میکرومولار از پکسی‌گانان به‌عنوان یک پپتید ضدمیکروبی با طیف اثر وسیع، در حجم‌های مختلف ۲ تا ۱۰۰میکرولیتر، برای مطالعه تغییرات شکل، بار و اندازه ذرات درگیر در برهمکنش توسط روش های طیف سنجی جذبی-فرابنفش، پراکندگی نور حرکتی (DLS) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) بررسی شد. در هر سه غلظت با افزایش غلظت پپتید که در اثر افزایش حجم محلول پپتیدی ایجاد شد، میزان بار سطحی ذرات مثبت‌تر شد و اندازه ذرات افزایش یافت. این امر به‌صورت ایجاد قله‌ای جدید در مقادیر بالای ٦۰۰ نانومتر در طیف جذبی نانوذرات مشاهده شد که در اثر میانکنش گروه آمین Π (نوع دو) اسیدآمینه لیزین پپتید با سطح نانوذرات و در نتیجه تجمع ذرات در غلظت‌های بالاتر پپتید بود.

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

۱-مقدمه

در سال‌های اخیر با پیشرفت علوم زیستی، کاربردهای مختلفی از پپتیدها به‌عنوان حامل دارو، واکسن، هورمون، نقش رسپتوری و ضد میکروبی توسعه یافته است. امروزه به‌دلیل افزایش مقاومت های آنتی‌بیوتیکی، ضرورت پیشرفت ترکیبات ضد میکروبی به شدت احساس می‌شود [۱]. از جمله این ترکیبات پپتیدهای ضد میکروبی می‌باشند [۲]. یکی از انواع این پپتیدها با خاصیت ضد میکروبی، پپتید پکسی‌گانان یا (MSI-78)، آنالوگ پپتید مگائینین۲ با ترتیب اسیدهای آمینه GIGKFLKKAKKFGKAFVKILKK-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 آنجایی‌که این پپتید، بر طیف وسیعی از باکتری‌ها و سایر ارگانیسم‌های پاتوژن مؤثر عمل می‌کند، در مقایسه با سایر پپتیدها ضد میکروبی در مطالعات داروسازی اهمیت ویژه‌ای دارد [٤]. از جمله بیماری‌هایی که در آن عفونت انواع باکتری‌ها مشاهده می‌شود، زخم پای دیابتی است که نیاز به درمان آنتی‌بیوتیکی با طیف اثر گسترده دارد. یکی از مشکلات درمان زخم‌های دیابتی تشکیل زیست لایه می‌باشد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای باکتری‌های قسمت‌های درونی تر ایجاد می‌کند و نیاز به دوزهای بالاتری از ترکیب ضد میکروبی برای درمان ایجاد می شود [٦و٥]. از سویی دیگر استفاده از پپتیدهای ضدمیکروبی در غلظت بسیار بالا می‌تواند موجب آسیب به سلول‌های یوکاریوتی شود. اتصال به حامل های نانوذره‌ای می‌تواند در رفع این مشکلات مؤثر واقع شده و سبب افزایش نیمه عمر پپتید شود. بدین منظور، سیستم های انتقال دارویی همچون نانو حامل‌ها می‌توانند چنین محدودیت‌هایی را رفع کنند [۹-۷]. گروهی از این ذرات که به‌عنوان نانو حامل کاربرد دارند، نانوذرات طلا هستند. نانو ذرات طلا به‌دلیل نسبت بالای سطح به حجم و سمیّت پایین برای سلول‌های انسانی، مورد مناسبی به‌عنوان حامل‌های دارویی، ژن، پروتئین و آنزیم‌ها به شمار می‌آیند که در درمان‌های فتوترمال و رادیوتراپی حائز اهمیت هستند [۱۰]. تحقیقات نشان دادند که نانوذرات بارمنفی طلا نسبت به بار مثبت سمیّت 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 می‌کنند [۱۲]، تجمع نانوذرات در یکنواخت شدن توزیع و اندازه نانوذرات در محلول تاثیر 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 کوولانسی میان نانوذرات طلا و پپتیدهایی که دارای گروه‌های عاملی آبدوست و آبگریز بودند، متوجه افزایش پایداری نانوذرات درگیر در میانکنش شدند [١٤]، پلگرینو و همکارانش در سال ۲۰۲۱ با مطالعه برهمکنش نانوذرات طلا با چندین توالی الیگوپپتیدی موفق به افزایش پایداری و نگه‌داری طولانی مدت نانوذرات طلا به‌صورت پودر شدند [۱۵]، در حالی‌که، چگل و همکارانش در سال ۲۰۱۱ با بررسی برهمکنش نانوذرات طلا با ترکیبات حاوی اسیدآمینه و گروه‌های تیول متوجه رسوب نانوذرات درگیر در برهمکنش شدند [١٦].در این مطالعه برهمکنش پپتید بار مثبت پکسی‌گانان با نانوذرات بار منفی طلا توسط روش‌های طیف سنجی مرئی-فرابنفش، اندازه‌گیری پتانسیل زتا، پراش دینامیک نور (DLS) و میکروسکوپ الکترونی عبوری(TEM) برای دستیابی به برهمکنش پایدار در pH فیزیولوژیک، در غلظت‌ها و حجم‌های مختلف پپتید پکسی‌گانان بررسی

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــ
مرحله صاف کردن انجام شد تا واکنشگرهای مصرف نشده و محصولات ثانویه محلول در محیط، خارج شوند. سپس، پس از پایان هر مرحله شستشوی رزین توسط حلال‌های DMF و NMP انجام شد. اتصال سایر اسیدهای‌آمینه به زنجیره پپتیدی به روشی مشابه اتصال اولین اسیدآمینه انجام شد. در توالی پکسی‌گانان، اسیدهای‌آمینه لیزین موجود می‌باشد که در طول واکنش، گروه‌های عاملی موجود در شاخه‌های جانبی این اسیدآمینه با گروه (tert-butyl group; tBu) محافظت شده‌اند. پس از پایان مراحل سنتز پپتید بر روی رزین این گروه‌های 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 به‌دست آوردن پپتید خام جدا شده از رزین، مخلوط واکنش فیلتر شد و حجم زیر صافی به کمک گاز نیتروژن به ۳ میلی‌لیتر کاهش یافت و قطره قطره به ۳۰ میلی‌لیتر MTBE سرد اضافه و رسوب سفید رنگ حاصله توسط دستگاه سانتریفوژ (۴۰۰۰ rpm، ۵ دقیقه) جدا شد. رسوب به‌دست آمده در ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل و به مدت دو ساعت در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در نهایت توسط دستگاه لیوفیلایزر خشک شد [۱۸].

۲-۲ تخلیص پپتید ضدمیکروبی

روش مناسب برای تخلیص پپتیدهای سنتزی، preparative HPLC می‌باشد. در این مطالعه از ستون C18, Eurospher ۱۰ میکرومتر و ۱۶×۲۵۰ میلی‌متر برای خالص‌سازی استفاده شد. طول موج مورد استفاده در شناساگر ۲۷۵ نانومتر و فاز متحرک شامل محلول A: که شد تا غلظت مناسبی از پپتید به‌دست آید که در آن شکل و ساختار نانو ذرات طلا پایدار باقی می‌ماند.

۲-مواد و روش‌ها

برای سنتز پپتید پکسی‌گانان:

اسیدهای‌آمینه (گلایسین، آلانین، لوسین، ایزولوسین، لیزین، والین، فنیل‌آلانین)، تریسوپراپیرزالین (TIS)، ان-دی‌متیل‌آمین، پیریدین-ایل‌متیلن، ان-متیل‌متانآمینیوم، هگزافلوروفوسفات ان-اکسید (HATU) خریداری شده از شرکت (جی‌ال- بایوکم؛ چین)، پیپیریدین، ان-متیل پیرولیدون(NMP)، متانول، ایزوپروپانول، استونیتریل، دی کلرومتان (DCM)، ترت-بوتیل متیل اتر (MTBE)، دی‌متیل‌فرمامید (DMF)، ان،ان-دیزوپروپیل‌اتیل‌آمین (DIEA)، استیک‌انیدرید، تری‌فلوروا ستیک اسید (TFA)، استیک اسید، نینهیدرین، فنول خریداری شده از شرکت (مرک؛ آلمان)، برای سنتز بافر و نانوذرات طلا: هیدروکلریدتریس، سدیم‌کلرید، تتراکلورآریک اسید سه‌آبه و سدیم‌سیترات دوآبه (سیگما آلدریچ؛ آمریکا) خریداری شدند، درتمامی محلول سازی‌ها از آب دیونیزه استفاده شد.

۲-۱ سنتز شیمیایی پپتید پکسی‌گانان

سنتز شیمیایی پپتید در فاز جامد به روش مریفیلد انجام شد [۱۷]، از رزین Rink Amid MBHA به‌عنوان بستر جامد استفاده شد. ابتدا ۲۰ میلی‌لیتر حلال DMF با دمیده شدن گاز نیتروژن به داخل راکتور اضافه و به مدت ۵ دقیقه هم‌زده شد. برای محافظت‌زدایی از انتهای گروه آمین اسیدهای‌آمینه، ۱۰ میلی‌لیتر محلول پیپریدین 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 اسیدهای‌آمینه به یکدیگر می‌شود. سپس، به مدت ۳۰ دقیقه با دمیدن نیتروژن هم‌زده شد. پس از هر مرحله اتصال اسیدآمینه،

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

۲-۳ 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 سیترات به روش فرنز [۲۲و۲۱] با اعمال تغییراتی در غلظت هردو نمک انجام شد. به اختصار، به ۲۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه بر روی هم‌زن و حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد، یک سی سی محلول طلا با غلظت ٦/٤ میلی‌مولار اضافه شد، و بعد از حدود ۳ دقیقه یک سی‌سی محلول ٤١/١ میلی‌مولار سدیم سیترات به ارلن اضافه شد. بین ۱۵–۱۸ دقیقه در دور بالای هم‌زن مخلوط شد. رنگ محلول در دقیقه‌های 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 هم‌زده شد.

۲-٤ طیف‌سنجی مرئی–فرابنفش

طیف جذبی نانوذرات سنتز شده قبل و بعد از برهمکنش با پپتید پکسی گانان در محدوده ٤۰۰ تا۷۰۰ نانومتر طیف‌سنج جذبی–فرابنفش توسط دستگاه Cary۱۰۰ (Agilent Technologies؛ آمریکا)بررسی شد. غلظت‌های (۰/۸, ۲, ٤) میکرومولار پپتید در حجم‌های ۱۰۰–۲ میکرولیتر به نمونه نانوذره با چگالی نوری یک افزوده و بررسی شدند. تمامی آزمایشات در بافر هیدروکلرید تریس ٤ میلی‌مولار در حضور نمک سدیم کلراید ٤۰ میلی‌مولار و pH برابر ۷/٤ انجام شد.

۲-۵ تکنیک پراکندگی نور حرکتی (DLS)

برای بررسی اندازه، بار و میزان پراکندگی نانوذرات قبل و بعد از برهمکنش با پپتید، از تکنیک پراکندگی نورحرکتی توسط دستگاه Malvern) Zetasizer Nano ZS؛ انگلستان) استفاده شد.

۲-٦ میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

بررسی دقیق اندازه و شکل نانوذرات قبل و بعد از برهمکنش با پپتید توسط دستگاه میکرو سکوپ 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 میکروپیپت 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 نمونه‌ها formvar carbon-coated grid Cu Mesh 300 (EMS؛ آمریکا) و دستگاه فراصوت (Misonix- S3000؛ آمریکا) بود.

۳- نتایج

۳-۱ تعیین جرم مولکولی پپتید سنتزشده توسط دستگاه LC-Massبه روش الکترواسپری

در سیستم الکترواسپری در مد مثبت، یون‌های پپتیدی حاصل اتصال پروتون به جایگاه‌های بازی قوی در ساختمان پپتید تولید و وارد آنالایزر جرمی می شوند. این جایگاه‌های بازی شامل انتهای آمینی و زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه آرژنین، لیزین و هیستیدین هستند.

جسمی با جرم مولکولی M می‌تواند به صورت‌های $[M + 1H^+]^+$، $[M + 2H^+]^{2+}$، $[M+ 3H^+]^{3+}$ و $[M + 4H^+]^{4+}$ یونیزه شود. هر یک از گونه های فوق گرچه از مولکول های واحدی ساخته شده‌اند، اما دارای نسبت m/z (نسبت جرم

مولکولی به بار) متفاوتی خواهند بود و به همین برای توسط آنالیزر جرمی از یکدیگر تفکیک می‌شوند. پس از سنتز پپتید پکسی‌گانان (وزن مولکولی معادل ۲٤۷٦ دالتون) در فاز جامد، محصول سنتزشده توسط طیف‌سنجی جرمی شناسایی شد (شکل ۱). نسبت m/z (نسبت جرم مولکولی به بار) ۱۲۳۹ به یون دو بار پروتونه ($[M + 2H^{+}]^{2+}$) و ۸۲٦ به یون سه بار پروتونه ($[M + 3H^{+}]^{3+}$) پکسی‌گانان 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 ۲٤۷۷ در طیف قرار ندارد.

۳-۲ 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 سانتی‌متر مکعب)، M وزن اتمی طلا (۱۹۷ گرم بر مول) و D متوسط قطر ذره است که متوسط قطر ذره از طریق داده های میکروسکوپ الکترونی عبوری ۱۳ نانومتر محاسبه شد (شکل A-۲).

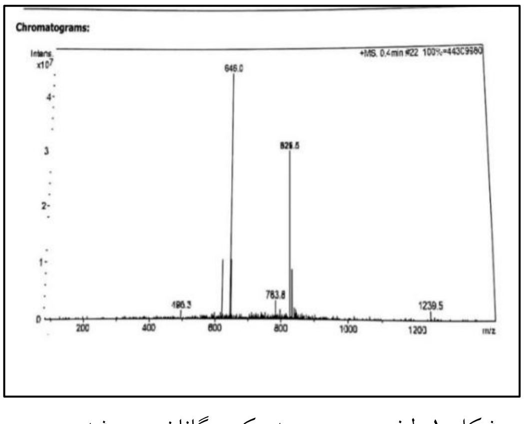
با استفاده از طیف سنجی نشر اتمی، تعداد اتم‌های طلا در یک سی‌سی از محلول نانوذرات طلا محاسبه شد که تحت عنوان N_{total} در معادله ۲ قرارگرفت، و در نهایت طبق معادله ۲ غلظت کلی نانوذرات طلا سنتز شده محاسبه شد [۲٤].

(۲)

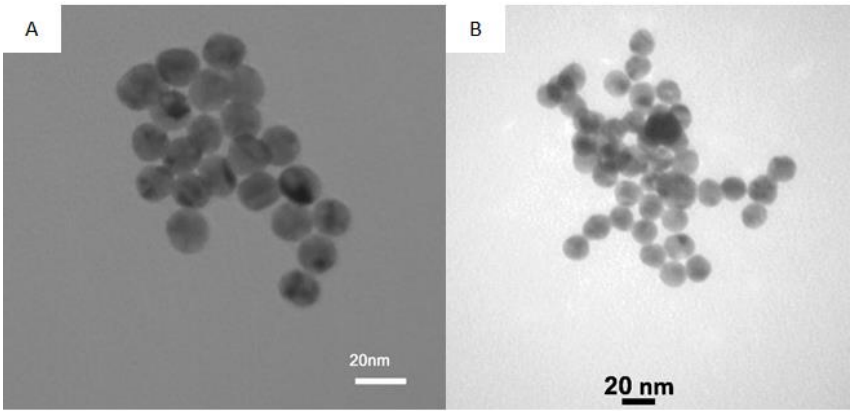
$$C = \frac{N_{total}}{NVN_A}$$

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 $10^{-7} \times$ ۲/۲۸ مولار محاسبه شد.

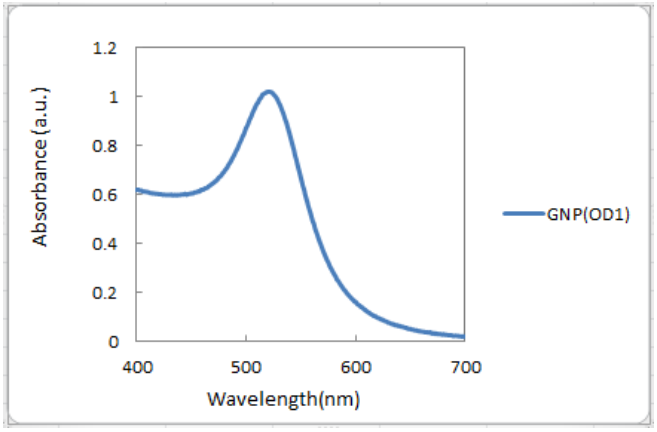
طیف جذبی نانوذره طلا با غلظت $10^{-7} \times$ ۲/۲۸ مولار در نمودار ۱ قابل ملاحظه است، طیف شامل یک قله که نشان دهنده کروی بودن ذرات و با بیشترین جذب نوری در طول موج ۵۱۹ نانومتر، که این طول موج مشخصه ذرات با اندازه ۱۲-۱۵ نانومتر است [۲۵].



شکل ۱ طیف جرمی پپتید پکسی‌گانان سنتز شده



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



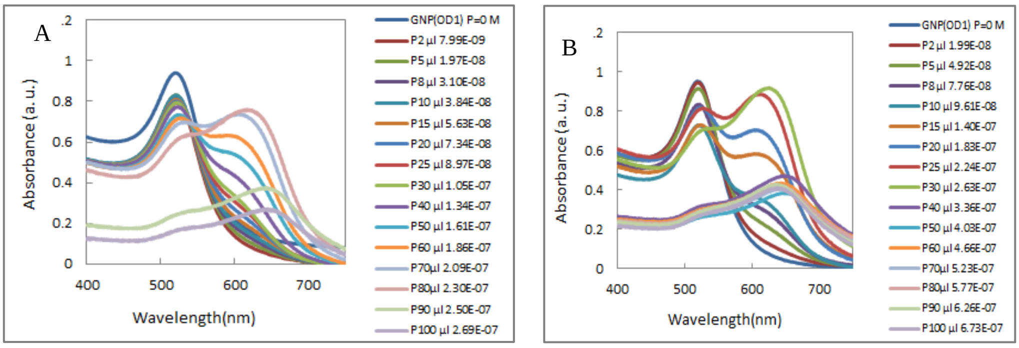
نمودار۱ طیف جذبی نانوذرات طلا سنتز شده به روش اصلاح فرنز در غلظت $۲/۲۸ \times ۱۰^{-۷}$ مولار.

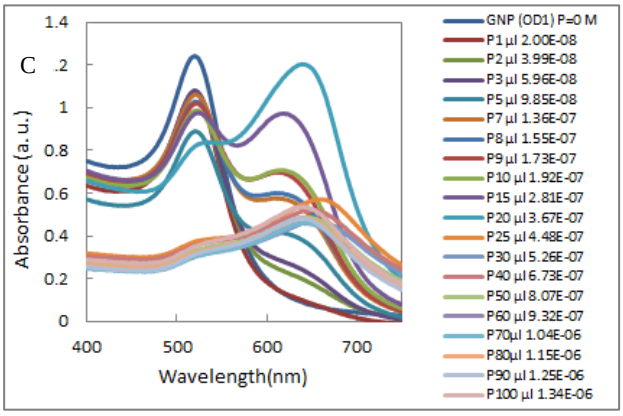
۳-۳ بررسی برهمکنش نانوذرات طلا با پپتید پکسی‌گانان با بررسی طیف ناحیه مرئی-فرابنفش

برهمکنش پپتید پکسی‌گانان در غلظت‌های مورد بررسی با نانوذرات طلا با غلظت $۲/۲۸ \times ۱۰^{-۷}$ مولار در نمودار ۲ نمایش داده شده است. با افزایش حجم محلول پپتیدی 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 موج‌های بالاتر از ۶۰۰ نانومتر شکل گرفت. در پپتید با غلظت ۰/۸ میکرومولار (نمودار A-۲) تغییر شکل در طیف جذبی از حجم ۲۰ میکرولیتر پپتید آغاز شد، در صورتی که این تغییر در مورد پپتید با غلظت ۲ میکرومولار (نمودار B-۲) و ٤ میکرومولار (نمودار C-۲) به ترتیب درحجم‌های ۵ و ۲ میکرولیتر مشاهده شد، به نحوی که با افزایش حجم و در نتیجه، مقدار جرمی پپتید در غلظت اولیه ۰/۸ میکرومولار تا حجم ۷۰ میکرولیتر شاهد طیف دو قله ای با ارتفاع تقریبا یکسان در هر دو قله هستیم

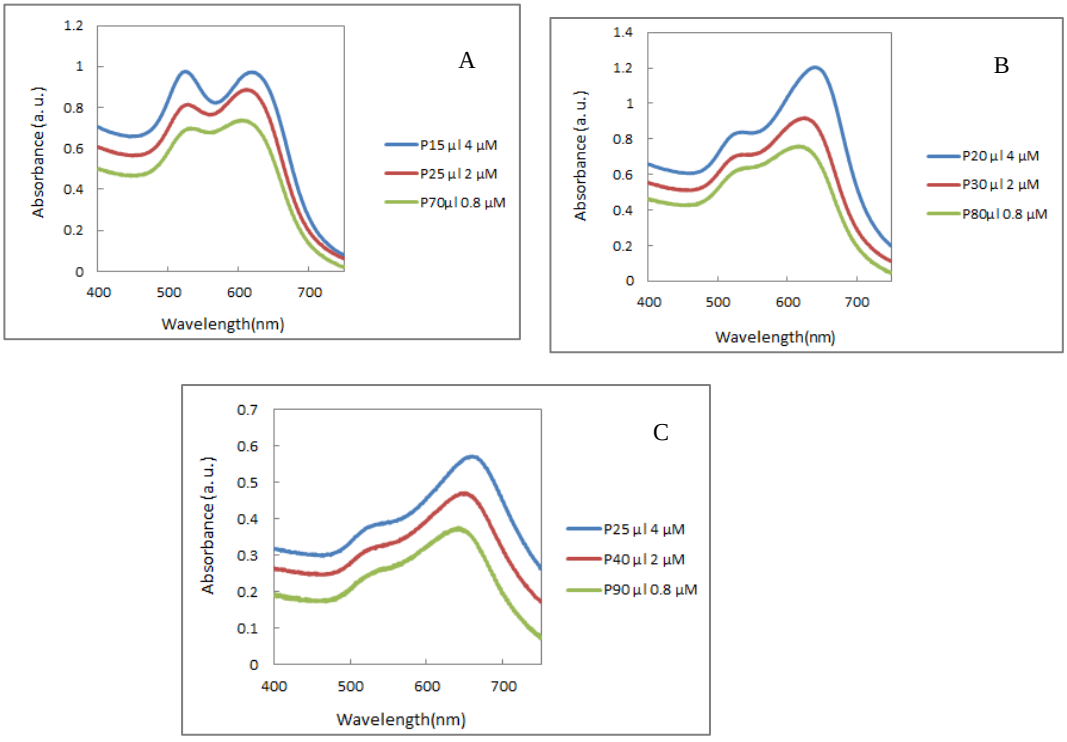
(نمودار A-۳). طیفی با این مشخصات در محلول پپتیدی ۲ و ٤ میکرومولار به ترتیب در حجم‌های ۲۵ و ۱۵ میکرولیتر مشاهده شدند. با افزایش حجم محلول پپتیدی درهر غلظت به تدریج شاهد کاهش قله پیک در ناحیه ۵۱۹ نانومتر و افزایش قله طیف در طول موج های ٦۲۰ نانومتر به بالا می‌باشیم، به نحوی که در غلظت‌های ۰/۸و ۲و ٤ میکرومولار به ترتیب در حجم های ۸۰ و ۳۰ و ۲۰ میکرولیتر از پپتید بیشترین قله طیف در طول موج ٦۳٦ نانومتر به بالا قابل مشاهده است (نمودار B-۳). در حجم‌های بالاتر از هر سه غلظت شاهد کاهش شدید قله در طول موج های بالای ۵۰۰ و ٦۰۰ نانومتر به‌دلیل تجمع نانوذرات طلا می‌باشیم (نمودار C-۳). (شکل ۳) تاثیر حجم‌های یکسان (۳۰ میکرولیتر) از غلظت‌های مختلف پپتید پکسی‌گانان بر تجمع پذیری نانو ذرات طلا را نشان می‌دهد. همانگونه که مشخص است تغییر رنگ در نمونه ۲ نسبت به نمونه یک کمتر از نمونه (۳ و٤) می‌باشد و در نمونه ٤ نانو ذرات تجمع یافته و به سمت رسوب پیش می‌روند؛ درحالی که بهترین برهمکنش با حفظ ساختار ذره در غلظت ۰/۸ میکرومولار ایجاد شد. نمودار ٤ تصویر طیف جذبی برهمکنش ذره-پپتید پکسی‌گانان 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 پپتید نسبت به طیف اصلی نانو ذرات طلا، تغییر کمتری در مقایسه با طیف جذبی ذرات در غلظت‌های ۲ و ٤ میکرومولار پپتید داشته است. از بین این سه غلظت با حجم یکسان بهترین برهمکنش با حفظ ساختار نانوذرات طلا تشکیل داده است.

شکل۳ نمونه (۱) نانوذرات طلا با غلظت $۱۰^{-۷}$ × ۲/۲۸ مولار. نانو ذرات طلا با غلظت $۱۰^{-۷}$ × ۲/۲۸ مولار در حضور: ۳۰ میکرولیتر پپتید پکسی‌گانان با غلظت ۰/۸ میکرومولار نمونه (۲) ، ۳۰ میکرولیتر پپتید پکسی‌گانان با غلظت ۲ میکرومولار نمونه (۳)، ۳۰ میکرولیتر پپتید پکسی‌گانان با غلظت ٤ میکرومولار نمونه (٤).

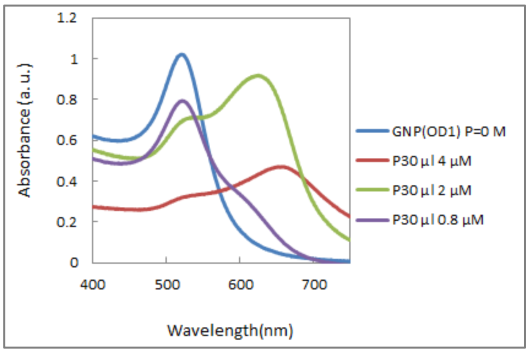




نمودار۲ طیف جذبی نانوذرات طلا در حضور و عدم حضور پپتید پکسی‌گانان، در غلظت $۲/۲۸ \times ۱۰^{-۷}$ مولار ذره: نمودار A غلظت ۰/۸ میکرومولار پپتید پکسی‌گانان از حجم ۱۰۰-۲ میکرولیتر پپتید، نمودار B غلظت ۲ میکرومولار پپتید پکسی‌گانان از حجم ۱۰۰-۲ میکرولیتر پپتید، نمودار C غلظت ٤ میکرومولار پپتید پکسی‌گانان از حجم ۱۰۰-۱ میکرولیتر پپتید.



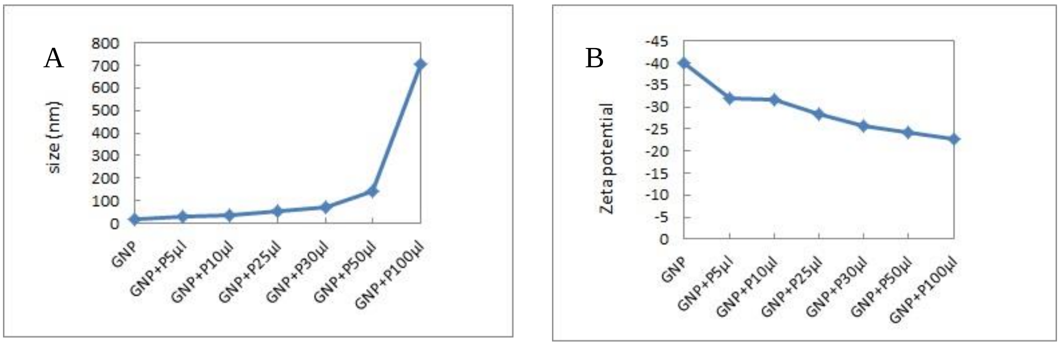
نمودار۳ طیف جذبی نانوذرات طلا ، در غلظت $۲/۲۸ \times ۱۰^{-۷}$ مولار در حضور غلظت‌های مختلف پپتید: نمودار A غلظت‌های (۰/۸, ۲, ٤) میکرومولار به ترتیب در حجم‌های (۱۵،۲۵،۷۰) میکرولیتر، نمودار B غلظت‌های (۰/۸, ۲, ٤) میکرومولار به ترتیب در حجم‌های (۲۰،۳۰،۸۰) میکرولیتر، نمودار C غلظت‌های (۰/۸, ۲, ٤) میکرومولار به ترتیب در حجم‌های (۲۵،٤۰،۹۰) میکرولیتر.



نمودار٤ طیف جذبی نانوذرات طلا در غلظت $10^{-7} \times 2/28$ مولار در حضور ۳۰ میکرولیتر از غلظت‌های (۰/۸, ۲, ٤) میکرومولار پپتید پکسی‌گانان

۳-٤ بررســی برهمکنش نانوذرات طلا با پپتید پکســی گانان به روش DLS

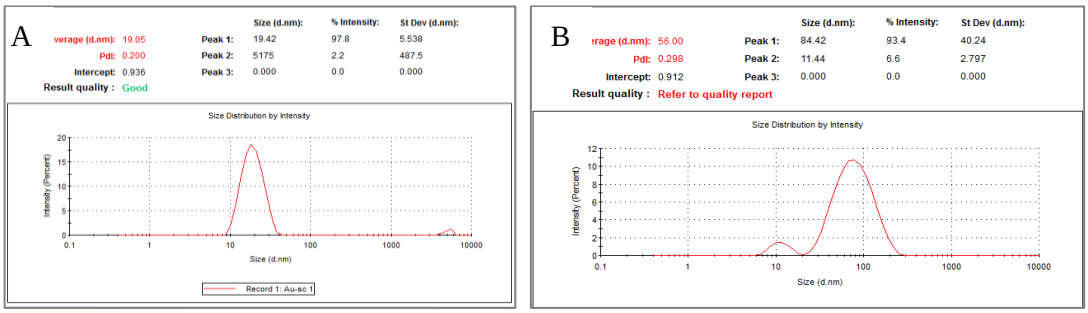
هر چه بارمنفی ســطح نانوذرات افزایش یابد، منجر به افزایش دافعه الکترواستاتیکی بین ذرات می شود، در نتیجه میزان تجمع نـانوذرات کـاهش می‌یـابـد [۱٤]. پپتیـد پکسی‌گانان دارای ۹ اسیدآمینه لیزین است، این اسیدآمینه حاوی گروه آمین نوع Π اســت که از طریق این گروه با نانوذرات طلا برهمکنش می‌دهند و منجر به تشــکیل قله در طول موج های بالاتر از ٦۰۰ نانومتر می‌شــوند؛ این امر منجر به کاهش دافعه الکترواســتاتیکی نانوذرات طلای باردار منفی و در نتیجه تجمع ذرات می‌شــود [۲۷]. برای تأیید این اثر، اندازه و بار نانوذرات طلا قبل و پس از برهمکنش با پپتید توســط روش پراکندگی نور حرکتی (DLS) در یک غلظت از پپتید در غلظت $10^{-7} \times 2/28$ مولار ذره بررســی شــد (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 (-٤۰) میلی‌ولت به (-۲۵) میلی‌ولت کاهش یافت که این کاهش بار منفی سطحی ذره در اثر برهمکنش با گروه های آمین نوع Π ایجاد می‌شود.



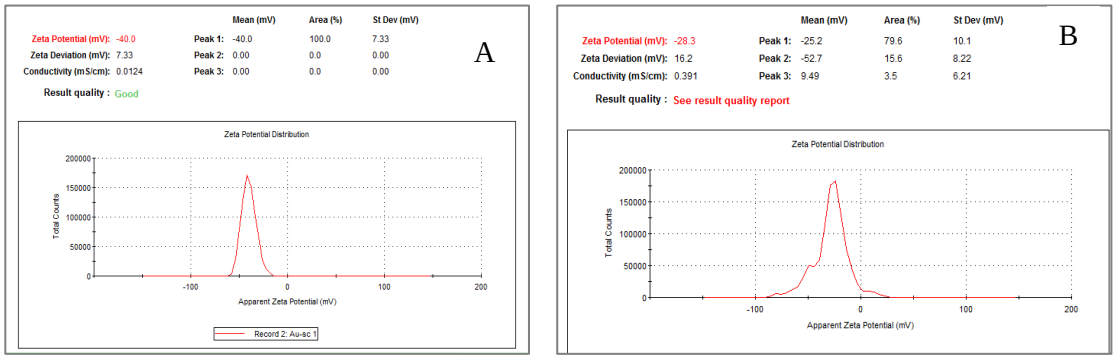
نمودار ۵ نمودار A تغییرات اندازه و نمودار B تغییرات بار سطحی نانوذرات طلا ، در غلظت $10^{-7} \times 2/28$ مولار قبل و پس از برهمکنش با پپتید پکسی‌گانان در غلظت ۲ میکرومولار در حجم‌های (۵،۱۰،۲۵،۳۰،۵۰،۱۰۰) میکرولیتر، توسط دستگاه زتا سایزر مالورن.

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

برای اطمینان از عدم تغییر شکل ذرات از شکل کروی به سایر اشکال درحین برهمکنش و نیز تغییر توزیع اندازه ذرات، تصویر میکرو سکوپ عبوری نانوذرات طلا قبل و پس از برهمکنش با پپتید 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 پپتید (شکل ۲-B) 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 به‌دلیل کاهش بار سطحی ذرات و کاهش دافعه بین آنها است. این پدیده در طیف جذبی نانوذرات طلا در برهمکنش با پپتید به‌صورت دو قله با ارتفاع تقریبا یکسان دیده شد، که پیشتر در (نمودار ۳-A) نمایش داده شد. تغییر توزیع اندازه و بار نانوذرات طلا قبل و پس از برهمکنش با پپتید پکسی گانان در همان غلظت استفاده شده درمیکروسکوپ الکترونی عبوری، توسط روش DLS مورد بررسی مجدد قرار گرفتند. اندازه نانو ذرات که به‌صورت شدت پراش نور نمایش داده شده است از متوسط ۱۹ نانومتر به متوسط ۵۶ نانومتر (شکل ٤) و بار ذرات از منفی ٤٠ میلی‌ولت به منفی ۲۸ میلی‌ولت 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].



شکل ٤ نمودار A اندازه نانوذرات طلا سنتز شده، نمودار B اندازه نانوذرات طلا در حضور ۲۵ میکرولیتر پپتید پکسی‌گانان با غلظت ۲ میکرومولار.



شکل ۵ شکل A بار نانوذرات طلا سنتز شده، شکل B بار نانوذرات طلا در حضور ۲۵ میکرولیتر پپتید پکسی‌گانان با غلظت ۲ میکرومولار.

٤- نتیجه‌گیری

برهمکنش پپتید ضـــدمیکروبی پکســـی‌گانان با نانوذرات کروی طلا باردار منفی به منظور دستیابی به غلظت مناسبی از پپتید با هدف حفظ شـکل و سـاختار نانوذرات طلا در غلظت و حجم‌های مختلف پپتید پکسی‌گانان 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 شـــد، به نحوی که با افزایش حجم به ترتیب شاهد کاهش شدید قله طیف در ناحیه ۵۰۰ نانومتر به بالا و سپس ٦۰۰ نانومتر به بالا هستیم. این امر در نتیجه کاهش دافعه الکتروا ستاتیکی بین ذرات دراثر برهمکنش با گروه‌های آمین نوع Π پپتید اســت. در پپتید با غلظت ۰/۸ میکرومولار منا سب‌ترین برهمکنش تا حجم ٤۰ میکرولیتر قابل م.شاهده ا ست. با افزایش حجم محلول پپتیدی توزیع اندازه ذرات به ســمت ذرات با اندازه بزرگتر پیش می‌رود به نحوی که از حجم ۹۰ میکرولیتر به بعد شـاهد رسـوب کامل ذرات هســـتیم. در غلظت‌های بالاتر پپتید (۲ و ٤ میکرومولار) به ترتیب شـاهد تشـکیل تجمع کامل ذرات درحجم‌های ٤۰ و ۲۵ میکرولیتر به بعد بودیم، به طور کل با افزایش غلظت پپتید میزان رســوب نانوذرات افزایش یافت.

تشکر و قدردانی: مطالعه حاضر در دانشگاه تربیت مدرس انجام شـده اسـت. نویسـندگان از دانشـگاه 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 منافعی وجود ندارد.

سهم نوی سندگان: نفی سه یزدانی چراتی (نوی سنده اول)، نگار نده م قا له/پژوهشـــگر اصـــلی (۵۰٪)؛ مریم تبرزد (نویســـنده دوم)، تحلیلگر داده/بازبینی مقاله (۲۰٪)؛ بهرام دارائی (نویســـنده ســـوم) پژوهشـــگر کمکی (۱۰٪)؛ بیژن رنجبر (نویسنده چهارم)، تحلیلگر داده/بازبینی مقاله (۲۰٪)

منابع مالی: حمایت مالی مطالعه حاضـــر توســـط 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 it's 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. Lopatynskyi, 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 Cherati[1], Maryam Tabarzad[*2], Bahram Daraei[3], 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 benefitable 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 µM) of the antimicrobial peptide Pexiganan in different volumes (2-100µL), 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 Π 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