

بررسی تاثیر پوشش پروتئینی آلبومین بر الگوی کروناي نانولوله‌های کربنی تک‌جداره

فاطمه متقی طلب^۱، مهدی فرخی^{۲*}

۱ استادیار، مرکز تحقیقات نانو فناوری، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲ استادیار، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران



تاریخ دریافت:

۹۸/۰۳/۱۲

تاریخ پذیرش:

۹۸/۰۴/۰۲

چکیده

پوشش پروتئین به عنوان یک استراتژی اصلاح سطح برجسته می‌تواند بر روی آرایش مولکول‌های زیستی در سطح مشترک با نانو مواد تاثیر بگذارند. در این مطالعه، آلبومین سرم انسانی (HSA) برای اصلاح شیمی سطح نانولوله‌های کربنی تک دیواره (SWNTs) و نانولوله‌های کربنی تک دیواره کربوکسیله شده (CO₂-SWNTs) اعمال شدند. این مطالعه برای پی بردن به اثر پوشش پروتئینی بر روی ترکیب پروتئین کرونا و فعالیت بیولوژیکی هر دو نوع SWNT انجام شد. روش‌های مختلفی به منظور مشخصه یابی خواص فیزیوشیمیایی هر دو نوع SWNTs بعد از اصلاح سطحی انجام گرفت. نتایج نشان داد که HSA به دلیل خصوصیات بیولوژیکی و ساختاری منحصر به فرد خود می‌تواند باعث تغییر آرایش مولکول‌های زیستی کروناي SWNTs و CO₂-SWNTs شود. پوشش پروتئین همچنین شدت پلاسمون هر دو نوع SWNTs را تغییر داد که بر روی کارایی برهمکنش آنها با پروتئین‌های موجود در پلازما اثر گذاشت. علاوه بر این، هر دو کروناي SWNTs سمیت و جذب سلولی کمتری را در مقایسه با نمونه‌های بالک نشان دادند. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اصلاح سطحی SWNTs با پروتئین HSA می‌تواند الگوی کرونا را تغییر دهد که متعاقباً بر روی فعالیت بیولوژیکی این نانوذرات تاثیر می‌گذارد.

آلبومین سرم انسانی، نانو لوله‌های کربنی تک‌جداره، الگوی پروتئین کرونا

واژگان کلیدی

Evaluating the effect of albumin protein coating on corona composition of single walled carbon nanotubes

F. Mottaghtalab¹, M. Farokhi^{2,*}

1. Assistant Professor, Faculty Member, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Faculty Member, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

Abstract

Protein coating as an outstanding surface modification strategy can influence the organization of biomolecules in the interface with nanomaterials. In the present study, human serum albumin (HSA) were applied to modify the surface chemistry of single walled carbon nanotubes (SWNTs) and carboxylated SWNTs (CO₂-SWNTs). This study was conducted to discover the effect of protein coating on the protein corona composition and biological activity of both SWNT types. Different methodologies were performed in order to characterize the physicochemical properties of both SWNTs after surface modification. The results showed that HSA followed changed the biomolecular organization of SWNTs and CO₂-SWNTs coronas. Protein coating also changed the plasmon intensity of both SWNT derivatives which affected the efficacy of their interaction with proteins existed in plasma. Moreover, both SWNTs coronas revealed less cytotoxicity and cellular uptake in comparison to bulk samples. It can be concluded that surface modification of SWNTs with different protein can alter the corona pattern that consequently affect the biological behavior of these nanomaterials.

Keywords

Human Serum Albumin, Single Walled Carbon Nanotube, Protein Corona Composition

۱- مقدمه

نانولوله‌های کربنى تک دیواره (SWNTs) نانو مواد کربنى استوانه‌ای هستند که به دلیل نانو ساختار شگفت انگیزشان شهرت قابل توجهی در زمینه نانو پزشکی بدست آورده‌اند [۱]. خواص ویژه SWNTs از قبیل زیست سازگاری مناسب، خواص فیزیکی و شیمیایی خارق العاده و فعالیت زیستی استثنایی، کاربرد آنها را در زمینه داروسازی هدفمند، مهندسی بافت، تصویربرداری زیستی و ... گسترده کرده است [۷-۲]. اخیراً، توجه زیادی به تاثیر شیمی سطح SWNTs بر روی آرایش مولکول‌های زیستی در سطح مشترک نانو لوله-محیط بیولوژیک پرداخته شده‌است. SWNTs توانایی برهمکنش با مولکول‌های زیستی مختلفی از قبیل پروتئین‌ها، اسید نوکلئیک‌ها و ... که بر روی رفتار بیولوژیکی از قبل سمیت سلولی، زیست سازگاری و جذب سلولی اثر می‌گذارد، را دارند [۴، ۸ و ۹]. پیشنهاد شده‌است که ویژگی‌های سطحی SWNTs می‌تواند برهمکنش آنها با ملکول‌های زیستی مختلف را در محیط درون تن دیکته کند. به محض ورود SWNTs به محیط بیولوژیکی، پروتئین کرونا سطحشان را پوشش می‌دهد. از این رو، به نظر می‌رسد که شیمی سطح SWNTs می‌تواند ترکیب پروتئین کرونا که به تبع آن می‌تواند پاسخ‌های سلولی به SWNTs را تعیین کند [۱۶-۱۰].

ترکیب پروتئین کرونا اساساً به بعضی ویژگی‌های نانوذرات از قبیل سایز، بار و پایداری کلئیدی بستگی دارد. به علاوه، ترکیب پروتئین‌های موجود در خون، پلاسما یا سرم و سایر شرایط محیطی از قبیل دما و زمان انکوباسیون می‌تواند بر روی ترکیب پروتئین کرونا تاثیر بگذارد [۲۲-۱۷]. علی‌رغم پیشرفت‌های زیاد در زمینه پروتئین کرونا، رابطه بین ساختار پروتئین کرونا و شیمی سطح نانوذرات کمتر درک شده‌است. بنابراین، در این مطالعه، ما تلاش کردیم تا سطح SWNTs و CO₂-SWNTs را با پروتئین آلبومین سرم انسانی (HSA) (که به طور طبیعی در مایعات بیولوژیکی موجود است)، به منظور ارزیابی تغییرات ترکیب پروتئین کروناى SWNTs و متعاقباً فعالیت بیولوژیکی آنها پوشش دهی اولیه دهیم.

بعضی از مطالعات اثر خصوصیات سطحی نانوذرات را بر روی ترکیب پروتئین کرونا ارزیابی کرده‌اند. به عنوان مثال، آقای مورالز و همکاران گزارش کردند که فیبرینوزن، آپولیوپروتئین و C1q مهمترین پروتئین‌های خون هستند که می‌توانند توسط SWNTs و نانولوله‌های کربنى دو دیواره (DWNTs) جذب شوند [۲۳]. آقای ژانگ و همکاران متوجه شدند که نانولوله‌های کربنى به طور خاصی به سایت‌های کاتالیزتی الفاکسیموتریپسین متصل شده و فعالیت آنزیمی آن را تنظیم می‌کنند [۲۴]. همچنین گزارش شده‌است که مسیرهای کمپلمان کلاسیک C1q و جایگزین C3b به وسیله SWNTs پوشش داده‌شده با آلبومین می‌تواند فعال شوند [۲۵].

در یک مطالعه دیگر، نشان داده‌شد که پوشش SWNTs با amino-PEG و methoxy-PEG توانایی این نانومواد را در افزایش سطح

C4d و SC5b-9 (دو محصول کمپلمان) و در نتیجه سیستم کمپلمان فعال شده را افزایش می‌دهد [۲۶]. بنابراین، تغییر ویژگی‌های سطحی نانولوله‌های کربنى نه تنها موجب بهبود برهمکنش با مولکول‌های زیستی می‌شود همچنین می‌تواند بر روی سمیت سلولی شان اثر بگذارد. ما در مطالعه قبلی نشان دادیم که اتصال الکترواستاتیک بین SWNTs-CO₂ و فیبرونکتین می‌توانست خواص بیولوژیکی SWNTs از جمله آب دوستی و زیست سازگاری را بهبود دهد [۲۷]. در اینجا، ما از SWNTs و CO₂-SWNTs پوشش داده شده با آلبومین سرم انسانی برای ارزیابی اثر آن بر روی سمیت سلولی و ترکیب پروتئین‌های کرونا استفاده کردیم. ما پیشنهاد دادیم که آلبومین سرم انسانی به عنوان یکی از اصلی‌ترین اجزاء پلاسماى خون ممکن است بر روی ترکیب پروتئین کروناى SWNTs اثر بگذارد. علاوه بر این، ما فرض کردیم که پوشش هر دو نوع SWNTs با آلبومین سرم انسانی می‌تواند ویژگی‌های سطحی SWNTs را تغییر دهد و بنابراین می‌تواند بر روی جایگزینی ترکیب پروتئین کرونا اثر داشته باشد. تاکنون، تعداد مطالعات کمی بر روی ترکیب پروتئین کروناى نانولوله‌های کربنى انجام شده‌است، به هر حال اثر پوشش پروتئین بر روی ترکیب پروتئین کروناى SWNTs هنوز گزارش نشده‌است. در این مطالعه، یک مقایسه بین ترکیب پروتئین کروناى SWNTs (عامل دار شده یا عامل دار نشده) پوشش داده شده با آلبومین سرم انسانی انجام گرفت. به علاوه، اثر پوشش پروتئینی بر روی سمیت سلولی و جذب سلولی هر دو نوع SWNTs نیز ارزیابی شد. برای حل این فرضیه، روش‌های آنالیز مختلفی شامل میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، تشدید پلاسماى سطحی محلی (LSPR)، ژل الکتروفورز پلی‌اکریل آمید (SDS-PAGE)، اسپکتروسکوپی جرمی، ارزیابی MTT و جذب سلولی با استفاده میکروسکوپ روبشی فلورسانس کانفو کال (CFSM) و فلوسایتومتری انجام شد.

۲- بخش تجربی

۲-۱- تهیه نمونه

در ابتدا، ۰/۰۱ g از هر SWNTs (SWNT و CO₂-SWNT)، شرکت نوترینو، ایران) به محلول ۱ w/w % sodium tetrachloroaurate (سیگما) اضافه شد و برای تهیه محلول هموزن به مدت یک ساعت سونیک (قدرت: ۶۰ هرتز، ۵ دقیقه روشن و ۵ دقیقه خاموش) شد. سپس، مقدار ۰/۳ mg/ml آلبومین سرم انسانی (سیگما) با هر دو نوع از محلول SWNT به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شد. بنابراین، ۴ گروه مختلف به شرح زیر در نظر گرفته شد: SWNT توده، SWNT اصلاح شده با آلبومین (HSA@ SWNT)، CO₂-SWNT و CO₂-SWNT اصلاح شده با آلبومین (HSA@ CO₂-SWNT).

۲-۲- تشکیل کروناي سخت

برای تشکیل کروناي سخت، تمام نمونه‌ها با ۱۰۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس نمونه‌های انکوبه شده به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و در ادامه به وسیله محلول نمک فسفات با خاصیت بافری (PBS, sigma) شستشو و مجدداً معلق (resuspension) شدند. مرحله سانتریفیوژ سه بار تکرار شد و سوسپانسیون‌ها باقی مانده برای آنالیزهای بعدی استفاده شدند.

۲-۳- خصوصیت شناسی

۲-۳-۱- میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

آنالیز TEM برای ارزیابی ساختار پروتئین پوشش داده شده بر روی SWNTs قبل و بعد از تشکیل کرونا انجام گرفت. نمونه‌های سوسپانسیون شده بر طبق پروتکل استاندارد تهیه شدند. سپس نمونه‌ها با استفاده از TEM (zeiss, EM900) ارزیابی شدند.

۲-۳-۲- ارزیابی برهمکنش نانوذرات طلا برچسب شده با پروتئین‌های سرم (AuNPS-labeled serum proteins) با نمونه‌ها

تشدید پلاسمون سطحی محلی (LSPR, Nanomabna Iranian.) به عنوان سنسور زیستی نانو برای تشخیص برهمکنش بین نانوذرات طلا برچسب شده با پروتئین‌های سرم (نانوذرات طلا، سایز: ۱۰ nm، Nanomabna Iranian com- pany) و نمونه‌های تهیه شده استفاده گردید. جنبه مهم در استفاده از این روش تعیین اینکه آیا نانوذرات طلا برچسب شده با پروتئین‌های سرم توانستند به طور مستقیم با SWNTs برهمکنش کنند یا به صورت غیر مستقیم به نمونه‌های SWNT اصلاح شده با آلبومین جذب شده اند. به علاوه، تاثیر ویژگی‌های سطحی SWNTs بر روی تشکیل کرونا نیز ارزیابی شد. گزارش شده است که شیمی سطح نانو ذرات طلا، به عنوان عامل سنسور، به وسیله بار منفی گروه‌های عامل داری مانند O و OH که سایت‌هایی برای برهمکنش الکترواستاتیک با پروتئین‌های سرم هستند احاطه شده است. در نتیجه، نانوذرات طلا در FBS انکوبه شدند و sputtered on sterile coverslips و FBS/AuNPs به عنوان عامل سنسور در نظر گرفته شدند. سپس تمام نمونه‌ها به طور جداگانه بر روی سنسور FBS/AuNPs بارگیری شدند. در پایان، LSPR در حالت انتقال به منظور آنالیز برهمکنش بین نانوذرات طلا برچسب شده با پروتئین‌های سرم با نمونه‌ها انجام شد.

۲-۳-۳- ارزیابی ساختار کروناي سخت

جذب پروتئین‌های سرم بر روی سطح نانومواد نقش مهمی را در برهمکنش‌شان با مواد زنده ایفا می‌کند. در این مطالعه، SDS-

PAGE برای مشخص کردن ترکیب پروتئین کروناي سخت تشکیل شده اطراف ۴ گروه مختلف انجام شد. به این منظور، نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در FBS انکوبه شدند و کمپلکس‌های پروتئینی پیوند داده شده از پلاسماي اضافی به وسیله سانتریفیوژ جدا شدند و به وسیله شستشوی زیاد پروتئین‌های غیر پیوندی حذف شدند. سپس، کسرهای پیوندی (bound fractions) به وسیله SDS-PAGE آشکار شد. سپس کروماتوگرافی مایع- طیف سنجی جرمی دوگانه به منظور تعیین کمی مقادیر پروتئین‌های مربوط با کروناي SWNTs (توده و کربوکسیله شده) انجام شد. درصد نرمال شده از شمارش طیفی SpC با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$(SpC)k = \frac{\left(\frac{SpC}{(Mw)k}\right)}{\sum_{i=1}^n \left(\frac{SpC}{(Mw)i}\right)} \times 100 \quad (1)$$

۲-۳-۴- ارزیابی سمیت سلولی

ارزیابی MTT برای تعیین حیات سلولی قبل و بعد از انکوبه کردن نمونه‌ها با FBS انجام گرفت. بعد از استریل کردن نمونه‌ها با استفاده از نور فرابنفش (UV) به مدت ۴۵ دقیقه، آنها در پلیت کشت ۱۲ خانه قرار داده شدند و سپس ۲×۱۰^۴ سلول U373-MG (بانک سلولی ایران) در هر خانه کشت و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵٪ برای ۲۴ ساعت نگه‌داری شدند. سپس محیط کشت (DMEM/10%FBS) حذف شد و سلول‌ها با محلول MTT (۰/۵ mg/ml) به مدت ۴ ساعت رنگ‌آمیزی شدند. تشکیل شده در ایزوپروپانول به مدت ۱۵ دقیقه حل و جذب در ۵۷۰ nm خوانده شد. ظرف کشت پلی استایرن (TPS) به عنوان گروه کنترل منفی استفاده شد.

۲-۳-۵- جذب سلولی

میکروسکوپ روبشی فلورسانس کانفوکال برای ارزیابی جذب سلولی نانومواد با ویژگی‌های سطحی مختلف انجام گرفت. به طور خلاصه، سلول‌های U373-MG تحت CO₂ ۵٪ و رطوبت نسبی ۹۵٪ در دمای ۳۷ درجه کشت شدند. سپس به سلول‌ها برای چسبندگی به شیشه cover slip در پلیت ۶ خانه برای مدت ۲۴ ساعت اجازه داده شد. سپس، محیط کشت حذف شد و سلول‌ها در ۱۰۰ μg/ml کومارین به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. سپس، نمونه‌ها ۳ بار با PBS شستشو و به منظور رنگ‌آمیزی هسته در DAPI به مدت ۵ دقیقه انکوبه و مجدداً با PBS شستشو شدند. سپس سلول‌ها با فرمالدهاید ۴٪ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ثابت و به وسیله CFMS آنالیز شدند.

اگر چه در شکل B، یک لایه از پروتئین‌ها، ساختار پوششی اولیه پروتئینی SWNTs را پوشش داده‌اند که تشکیل پروتئین کرونا اطراف SWNTs را نشان می‌دهد. باندل‌های SWNTs به صورت مرکز تیره در این تصویر قابل مشاهده هستند که توسط لایه روشنی که بیانگر وجود پروتئین کروناست پوشیده شده‌اند [۲۹-۳۲].

۳-۲- برهمکنش نانوذرات طلا برچسب شده با پروتئین‌های سرم با SWNTs

LSPR اطلاعات ارزشمند درباره برهمکنش بین پروتئین‌های سرم برچسب شده با هر دو دسته SWNT (اصلاح شده یا اصلاح نشده) را آشکار کرد. یک مقایسه کلی بین شدت پلاسمون SWNTs و SWNTs-CO₂ نشان داد که SWNTs عامل دار نشده، خواه دارای پوشش اولیه با پروتئین یا بدون پوشش اولیه، دارای شدت پلاسمون کمتری (نشان دهنده برهمکنش بیشتر با نانوذرات طلا برچسب شده با پروتئین‌های سرم) هستند (شکل ۲). شدت پلاسمون SWNT توده از HSA@SWNT کمتر بود. در نمونه‌های CO₂-SWNT، شدت پلاسمون کمتر و تقریباً مساوی با HSA@SWNT را نشان داد و اما شدت پلاسمون CO₂-

۲-۳-۶- بررسی کمی میزان ورود نانوذرات به داخل سلول برای اندازه‌گیری کمی جذب سلولی SWNTs، سلول‌های U373-MG تحت شرایط بهینه کشت شدند. SWNTs با کومارین برچسب دار شدند و سپس به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. آزمایش تحت محیط کشت بدون سرم و 10% FBS DMEM انجام شد. سپس نمونه‌ها در معرض فلوسایتومتری (BD LSR II analyzer with 575/26 bandpass filter) قرار گرفتند.

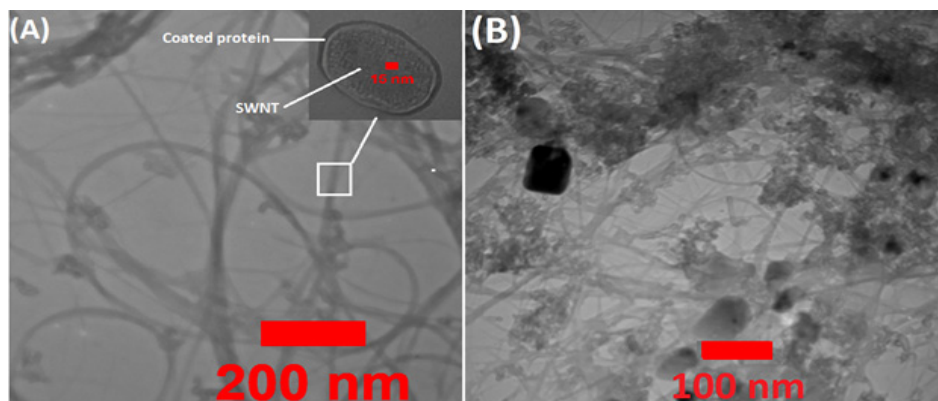
۲-۳-۷- آنالیز آماری

مقایسه‌های آماری با استفاده از تکنیک on-way ANOVA با نرم‌افزار SPSS 16.0 برای ارزیابی متغیرات آماری انجام گرفتند. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری چشمگیر در نظر گرفته شدند.

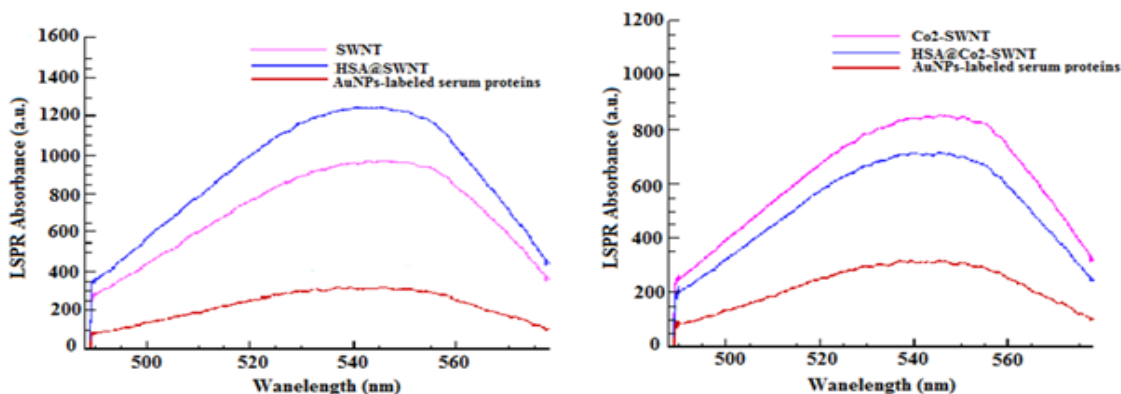
۳- نتایج

۳-۱- میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

میکروگراف‌های TEM دسته‌های SWNTs با ساختار یکنواخت را نشان داد همان‌طور که به طور واضح در شکل A۱، یک هسته تاریک پوشش داده شده با لایه روشن پروتئین‌ها مشاهده می‌شود.



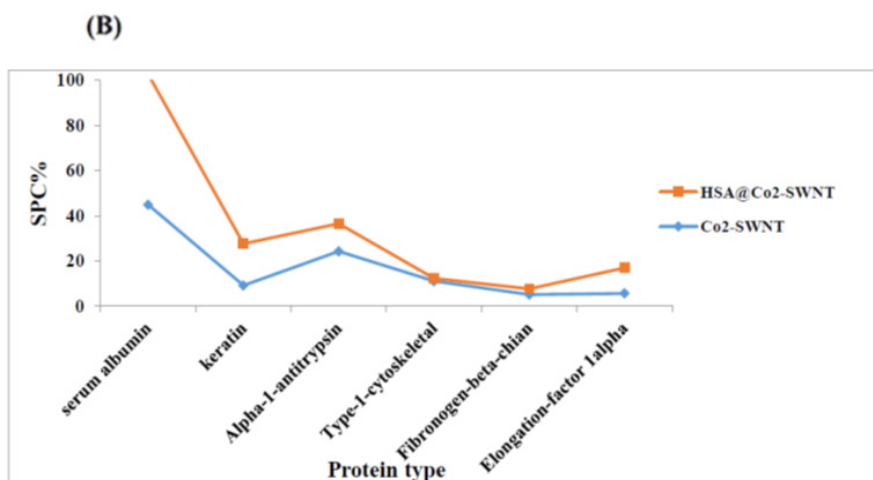
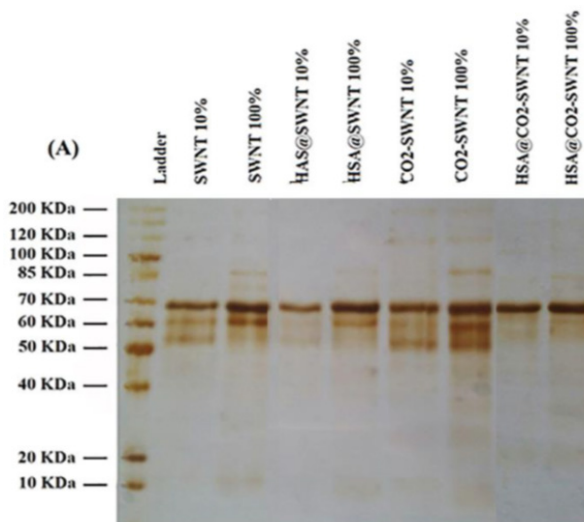
شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از (A) ساختار core-shell نانولوله‌های کربنی پوشیده شده از پروتئین قبل از تشکیل پروتئین کرونا، (B) ساختار نانولوله‌های کربنی پوشیده شده از پروتئین بعد از تشکیل پروتئین کرونا.



شکل ۲: طیف LSPR از چپ حسگر FBS نشاندار شده با نانوذرات طلا در حضور SWNT و CO₂-SWNT.

SWNT بالک و فعال شده با پروتئین های سرم و متعاقبا ارزیابی تاثیر آن بر الگوی پروتئین کرونا از روش LSPR استفاده شد. بدین منظور، نانوذرات طلا متصل شده به پروتئین های سرم به عنوان حسگر مورد استفاده قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده، پلاسمون رزونانس سطحی SWNT بیشتر از CO_2 -SWNT بود که طبق انتظار موید تمایل بالاتر پروتئین های سرم به SWNT فعال شده بود. همانگونه که قبلا نیز به آن اشاره شد، SWNT فعال شده تمایل بالاتری برای اتصال به سایر بیومولکول ها دارد. در هر دو گروه توده و فعال شده نانولوله های کربنی، پس از افزایش آلبومین پلاسمون رزونانس سطحی نیز افزایش پیدا کرده بود که ناشی از تمایل کمتر پروتئین های سرم با SWNT بوده است. در مطالعه مشابهی که توسط Lee و همکاران انجام شد، از SPR برای بررسی میانکنش بین CNT و اریتروپوئینین انسانی (EPO) و GM-CSF استفاده شد. بر اساس این مطالعه، SPR روشی توانمند برای حس کردن پروتئین های مختلف در محدوده دینامیکی (0.1-1000 ng/ml) معرفی شده است [۳۸]. همچنین در مطالعه دیگری، Cedervall و

SWNT از دیگر نمونه های عامل دار SWNT بیشتر بود. این مشاهدات پیشنهاد می دهد که شدت پلاسمون زیادتر در نمونه های حاوی HSA و SWNTs توده (عامل دار شده یا عامل دار نشده) با برهمکنش بیشتر با پروتئین های سرم برچسب دار شده مطابقت داشت. در مطالعات نشان داده شد که فعال سازی SWNTs با استفاده از گروه های آمین و کربوکسیل می تواند باعث کاهش سمیت سلولی آنها و افزایش قدرت اندرکنش آنها با سایر بیومولکول ها گردد [۳۳، ۳۴]. به همین دلیل، به نظر می رسد که SWNTs فعال شده توانایی بالاتری در اتصال به پروتئین های سرم دارند. به طور کلی، میانکنش بین نانومواد و بیومولکول ها یکی از کلیدی ترین مراحل به راه انداختن مجموعه ای از پروسه های بیولوژیکی می باشد. پارامترهای مختلفی از جمله پراکندگی هموزن، جذب رقابتی، شرایط آزمایشگاهی، اصلاح سطحی و ساختار شیمیایی می توانند بر کیفیت اندرکنش SWNT با سایر بیومولکول ها تاثیر گذار باشند [۳۵، ۳۶]. LSPR روشی قدرتمند برای بررسی میانکنش بین SWNT و بیومولکول های دیگر محسوب می شود [۳۶، ۳۷]. در این مطالعه، به منظور بررسی میانکنش بین



شکل ۳: (A) SDS-PAGE از نانولوله های کربنی بالک و فعال شده با کربوکسیل که به همراه FBS ۱۰۰٪ انکوبه شدند، (B) آنالیز Mass برای تعیین فراوانی پروتئین های جذب شده بر روی نمونه ها.

جدول ۱: آنالیز Mass از میزان فراوانی پروتئین‌های جذب شده قبل و بعد از اصلاح سطحی با آلبومین .

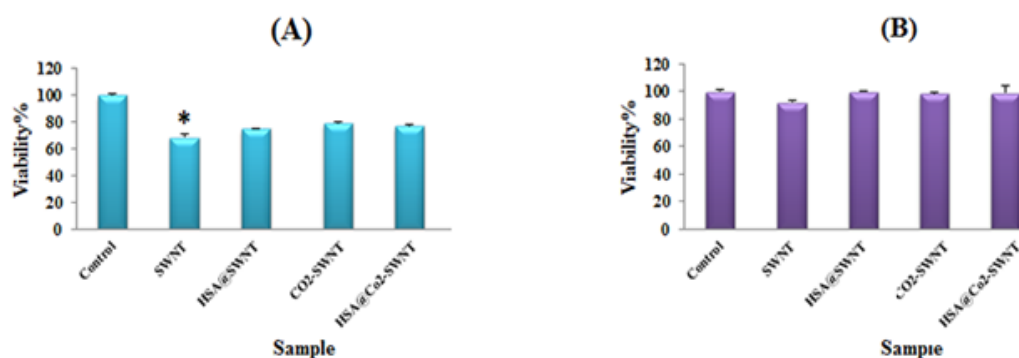
MW [kDa]	Protein identity	CO ₂ -SWNT NSpC	HSA@ CO ₂ -SWNT NSpC
69.321	Serum albumin	0.15	0.1
262.46	Fibronectin	0.04	0.03
65.999	Keratin, type II cytoskeletal	0.09	0.05
36.083	Ig gamma-1 chain C region	0.05	0.06
62.027	Keratin, type I cytoskeletal	0.03	0.008
46.707	Alpha-1-antitrypsin	0.08	0.06
187.03	Complement C3	0.01	0.02
41.26	Ig gamma-3 chain C region	0.02	0.03
65.393	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	0.01	0.008
121.286	POTE ankyrin domain family member	0.008	0.01
77.014	Serotransferrin	0.02	0.005
51.236	Keratin, type I cytoskeletal	0.03	0.007
123.722	Vinculin	0.008	0.06
13.218	Ig heavy chain V-III region	0.07	0.05
55.892	Fibrinogen beta chain	0.01	0.01
13.464	Ig heavy chain V-III region	0.07	0.01
17.953	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	0.05	0.01
39.3	Alpha-2-HS-glycoprotein	0.02	0.02
50.438	Elongation factor 1-alpha 2	0.01	0.004
72.288	78 kDa glucose-regulated protein	0.01	0.08
16.263	40S ribosomal protein S14	0.06	0.01
90.344	RAS guanyl-releasing protein 1	0.01	0.003
11.287	Ig lambda-2 chain C regions	0.08	0.01
241.202	Isoform 13 of Dysferlin	0.004	0.01
12.066	Tumor suppressor candidate 2	0.08	0.01
306.148	Isoform 4 of Probable helicase senataxin	0.01	0.01
89.622	Cullin-1	0.003	0.01
78.132	Lactotransferrin	0.01	0.005
58.792	Keratin, type I cytoskeletal 10	0.01	0.006
514.512	Dynein heavy chain 10	0.007	0.001
156.179	Kinectin	0.01	0.01

عامل دار شده و عامل دار نشده است. دیگر پروتئین‌های سرم از قبیل مهار کننده پروتئاز پلاسما C، transthyretin، آپولیپو پروتئین آلفا-۱ تمایل مشابه‌ای به تمام نمونه‌ها داشتند و تمایز چشمگیری بین گروه‌های مختلف مشاهده نشد. همچنین کراتین، آلفا-۱-آنتی تریپسین، نوع-۱-اسکت سلولی، زنجیر بتا فیبرینوژن و -elonga tion factor 1-alpha تمایل بیشتری به نمونه‌های عامل دار شده داشتند. علاوه بر این، آنالیز LC/MS/MS به منظور تعیین کمی ترکیب کرونا‌ی نمونه‌ها انجام شد. جدول ۱ درصد نرمالیزه شدن (%SpC) پروتئین‌های تشخیص داده شده به وسیله LC/MS/MS را در کرونا‌های SWNTs عامل دار شده قبل و بعد از پوشش HSA را نشان می‌دهد. همچنین %SPC فراوان‌ترین پروتئین‌ها در پروتئین کرونا‌های نمونه‌های CO₂-SWNT در شکل ۳B ارائه شده است.

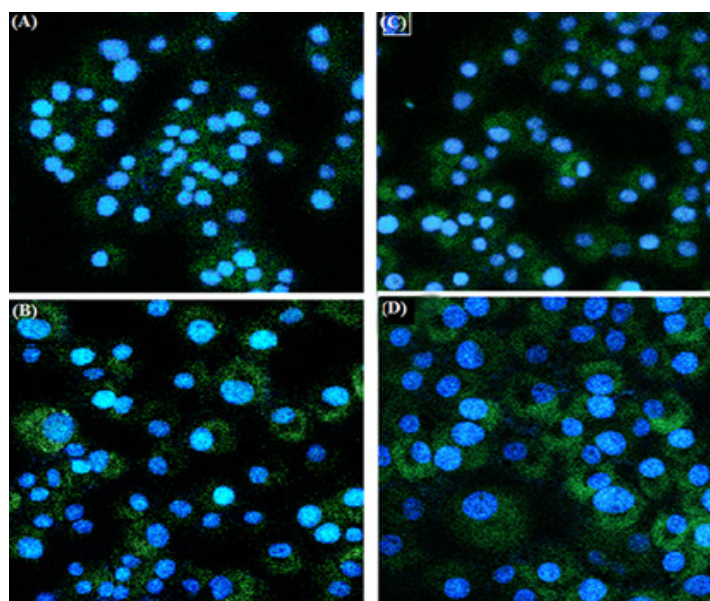
همکاران از SPR برای ارزیابی میزان قدرت تفکیک پذیری و عدم قدرت تفکیک پذیری پروتئین‌های از نانوذرات استفاده شد. آنها مدعی شدند که SPR می‌تواند روشی توانمند برای بررسی میانکنش بین نانوذرات و پروتئین‌های محسوب شود [۳۹].

۳-۳- ارزیابی ترکیبات کرونا‌ی سخت

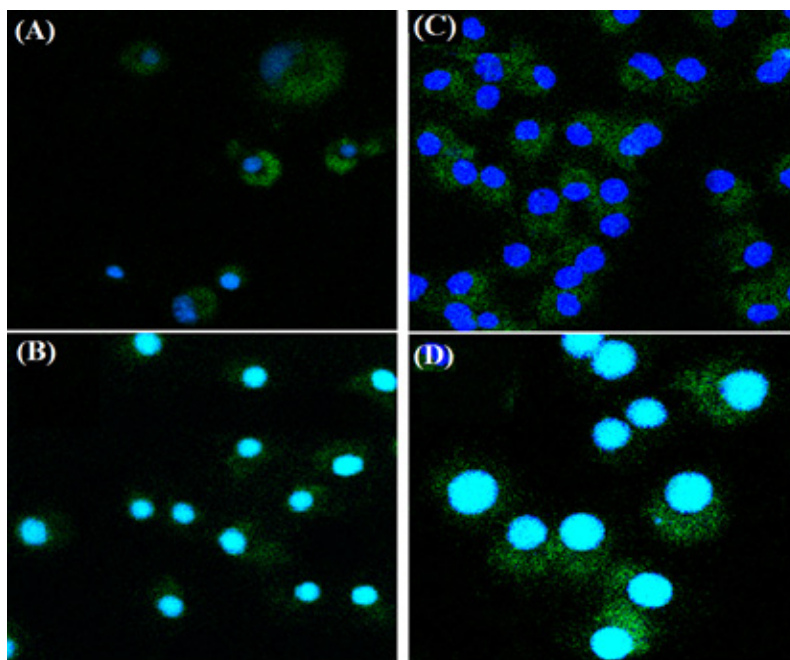
SDS-PAGE برای ارزیابی تمایل پیوند پروتئین‌های سرم با SWNTs عامل دار شده و عامل دار نشده مورد استفاده قرار گرفت. همانطور که بطور واضح در شکل ۳A نشان داده شده است، آلبومین (۷۰ KDa) فراوان‌ترین پروتئین بود که به تمام نمونه‌ها با تغییر کمی تمایل داشت. همچنین آنالیز LC/MS/MS نشان داد که IgG دارای تمایل بیشتر به HSA@SWNT و تمایل کمتر به SWNTs



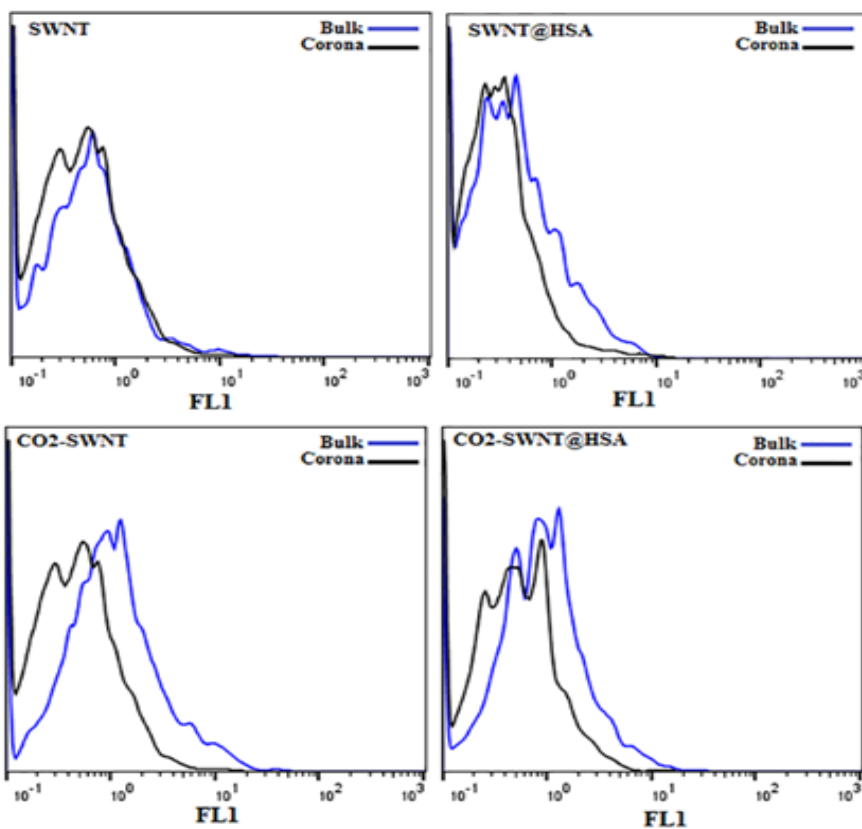
شکل ۴: میزان زیست‌پذیری نمونه‌ها: (A) قبل از تشکیل کرونا، (B) بعد از تشکیل کرونا.



شکل ۵: میزان جذب سلولی قبل از تشکیل کرونا: (A) bulk SWNT، (B) HSA@SWNT، (C) CO₂-SWNT، (D) HSA@CO₂-SWNT



شکل ۶: میزان جذب سلولی بعد از تشکیل کرونا: (A) bulk SWNT (B) HSA@SWNT (C) CO₂-SWNT (D) HSA@CO₂-SWNT. پروتئین کرونا.



شکل ۷: بررسی کمی میزان جذب سلولی نمونه‌ها با استفاده از فلوسیتومتری.

۳-۶- بررسی کمی میزان ورود نانوذرات به داخل سلول با استفاده از فلوسایتومتری

مشخص است که پوشش نانومواد با مولکول های مختلف از قبیل پروتئین ها می تواند جذب کروناای نانو مواد را کاهش دهد. شکل ۷ کاهش کمی جذب کروناهای SWNTs و CO₂-SWNTs پیش پوشش داده شده به وسیله آلبومین را نشان داد. به هر حال، مقادیر کمی جذب کروناای SWNTs قبل از پوشش پروتئینی بیشتر از SWNTs توده بود. نتایج بدست آمده از فلوسایتومتری این نتایج بدست آمده از میکروسکوپ کانفوکال را تایید کردند. در مطالعه ای نشان داده شده بود که فعال سازی SWNTs می تواند در افزایش جذب سلولی این نانومواد موثر باشد ولی تشکیل کرونا نمی تواند تاثیری در کاهش سمیت سلولی آنها داشته باشد [۴۱]. در مطالعه حاضر، از آنجایی که پس از تشکیل کرونا، موتیف های فعال آلبومین از دسترس خارج شده بودند، به همین دلیل میزان ورود به سلول کاهش پیدا کرد. در نهایت، به نظر می رسد که تشکیل کرونا می تواند تغییراتی را در خواص زیستی SWNTs ایجاد کند. لازم به ذکر است که نوع پروتئین هایی که برای اصلاح سطحی SWNTs توده و فعال شده مورد استفاده قرار می گیرد تاثیر بسزایی را در تعیین الگوی تشکیل کرونا و متعاقبا خواص زیستی SWNTs خواهد داشت.

۴- نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، از پروتئین آلبومین برای اصلاح سطحی نانولوله های کربنی تک جداره عامل دار شده و عامل دار نشده استفاده شد تا بدین منظور تاثیر پوشش پروتئینی در تغییر الگوی کروناای نانو لوله های کربنی مورد بررسی قرار گیرد. نتایج به دست آمده موید آن هستند که پروتئین آلبومین با بهینه سازی الگوی کروناای نانولوله های کربنی می تواند نه تنها نقش موثری افزایش خواص بیولوژیکی و کاهش سمیت این نانوذرات دارد بلکه ورود آنها به داخل سلول را نیز تسهیل می کند. بنابراین، به نظر می رسد که بتوان با پوشش دهی پروتئینی سطح نانوذرات انتقال آنها به داخل سلول را القا کرد بدون اینکه تاثیر به سزایی در خواص ذاتی نانوذرات به دلیل تشکیل کرونا در محیط درون تن داشته باشد.

تقدیر و قدردانی

بدینوسیله از بانک سلولی ایران به دلیل ارائه خدمات و تامین هزینه های مربوط به طرح تشکر و قدردانی می گردد.

به طور کلی، سرم حاوی پروتئین های مختلف با هیدروفوبیسیته و هیدروفیلیسیته متفاوت می باشد [۲۷]. بنابراین، منطقی است که تصور کنیم تمایل پروتئین های سرم به SWNT متفاوت می باشد. به طور معمول، رابطه مستقیمی بین تمایل پروتئین های سرم به نانوذرات و میزان فراوانی آنها وجود دارد. بر اساس مطالعات انجام شده مشخص شده که SWNT که توسط آلبومین اصلاح سطح شده تمایل بیشتری برای میانکنش با IgG دارد که این امر می تواند ناشی از اندازه بزرگ IgG، اندازه کوچک آلبومین و ماهیت هیدروفوب SWNT نشات می گیرد [۴۰، ۲۴].

واضح است که ترکیب کرونا هر یک از نمونه ها شامل مقادیر متفاوتی از پروتئین های سرم می باشد. به عنوان مثال، SpC% آلبومین، کراتین، elongation factor 1-alpha سرم در کرونا HSA@SWNT بیشتر بودند در صورتیکه SpC% آلفا-۱-آنتی تریپسین، نوع-۱-اسکلت سلولی و فیبرینوژن-بتا-زنجیر در کروناهای CO₂-SWNT بیشتر بودند. باید توجه کرد که LC/MS/MS تنها برای نمونه های SWNTs عامل دار شده انجام شد چونکه بیشترین تغییرات در تمایل پروتئین سرم در نمونه ها در این نمونه ها برپایه نتایج بدست آمده از SDS-PAGE مشاهده شدند.

۳-۴- سمیت سلولی

ارزایی MTT سرعت سمیت سلولی SWNTs و CO₂-SWNTs را آشکار کرد. سرعت تکثیر سلول های U373-MG بر روی SWNTs توده به طور چشمگیری کمتر (P<0.5) از نمونه کنترل و سایر نمونه ها بود. یک مقایسه بین SWNTs اصلاح شده و اصلاح نشده نشان داد که تکثیر سلول های U373-MG بر روی کروناهای SWNTs و CO₂-SWNTs تقریباً مشابه گروه کنترل بود. علاوه بر این، به نظر می رسد که اصلاح به وسیله HSA ظرفیت تکثیر نمونه های CO₂-SWNT را بهبود بخشید (شکل ۴A).

۳-۵- بررسی کیفی میزان ورود نانوذرات به داخل سلول با استفاده از میکروسکوپ کونفوکال

به منظور ارزیابی جذب سلولی نمونه ها، میکروسکوپ کانفوکال استفاده شد. در این خصوص، CO₂-SWNTs اندوسیتوز سلولی بیشتری را در مقایسه با SWNTs عامل دار نشده نشان دادند (شکل ۵). به علاوه، نمونه های پوشش داده شده به وسیله HSA جذب بیشتری را در مقایسه با گروه کنترل (در هر دوی نمونه های عامل دار شده و عامل دار نشده) نشان دادند. روندهای مشابهی در نمونه ها بعد از تشکیل پروتئین کرونا مشاهده شدند (شکل ۶). به هر حال، کروناهای نمونه های SWNTs و CO₂-SWNTs جذب کمتری در مقایسه با آنها قبل از تشکیل پروتئین کرونا نشان دادند.

۵- مراجع

- [1] Bussy C, Methven L, Kostarelos K. Hemotoxicity of carbon nanotubes. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(15):2127-2134.
- [2] Mottaghitalab F, Farokhi M, Zaminy A, et al. A biosynthetic nerve guide conduit based on silk/SWNT/fibronectin nanocomposite for peripheral nerve regeneration. *PLoS one*. 2013;8(9):e74417.
- [3] Shokrgozar MA, Mottaghitalab F, Mottaghitalab V, et al. Fabrication of porous chitosan/poly (vinyl alcohol) reinforced single-walled carbon nanotube nanocomposites for neural tissue engineering. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2011;7(2):276-284.
- [4] Adeli M, Mirab N, Alavidjeh MS, et al. Carbon nanotubes-graft-polyglycerol: biocompatible hybrid materials for nanomedicine. *Polymer*. 2009;50(15):3528-3536.
- [5] Dinan NM, Atyabi F, Rouini M-R, et al. Doxorubicin loaded folate-targeted carbon nanotubes: preparation, cellular internalization, in vitro cytotoxicity and disposition kinetic study in the isolated perfused rat liver. *Materials Science and Engineering: C*. 2014;39:47-55.
- [6] Atyabi F, Adeli M, Sobhani Z, et al. Poly (citric acid) functionalized carbon nanotube drug delivery system. *Google Patents*; 2013.
- [7] Hassanzadeh P, Arbabi E, Rostami F, et al. Carbon nanotubes prolong the regulatory action of nerve growth factor on the endocannabinoid signaling. *Physiology and Pharmacology*. 2015;19(3):167-176.
- [8] Service R. American Chemical Society meeting. Nanomaterials show signs of toxicity. *Science (New York, NY)*. 2003;300(5617):243.
- [9] Brumfiel G. Nanotechnology: A little knowledge. *Nature*. 2003;424(6946):246-248.
- [10] Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, et al. Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 2011;133(8):2525-2534.
- [11] Prapainop K, Witter DP, Wentworth Jr P. A chemical approach for cell-specific targeting of nanomaterials: small-molecule-initiated misfolding of nanoparticle corona proteins. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(9):4100-4103.
- [12] Monopoli MP, Åberg C, Salvati A, et al. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature nanotechnology*. 2012;7(12):779-786.
- [13] Nyström AM, Fadeel B. Safety assessment of nanomaterials: implications for nanomedicine. *Journal of Controlled Release*. 2012;161(2):403-408.
- [14] Oberdörster G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of internal medicine*. 2010;267(1):89-105.
- [15] Mirsadeghi S, Dinarvand R, Ghahremani MH, et al. Protein corona composition of gold nanoparticles/nanorods affects amyloid beta fibrillation process. *Nanoscale*. 2015;7(11):5004-5013.
- [16] Varnamkhasti BS, Hosseinzadeh H, Azhdarzadeh M, et al. Protein corona hampers targeting potential of MUC1 aptamer functionalized SN-38 core-shell nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 2015;494(1):430-444.
- [17] Lundqvist M, Stigler J, Elia G, et al. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(38):14265-14270.
- [18] Huang R, Carney RP, Stellacci F, et al. Protein-nanoparticle interactions: the effects of surface compositional and structural heterogeneity are scale dependent. *Nanoscale*. 2013;5(15):6928-6935.
- [19] Gebauer JS, Malissek M, Simon S, et al. Impact of the nanoparticle-protein corona on colloidal stability and protein structure. *Langmuir*. 2012;28(25):9673-9679.
- [20] Tenzer S, Docter D, Rosfa S, et al. Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS nano*. 2011;5(9):7155-7167.
- [21] Lesniak A, Campbell A, Monopoli MP, et al. Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake. *Biomaterials*. 2010;31(36):9511-9518.
- [22] Hankin S, Boraschi D, Duschl A, et al. Towards nanotechnology regulation-publish the unpublishable. *Nano Today*. 2011;6(3):228-231.
- [23] Salvador-Morales C, Flahaut E, Sim E, et al. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Molecular immunology*. 2006;43(3):193-201.
- [24] Zhang B, Xing Y, Li Z, et al. Functionalized carbon nanotubes specifically bind to α -chymotrypsin's catalytic site and regulate its enzymatic function. *Nano letters*. 2009;9(6):2280-2284.
- [25] Andersen AJ, Robinson JT, Dai H, et al. Single-walled carbon nanotube surface control of complement recognition and activation. *ACS nano*. 2013;7(2):1108-1119.
- [26] Hamad I, Hunter AC, Rutt KJ, et al. Complement activation by PEGylated single-walled carbon nanotubes is independent of C1q and alternative pathway turnover. *Molecular immunology*. 2008;45(14):3797-3803.

- [27] Ge C, Du J, Zhao L, et al. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(41):16968-16973.
- [28] Mottaghitalab F, Farokhi M, Atyabi F, et al. The effect of fibronectin on structural and biological properties of single walled carbon nanotube. *Applied Surface Science*. 2015;339:85-93.
29. Meng J, Song L, Xu H, et al. Effects of single-walled carbon nanotubes on the functions of plasma proteins and potentials in vascular prostheses. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2005;1(2):136-142.
- [30] Alazzam A, Mfoumou E, Stiharu I, et al. Identification of deregulated genes by single wall carbon-nanotubes in human normal bronchial epithelial cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2010;6(4):563-569.
- [31] Albini A, Mussi V, Parodi A, et al. Interactions of single-wall carbon nanotubes with endothelial cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2010;6(2):277-288.
- [32] Edgington AJ, Petersen EJ, Herzing AA, et al. Microscopic investigation of single-wall carbon nanotube uptake by *Daphnia magna*. *Nanotoxicology*. 2014;8(sup1):2-10.
- [33] Mottaghitalab F, Farokhi M, Zaminy A, et al. A biosynthetic nerve guide conduit based on silk/SWNT/fibronectin nanocomposite for peripheral nerve regeneration. 2013.
- [34] Firme CP, Bandaru PR. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2010;6(2):245-256.
- [35] Chaki NK, Vijayamohan K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*. 2002;17(1):1-12.
- [36] Ghodselahi T, Hoornam S, Vesaghi M, et al. Fabrication Localized Surface Plasmon Resonance sensor chip of gold nanoparticles and detection lipase–osmolytes interaction. *Applied Surface Science*. 2014;314:138-144.
- [37] Canovi M, Lucchetti J, Stravalaci M, et al. Applications of surface plasmon resonance (SPR) for the characterization of nanoparticles developed for biomedical purposes. *Sensors*. 2012;12(12):16420-16432.
- [38] Lee EG, Park KM, Jeong JY, et al. Carbon nanotube-assisted enhancement of surface plasmon resonance signal. *Analytical biochemistry*. 2011;408(2):206-211.
- [39] Cedervall T, Lynch I, Lindman S, et al. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(7):2050-2055.
- [40] Xiu P, Zhou B, Qi W, et al. Manipulating biomolecules with aqueous liquids confined within single-walled nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*. 2009;131(8):2840-2845.
- [41] Caracciolo G, Palchetti S, Colapicchioni V, et al. Stealth effect of biomolecular corona on nanoparticle uptake by immune cells. *Langmuir*. 2015;31(39):10764-10773.