

## قابلیت نانو ذرات نقره روی مهار تجمع‌های آمیلوئیدی و نقش دارویی احتمالی آنها در جلوگیری از بیماری آلزایمر

حسن رامشینی: دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران - نویسنده رابط: ramshini@alumni.ut.ac.ir

اعظم السادات مقدسی: کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۲۳

### چکیده

زمینه و هدف: تجمع پروتئینها باعث اختلال در عملکرد سلولی و بیماریهای متعدد از جمله آلزایمر می گردد. درمانهای رایج این بیماریها به دلیل عدم عبور آنها از سد مغزی-عروقی موفقیت آمیز نبوده است. توانایی تاثیر نانو ذرات روی تجمع پروتئینها از این نظر که ممکن است پتانسیل درمانی برای بیماریهای مربوط به تجمع پروتئینها داشته باشند جالب به نظر می رسد. در مطالعه حاضر اثر نانو ذرات نقره روی تجمع آمیلوئیدی لیزوزیم سفیده تخم مرغ مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: پروتئین لیزوزیم به میزان ۲ میلی گرم بر میلی لیتر در ۵۰ میلی مولار بافر گلايسين،  $pH=2/5$ ، در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد و در حال همزدن آرام به آمیلوئید تبدیل شد. اثر نانو ذره نقره روی تجمع آمیلوئیدی لیزوزیم با تکنیکهای مختلفی مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از آزمون آماری تی مستقل و با نرم افزار SPSS16 انجام گرفت.

نتایج: انکوباسیون لیزوزیم با نانو ذرات نقره در دامنه غلظتی بین ۳ تا ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر، پروسه تجمع آمیلوئیدی را مهار کرد ( $p<0/5$ ). بطور جالب توجهی این نانو ذره در غلظت پایین یعنی ۳ میکروگرم بر میلی لیتر بهترین اثر را داشت. در این غلظت زمان تاخیر طولانی شد و فاز فیبری شدن بطرز چشمگیری کاهش و سمیت تجمع‌های آمیلوئیدی روی کشت سلولی نیز کاهش یافت.

نتیجه گیری: در مجموع نتایج ما نشان داد که سطوح نانو ذرات نقره مثل یک نانو چاپرون عمل کرده و باعث مهار تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی لیزوزیم شده و بنابراین احتمال استفاده دارویی برای درمان بیماری آلزایمر وجود دارد. واژگان کلیدی: لیزوزیم، تجمع آمیلوئیدی، سمیت سلولی، نانو نقره

### مقدمه

آلزایمر یک بیماری پیشرونده و تحلیل برنده سیستم عصبی است که از ویژگیهای مهم آن تغییر بنای فضایی پروتئین آ-بتا ( $A\beta$ ) از حالت محلول به الیگومرها، پروتوفیبریلها و یا فیبریلهاست که به شکل پلاکهای نامحلول در مغز تجمع می یابند. وجود این پروتئینهای غلط تاخورد  $A\beta$  در مغز بیماران، ارتباط مستقیمی با التهابات نورونی و سمیت سلولهای نورونی دارد که باعث تحلیل سیستم عصبی و بروز بیماری آلزایمر می شود (Dineley et al. 2010; Haass and Selkoe) (2007). بنابراین استراتژیهای درمانی متعددی با هدف جلوگیری از تجمع پروتئینهای غلط تاخورد  $A\beta$ ، جلوگیری از تشکیل آنها و یا برگشت پذیری این پروتئینها به بنای فضایی طبیعی تاخورد ارائه شده است (Gervais et al. 2007; Salomone et al. 2012). از طرف دیگر تجمع‌های  $A\beta$  که از قبل بوجود آمده نیز باید از سیستم حذف شود در غیر این صورت این تجمع‌ها در مغز باعث مرگ سلولهای نورونی و تخریب حافظه می گردند (Salomone et al. 2012; Liu et al. 2012). تاکنون دارویی به بازار عرضه نشده است که بتواند هم مانع تشکیل این تجمع‌های آمیلوئیدی شود و هم تجمع‌ها را از

جلوگیری از تجمع پروتئینهای غلط تاخورد  $A\beta$ ، جلوگیری از تشکیل آنها و یا برگشت پذیری این پروتئینها به بنای فضایی طبیعی تاخورد ارائه شده است (Gervais et al. 2007; Salomone et al. 2012). از طرف دیگر تجمع‌های  $A\beta$  که از قبل بوجود آمده نیز باید از سیستم حذف شود در غیر این صورت این تجمع‌ها در مغز باعث مرگ سلولهای نورونی و تخریب حافظه می گردند (Salomone et al. 2012; Liu et al. 2012). تاکنون دارویی به بازار عرضه نشده است که بتواند هم مانع تشکیل این تجمع‌های آمیلوئیدی شود و هم تجمع‌ها را از

2011). مطالعات نشان می دهد که نانوذرات نقره دارای نقشهای متنوع از جمله دارای خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی می باشد (Chen and Schluesener 2008). ولی در رابطه با نقش این ذرات در تجمع پروتئینها مطالعه زیادی صورت نگرفته است. ما اخیرا نشان داده ایم که سمیت تجمعات لیزوزیمی در حضور نانوذرات نقره در مقایسه با سمیت آنها در غیاب این نانوذرات کاهش معنی داری پیدا کرده و چنانچه آنها (تجمعات تشکیل شده در حضور نانو ذرات نقره) به آمیگدالهای مغز موش صحرایی تزریق شوند، روی حافظه و رفتار این موشها اثر بسیار کمتری می گذارد (Ramshini et al. 2017) و این نشان دهنده کاهش سمیت توسط این ذرات است. از طرفی دیگر دهوری و همکاران نشان داده اند که نانو ذرات نقره همچنین قادرند از تجمع آلفا-لاکتالبومین جلوگیری کرده و دلیل این امر را به ویژگی چاپرونی این ذرات نسبت داده اند (Dehviri and Ghahghaei 2018). در مطالعه دیگری دانشمندان نشان داده اند که نانو ذرات نقره ای که با کپسایسین پوشش داده شده اند قادرند مانع تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین سرم آلبومین گردند (Anand et al. 2016). در این مطالعه از لیزوزیم سفیده تخم مرغ که ساختار و مکانیسم تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی در آن بخوبی شناخته شده به عنوان یک مدل پروتئینی عام (Arnaudov et al. 2005) برای بررسی اثر نانوذره نقره استفاده شده است.

## روش کار

روش سنتز نانوذرات نقره: ابتدا باکتری باسیلوس (*sp. GFCr-4*) در محیط کشت اختصاصی (LB) و شرایط مناسب کشت داده شد. سپس محیط سانتریفوژ گردید، بعد از رسوب باکتری، آنزیم خارج سلولی آلفا آمیلاز باکتری موجود در محیط رویی توسط روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد سریع (FPLC) خالص شد. آنزیم آلفا آمیلاز باکتری با نیترات نقره در شرایط خاص انکوبه گردید و آنزیم باعث احیای فلز نقره با بار مثبت به نانوذرات بدون

پیش تشکیل شده را از بین ببرد و در نهایت رفتارهای غیر طبیعی را در بیماران آلزایمری بهبود بخشد. در سال- های اخیر، نانوتکنولوژی رشد سریعی پیدا کرده و نانو ذرات گوناگونی تولید شده اند که استفاده های وسیعی در زمینه های مختلفی دارند. این مسئله به دلیل واکنش پذیری زیاد و خواص فیزیکی شیمیایی منحصر به فرد آنها می- باشد (Loo et al. 2013). یکی از الزامات هر ترکیبی که کاندیدای درمان بیماری های تحلیل برنده سیستم عصبی می شود توانایی آن برای عبور از سد عروقی- مغزی است (Teixido and Giralt 2008). به همین دلیل امروزه از نانوذراتی که براحتی از این سد عبور می کنند به عنوان حامل دارو استفاده می کنند (Veisheh et al. 2009). مطالعات گوناگونی در جهت بررسی اثر نانو ذرات روی پدیده تجمع پروتئینی انجام شده است. Bellova و همکارانش نشان دادند که نانوذرات مغناطیس  $Fe_3O_4$  قادر به مهار تشکیل تجمع آمیلوئیدی لیزوزیم می باشند. این نانو ذرات حتی قادر به تخریب تجمعات پروتئینی از پیش تشکیل شده نیز بودند (Bellova et al. 2010). مطالعات قبلی با استفاده از نانوذرات گوناگون توانایی آنها را در جلوگیری از تشکیل تجمعات پروتئینی نشان داده است. Cabaleiro-Lago و همکارانش نشان دادند که نانوذرات کو پلیمر در غلظت های پیکو مولار باعث به تاخیر انداختن فیبری شدن پروتئین Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) می شود (Cabaleiro-Lago et al. 2010). همین گروه از محققان نشان دادند که نانوذرات بصورت وابسته به غلظت فاز تاخیر تجمع (lag phase) را به میزان زیادی طولانی می کنند و به این وسیله سرعت تجمع را به میزان زیادی کاهش می دهند (Cabaleiro-Lago et al. 2008). Yoo و همکارانش نانوذره حامل کادمیوم و تلوریوم را که بوسیله تیوگلاکتولیک اسید پایدار شده طراحی کردند و نشان دادند که این ذرات قادرند فاز هسته زایی  $A\beta$  1-40 را به تاخیر اندازند و بدینوسیله میزان تجمع را به مقدار زیادی کاهش دهند (Yoo et al.

تیوفلاوین T به عنوان تشکیل احتمالی فیبرهای آمیلوئیدی یا شبه آمیلوئیدی تفسیر گردید (Nilsson 2004). جذب نوری کنگورد: رنگ کنگورد به غلظت ۲۰ میکرومولار در ۵ میلی مولار بافر فسفات سدیم، ۱۵۰ میلی مولار NaCl، pH= ۷/۴ تهیه شد. نمونه های آمیلوئیدی محلول کنگورد اضافه شد و بعد از همزدن، طیف جذبی آن در محدوده طول موج ۷۰۰-۴۰۰ nm بعد از ۲ یا ۳ دقیقه صبر کردن برای ایجاد تعادل با دستگاه اسپکتروفوتومتر به دست آمد (Nilsson 2004).

تهیه نمونه برای عکسبرداری آمیلوئید توسط میکروسکوپ نیروی اتمی: مقدار ۱ میکرولیتر از نمونه حاوی فیبرهای آمیلوئیدی تشکیل شده را بر روی قطعات کوچک از جنس میکا ریخته و بعد از پخش شدن و خشک شدن آن از دستگاه میکروسکوپ نیروی اتمی برای مشاهده مستقیم فیبرهای آمیلوئیدی تشکیل شده استفاده شد. (Ramshini et al. 2015).

بررسی سمیت با روش MTT: فیبرهای آمیلوئیدی طبق روش ذکر شده در بالا در حضور نانوذرات (با غلظت بهینه ۳ میکروگرم بر میلی لیتر) و عدم حضور نانوذرات تهیه شدند. سپس ویال های حاوی مواد فوق سانتیفریژ گشتند و محلول رویی برداشته شد، به اندازه محلول رویی خارج شده، محیط کشت DMEM به بخش رسوبی ویال ها اضافه گردید و بخش رسوبی در آن حل شد. بعد از چندین بار سمپلینگ ماده ی آماده تزریق بلافاصله به محیط کشت سلول ها اضافه و سمیت نمونه ها برای سلول در یک ظرف ۹۶ چاهکی به وسیله MTT سنجش شد (Ramshini et al. 2015).

آنالیز آماری: هر آزمایش حداقل سه بار بصورت مستقل انجام و در هر بار هر کدام حداقل سه بار تکرار شد و تمام نمودارها بصورت میانگین  $SD \pm Mean$  گزارش شده است. داده ها توسط نرم افزار آماری SPSS 16 با استفاده از آزمون T مستقل با ضریب اطمینان ۹۵٪ تجزیه و تحلیل شد.

بار شد. در این حالت مشاهده تغییر رنگ محیط و اندازه-گیری UV و جذب نانو ذره تأیید سنتز نانوذرات نقره بود. نانوذرات بدون بار نقره با سانتیفریژ کردن محیط به بدست آمد (Kalimuthu et al. 2008). بهینه سازی و شناسایی نانوذرات دقیقاً مطابق مطالعات قبلی انجام گرفته با این نانوذرات انجام شد (Ramshini et al. 2015). بطور خلاصه، مشاهده باند جذبی قوی با بیشترین جذب در ۴۰۹ نانومتر در مقایسه با کنترل نشان دهنده وجود نانو ذره نقره ارزیابی شد. اندازه نانو ذرات با تکنیک پراکنش نور پویا (DLS) مورد ارزیابی قرار گرفت و دامنه شعاع هیدرودینامیک آنها ۹۰-۱۱۰ نانومتر محاسبه شد و آنالیز شکل ظاهری این ذرات با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نتایج اندازه نانو ذرات توسط پراکنش نور پویا را تأیید کرد.

القای فیبرهای آمیلوئیدی در لیزوزیم سفیده تخم مرغ: ۲ میلی گرم در میلی لیتر پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ در بافر ۵۰ میلی مولار گلیسین با pH=۲/۵ در دمای ۵۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت همراه با همزن مداوم و چرخش rpm ۲۵۰ قرار داده شد. بعد از ۴۸ ساعت تشکیل تجمعات آمیلوئیدی مورد بررسی قرار گرفت. برای مطالعه اثر نانو ذرات نیز نانوذرات نقره با غلظت های مختلف همراه با پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ با همان شرایط قبلی انکوبه گردید. بعد از ۴۸ ساعت تشکیل تجمعات آمیلوئیدی بررسی شد (Ramshini et al. 2015).

مطالعات سنجش ThT: برای ارزیابی تشکیل یا عدم تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی از محلول تازه تهیه شده تیوفلاوین T که با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرومتری فیلتر شده بود، استفاده گردید. نمونه تهیه شده در روش قبلی به محلول ThT اضافه و بررسی تغییر شدت فلوئورسانس با استفاده از دستگاه اسپکتروفلوئورومتر کری اکلپس واریان انجام شد. طیف برانگیختگی از ۴۴۰ نانومتر، نشر از ۴۴۵ تا ۵۵۰ نانومتر و پهنای شکاف برانگیختگی و نشر ۱۰ نانومتر در نظر گرفته شد. افزایش شدت نشر

## نتایج

تعیین غلظت بهینه و بررسی سینتیک مهار تجمع فیبرهای لیزوزیم توسط نانوذره نقره در غلظت بهینه: همانطور که گفته شد یکی از مارکرهای تشکیل تجمعات آمیلوئیدی طیف نشر فلوروسانس محلول تیوفلاوین T است که در این روش در اثر اتصال این رنگ به فیبریل‌ها، با تحریک آن در طول موج ۴۴۰ نانومتر، شدت نشر بالایی در طول موجهای بین ۴۴۵ تا ۵۵۰ نانومتر دیده می‌شود. برای بدست آوردن بهترین غلظتی که نانوذره نقره می‌تواند باعث مهار تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی گردد فرآیند تشکیل این فیبرها در دامنه غلظت ۳-۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذره نقره بررسی گردید. همانطور که شکل شماره ۱-الف نشان می‌دهد، بهترین غلظتی که بیشترین مهار را داشته غلظت ۳ میکروگرم بر میلی لیتر است. نکته جالب در این نمودار این است که میزان مهار با افزایش غلظت مهارکننده کاهش یافته است. پس از بدست آوردن غلظت بهینه (۳ میکروگرم/میلی لیتر) نانوذره نقره برای مهار تجمع لیزوزیم، کینتیک مهاری آن در زمان‌های مختلف (دوره-های ۶ ساعته) مورد بررسی قرار گرفت. کینتیک تجمع لیزوزیم در غیاب نانو ذره سه مرحله فاز تاخیر، فاز رشد سریع و فاز تعادل را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل ۲-ب مشخص است، در حضور این غلظت از نانوذره نقره، میزان شدت فلوروسانس و تشکیل آمیلوئید بعد از ۴۸ ساعت به میزان چشمگیری کاهش یافته و هر دو مرحله کینتیکی تشکیل تجمع (فاز تاخیر و فاز رشد سریع) مهار شده است. این شکل نشان می‌دهد که در حضور نانو ذره اولاً فاز تاخیر طولانی شده، ثانیاً به طور معنی‌داری فاز فیبریلاسیون (فاز سریع) کاهش یافته است و این هر دو نشانه عمل مهاری نانوذره است.

بررسی جذب نوری قرمز کنگو(کنگورد) در حضور نانوذره نقره در غلظت بهینه: همانطور که ذکر شد یکی دیگر از روش‌های اثبات تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی جذب نوری کنگورد است. بعد از پیدا کردن غلظت بهینه

برای نشان دادن مهار تشکیل فیبرآمیلوئیدی از روش کنگورد استفاده شد. همانطور که شکل ۲ نشان می‌دهد، طیف جذبی (شدت جذب) فیبرهای آمیلوئیدی در حضور نانوذرات نقره در غلظت بهینه (۳ میکروگرم/میلی لیتر) نسبت به لیزوزیم به تنهایی با غلظت ۲ میلی گرم/میلی لیتر کاهش یافته و طیف جذبی نیز به سمت چپ جابجایی پیدا کرده است. که این نشان دهنده کاهش تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی در حضور نانوذرات نقره در غلظت ۳ میکروگرم بر میلی لیتر است.

عکس برداری توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM): یکی از روش‌های اثبات مهار تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی نشان دادن مورفولوژی این فیبرها بوسیله عکس میکروسکوپ نیروی اتمی است. به این منظور حدود ۱ میکرولیتر از فیبرهای تشکیل شده لیزوزیم در حضور عدم حضور نانوذرات نقره (با غلظت بهینه) مورد بررسی قرار گرفت و همانطور که شکل ۳ نشان می‌دهد در عدم حضور نانوذره، فیبرهای بدون شاخه آمیلوئیدی مشاهده می‌شود اما در حضور نانوذرات نقره فرآیند تشکیل فیبرهای بالغ آمیلوئیدی متوقف شد و الیگومرها و هسته‌های اولیه مشاهده می‌گردند.

کاهش سمیت فیبرهای آمیلوئیدی در حضور نانوذرات نقره: هر دوی تجمعات تشکیل یافته لیزوزیم در حضور و عدم حضور نانوذرات به یک محیط فیزیولوژیک انتقال داده شدند و سپس به محیط کشت سلول‌های PC12 در غلظت نهایی ۲ میکرومولار اضافه شدند. توانایی این تجمعات برای تخریب عملکرد سلول‌ها با ارزیابی احیاء MTT بر اساس توضیحاتی که در قسمت روش‌ها داده شده انجام گرفت. همان‌طور که در شکل ۴ ملاحظه می‌شود.

فیبرهای آمیلوئیدی لیزوزیم کاهش معنی‌داری را در احیاء MTT در مقایسه با سلول‌های شاهد (که در مجاورت هیچ نوع تجمعی قرار نگرفته‌اند) نشان می‌دهند (به میزان ۵۸٪ کاهش) و تجمعات تشکیل شده در حضور نانوذرات نقره (با غلظت بهینه) بترتیب به میزان ۲۵٪ کاهش احیاء MTT را نشان می‌دهند. این نشان می‌دهد نانوذرات، سمیت ناشی

مسدود کردن جایگاه‌ها اتصالی هسته‌ها که باعث تشکیل فیبریل شوند و کاهش غلظت پروتئین مستعد به تجمع در محیط، منجر به کاهش فیبریل‌اسون گردد. این دانشمندان و دیگران همچنین نشان داده‌اند که اتصال نانو ذرات به موتیف‌های آبگریز یک پپتید، باعث مهار تشکیل تجمع می‌شوند (Cabaleiro-Lago et al. 2008, 2012). مطالعات مختلف نشان می‌دهند که ارتباط مستقیمی بین آبگریزی و خاصیت چاپرونی وجود دارد (Shahangian et al. 2011). با توجه به اینکه این نانو ذرات بصورت زیستی سنتز گردیده‌اند بنابراین سطوح آنها را هاله‌ای از پروتئین‌ها فرا گرفته است که در شرایط تجمع بصورت جزئی-واسرشته در آمده‌اند. در شرایط واسرشتگی بخش-های آب‌گریز آنها در دسترس حلال قرار می‌گیرند. یکی از مکانیسم‌های مهار این نانو ذرات می‌تواند اثر چاپرونی آنها در شرایط تجمع باشد. یعنی بخش‌های آبگریز پروتئین‌های هاله نانو ذرات از طریق اندرکنش‌های آب‌گریز-آب‌گریز بخش‌های آبگریز لیزوزیم را پوشش داده و مانع اتصال آنها به همدیگر شده و از ادامه واکنش تجمع جلوگیری می‌نماید (Shahangian et al. 2011).

### نتیجه‌گیری

باتوجه به اثر این نانوذره در جلوگیری از تشکیل تجمع پروتئین لیزوزیم هدف نهایی از این تحقیق استفاده احتمالی از این نانوذرات برای جلوگیری از تجمع پروتئین  $A\beta$  در مغز و جلوگیری احتمالی از روند آغاز بیماری آلزایمر است.

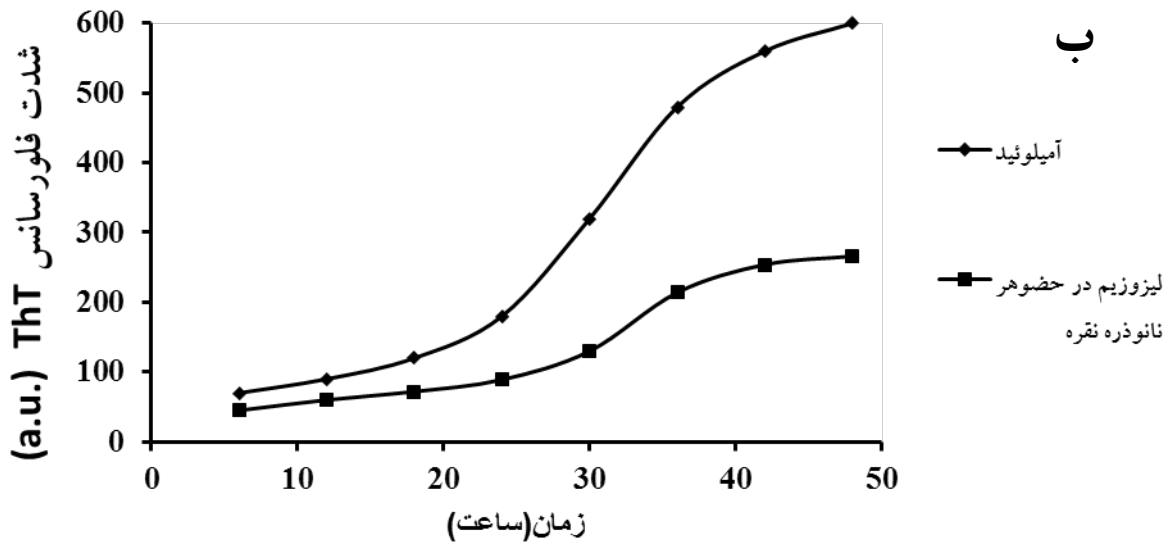
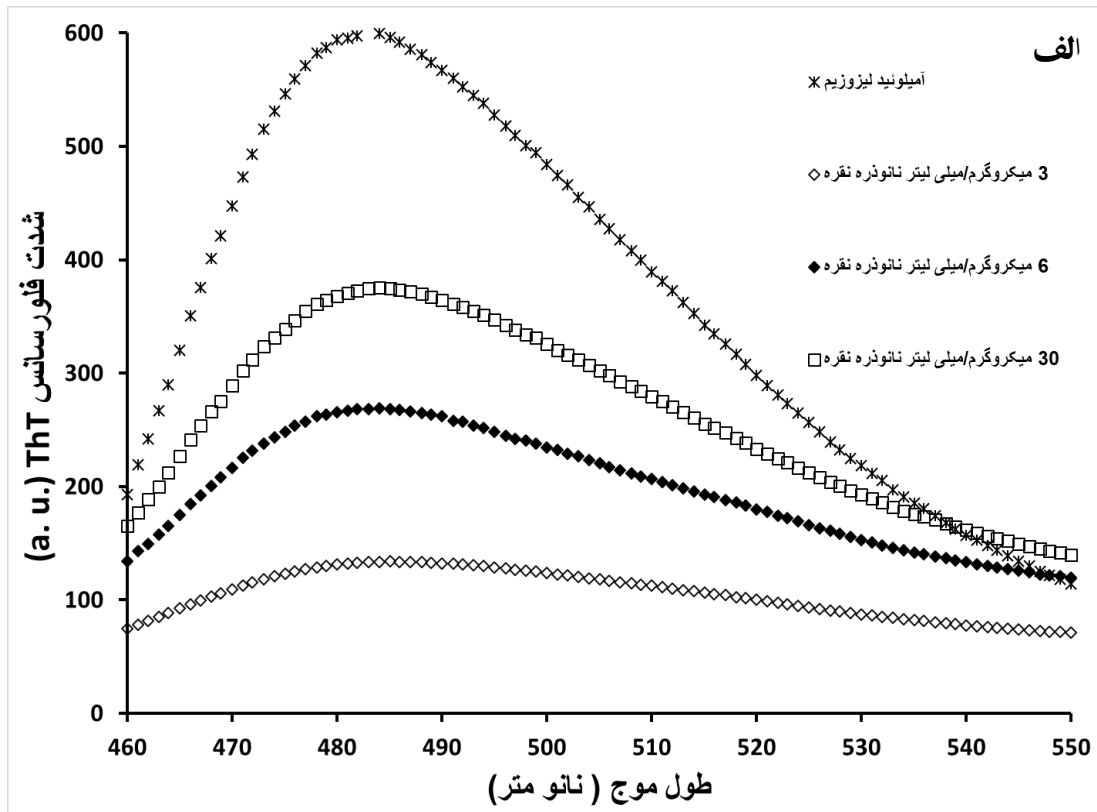
### تشکر و قدر دانی

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور بدلیل تصویب اعتبارپژوهشی با شماره ۷/۵۴۰۹۳/د برای این مقاله که بخشی از پایاننامه کارشناسی ارشد با عنوان "مطالعه اثر تعدادی از نانوذرات سنتز شده توسط باکتری *Bacillus sp. GFCr-4* بر روند تجمع آمیلوئیدی لیزوزیم سفیده تخم مرغ" و با کد اخلاق IR.MEDSAB.REC.1394.102 می‌باشد تقدیر و تشکر می‌نمایم.

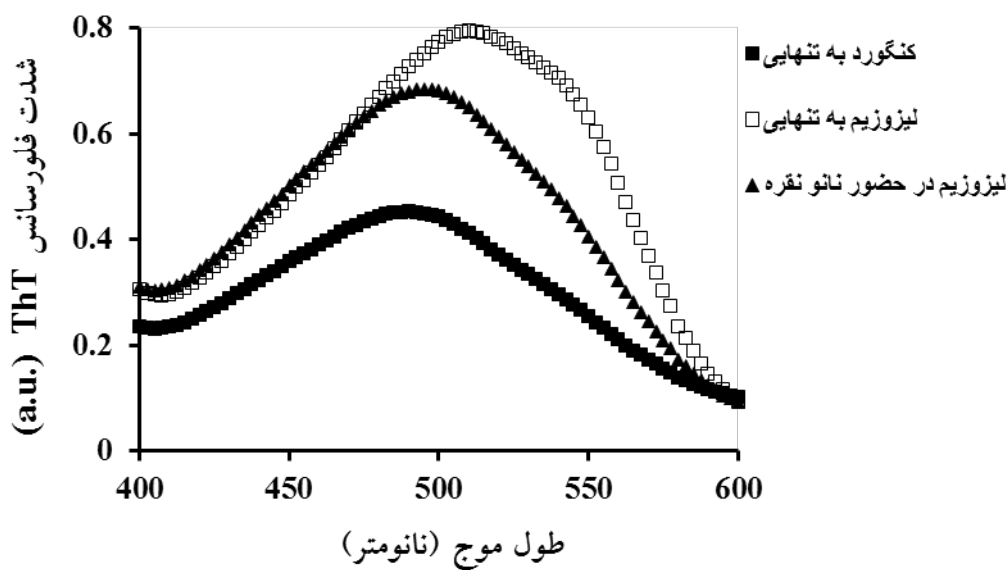
از فیبرهای آمیلوئیدی را کاهش داده‌اند و باعث جلوگیری از تخریب عملکرد سلول‌ها توسط فیبرهای آمیلوئیدی می‌گردند.

### بحث

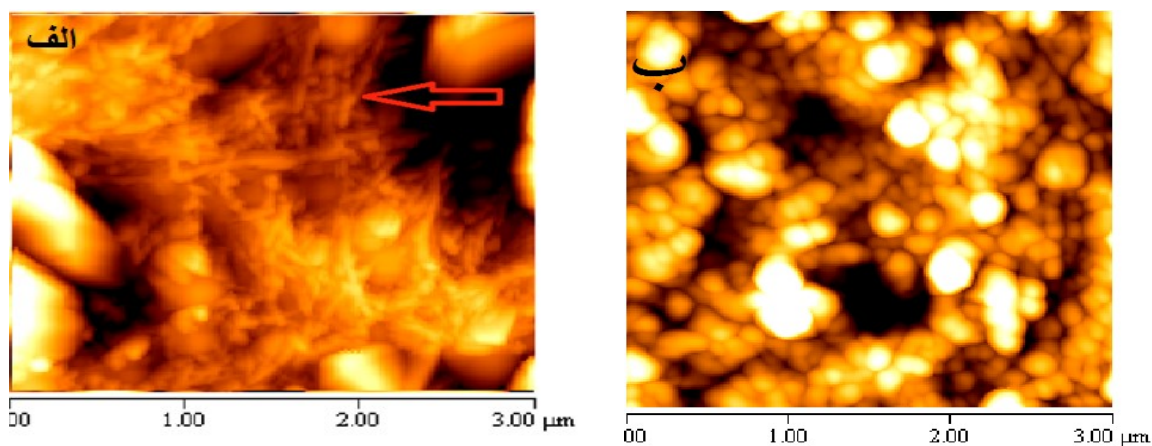
مهمترین عاملی که سبب تحقیقات وسیع بر روی پدیده فیبریل‌اسیون خود به خودی پروتئین‌ها شده است، ارتباط این پدیده با بیماری‌های مهم و رو به گسترشی است که با نام بیماری‌های آمیلوئیدی شناخته می‌شوند. وجه اشتراک بیماری‌های آمیلوئیدی تشکیل تجمعات پروتئینی در بخش‌های مختلف بدن می‌باشد (Uversky and Fink 2004). در این پروژه، پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ بدلیل اینکه از نظر ساختمان و توالی، همولوژی بالایی با نوع انسانی دارد و به عنوان یک پروتئین مدل، تشکیل ساختارهای فیبریلی، سینتیک تشکیل آمیلوئید و عوامل مؤثر در ایجاد آن بخوبی مشخص شده است مورد استفاده قرار گرفت (Liu et al. 2007). اثر نانوذرات آهن در غلظت‌های پایین روی پدیده تجمع پروتئین‌ها قبلاً مطالعه شده است (Mahmoudi et al. 2013). طبق مطالعات انجام شده توسط محمودی و همکاران (Mahmoudi et al. 2013) ثابت شد که نانوذرات در غلظت پایین به جایگاه‌های خاص در هسته‌های اولیه پروتئین متصل شده و مانع اتصال هسته‌ها به همدیگر می‌شوند و به این طریق فیبریل‌اسیون مهار می‌شوند. آنها نشان دادند هنگامی که تشکیل فیبر آغاز می‌شود، افزودن نانوذرات ممکن است روند فیبریل‌اسیون را معکوس کند و یا فیبرها را از بین ببرد. اضافه شدن نانوذرات در غلظت‌های پایین باعث افزایش در فاز تاخیر و کاهش در مرحله طویل شدن می‌شود. تعامل قوی بین پپتیدها و نانوذرات بوسیله جذب نانوذرات به هسته‌ها در جایگاه‌های خاص روی آنها مانع اتصال هسته‌ها به همدیگر شده در نتیجه فیبریل‌اسون را کاهش می‌دهد. بعنوان مثال Cabaleiro-Lago و همکاران (Cabaleiro-Lago et al. 2008) بیان داشتند، تعامل نانوذرات و پروتئین می‌تواند از طریق



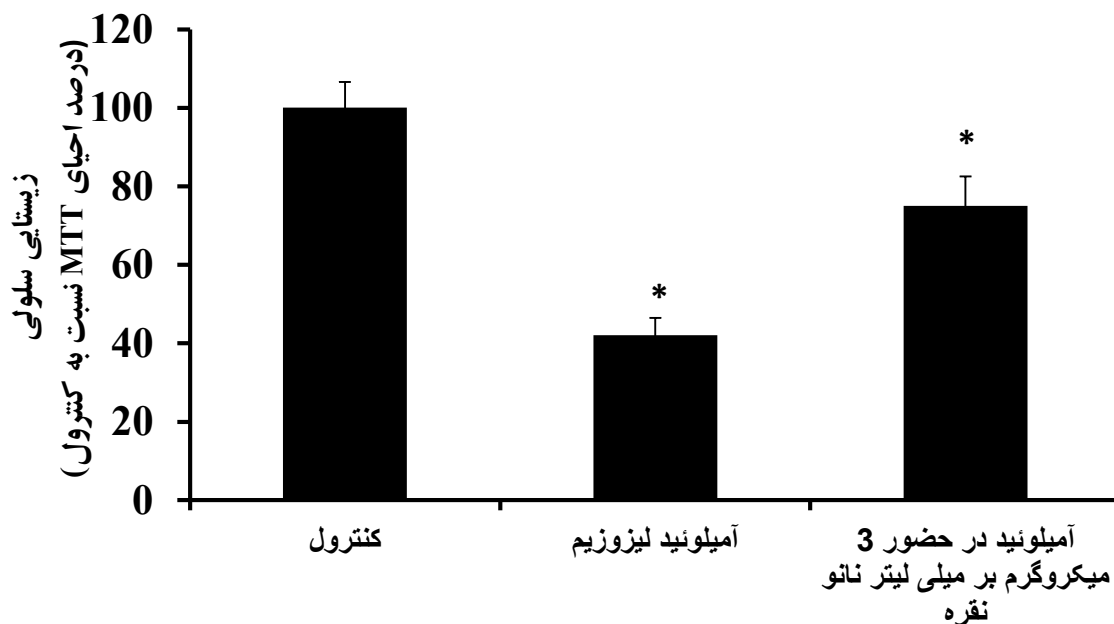
شکل ۱ - نمودار دامنه غلظتی نانوذرات نقره بر میزان مهار تشکیل فیبر آمیلوئید در پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ بعد از ۴۸ ساعت. نمودارها از بالا به پایین به ترتیب لیزوزیم در عدم حضور نانو ذره، در حضور غلظتهای ۳۰، ۶ و ۳ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد (الف). کینیتیک ۴۸ ساعته تشکیل آمیلوئید در حضور و عدم حضور نانوذره (ب).



شکل ۲- طیف جذبی قرمز کنگو، پیش (□) و پس (▲) از اضافه کردن ۳ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوذره نقره، انکوبه شده در شرایط تشکیل آمیلوئید (pH: ۲/۵، دما ۵۷ درجه، همزن مداوم و زمان ۴۸ ساعت). همچنین طیف جذبی کنگو رد به تنهایی جهت کنترل نیز نشان دهنده داده شده است (■)



شکل ۳- تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی ۲ میلی گرم بر میلی لیتر لیزوزیم در بافر گلايسين با pH=۲/۵ بعد از ۴۸ ساعت انکوباسيون در دمای ۵۷ درجه سانتیگراد. شکل الف) در عدم حضور نانو ذره و شکل ب) در حضور نانو ذره



شکل ۴ - سمیت سلولی حاصل از تجمعات لیزوزیم در حضور و عدم حضور نانوذرات. زیستایی سلولهای pc12 که در معرض ۲ میکرو مولار لیزوزیم آمیلوئیدی بوده اند ۴۲٪ و در حضور نانو نقره با غلظت ۳ میکرو گرم بر میلی لیتر ۷۵٪ است. در عدم حضور آمیلوئیدهای لیزوزیم سمیتی مشاهده نشد (کنترل). ( $p < 0.05$  \* نسبت به کنترل)

## References

- Haass, C. and Selkoe, DJ., 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, pp. 101–112.
- Dineley, KT., Kaye, R., Neugebauer, V., Fu, Y. and Zhang, W., 2010. Amyloid beta oligomers impair fear conditioned memory in a calcineurin-dependent fashion in mice. *J Neurosci Res.* 88, pp. 2923–2932.
- Gervais, F., Paquette, J., Morissette, C., Krzywkowski, P. and Yu, M., 2007. Targeting soluble Aβ peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. *Neurobiol Aging.* 28, pp. 537–547.
- Salomone, S., Caraci, F., Leggio, GM., Fedotova, J. and Drago, F., 2012. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs. *Br J Clin Pharmacol.* 73, pp. 504–517.
- Liu, YH., Giunta, B., Zhou, HD., Tan, J. and Wang, YJ., 2012. Immunotherapy for Alzheimer disease—the challenge of adverse effects. *Nat Rev Neurol.* 8, pp. 465–469.
- Loo, SL., Fane, AG., Lim, TT., Krantz, WB., Liang, YN., Liu, X. and Hu, X., 2013. Super-absorbent cryogels decorated with silver nanoparticles as a novel water technology for point-of-use disinfection. *Environ.Sci.Technol.* 47, pp. 9363–9371.
- Teixido, M. and Giralt, E., 2008. The role of peptides in blood-brain barrier nanotechnology. *J Pept Sci;* 14, pp.163-173.
- Veisheh, O., Sun, C., Fang, C., Bhattarai, N. and Gunn, J., 2009. Specific targeting of brain tumors with an optical/magnetic resonance imaging nanoprobe across the bloodbrain barrier. *Cancer Research.* 69, pp. 6200-62007.
- Bellova, A., Bystrenova, E., Koneracka, M., Kopcansky, P. and Valle, F., 2010. Effect of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles on lysozyme amyloid aggregation. *Nanotechnology.* P. 21.

- Cabaleiro-Lago, C., Lynch, I., Dawson, KA. and Linse, S., 2010. Inhibition of IAPP and IAPP(20-29) fibrillation by polymeric nanoparticles. *Langmuir*; 26, pp. 3453-3461.
- Cabaleiro-Lago, C., Quinlan-Pluck, F., Lynch, I., Lindman, S. and Minogue, AM., 2008. Inhibition of amyloid beta protein fibrillation by polymeric nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 130, pp. 15437-15443.
- Yoo, SI., Yang, M., Brender, JR., Subramanian, V. and Sun, K., 2011. Inhibition of amyloid peptide fibrillation by inorganic nanoparticles: Functional similarities with proteins. *Ang Chem Inter Edit.* 50, pp. 5110-5115.
- Chen, X. and Schluesener, HJ., 2008. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett.* 176, pp. 1-12.
- Ramshini, H., Moghaddasi, AS., Aldaghi, LS., Mollania, N. and Ebrahim-Habibi, A., 2017. Silver Nano particles ameliorate learning and spatial memory of male Wistar rats by prevention of amyloid fibril-induced neurotoxicity. *Arch Ital Biol.* 155, pp. 131-141.
- Dehvari, M. and Ghahghaei, A., 2018. The effect of green synthesis silver nanoparticles (Ag-NPs) from *Pulicaria undulata* on the amyloid formation in  $\alpha$ -lactalbumin and the chaperon action of  $\alpha$ -casein. *Int J Biol Macromol.* 108, pp. 1128-1139.
- Anand, BG., Dubey, K., Shekhawat, DS. and Kar, K., 2016. Capsaicin-coated Silver Nanoparticles Inhibit Amyloid Fibril Formation of Serum Albumin. *Biochemistry.* 55, pp. 3345-3348.
- Arnaudov, LN. and de Vries, R., 2005. Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme. *Biophys J.* 88, pp. 515-526.
- Kalimuthu, K., Suresh Babu, R., Venkataraman, D., Bilal, M. and Gurunathan, S., 2008. Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 65, pp. 150-153.
- Ramshini, H., mohammad-zadeh, M. and Ebrahim-Habibi A., 2015. Inhibition of amyloid fibril formation and cytotoxicity by a chemical analog of Curcumin as a stable inhibitor. *Int. J. Biol. Macromol.* 78, pp. 396-404.
- Nilsson, MR., 2004. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods.* 34(1), pp. 151-160.
- Uversky, VN. and Fink, AL., 2004. Conformational constraints for amyloid fibrillation: The importance of being unfolded. *Biochem. Biophys. Acta,* 1698, pp. 131- 153.
- Liu, HL., Wu, YC., Zhao, JH., Liu, YF., Huang, CH., Fang, HW. and Ho, Y., 2007. Insights into the conformational changes of several human lysozyme variants associated with hereditary systemic amyloidosis. *Biotechnol Prog.* 23, pp. 246-254.
- Mahmoudi, M., Quinlan-Pluck, F., Monopoli, M., Sheibani, S., Vali, H., Dawson, KA., Lynch, I., 2013. Influence of the Physicochemical Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles on Amyloid  $\beta$  Protein Fibrillation in Solution, *ACS Chem. Neurosci.* 4, pp. 475-485.
- Cabaleiro-Lago, C., Quinlan-Pluck, F. and Lynch, I., 2008. Inhibition of amyloid beta protein fibrillation by polymeric nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 130, pp. 15437-15443.
- Cabaleiro-Lago, C., Szepankiewicz, O. and Linse, S., 2012. The effect of nanoparticles on amyloid aggregation depends on the protein stability and intrinsic aggregation rate. *Langmuir.* 28, pp. 1852-1857.
- Shahangian, SS., Rasti, B., Sajedi, RH., Khodarahmi, R., Taghdir, M. and Ranjbar, B., 2011. Artemin as an efficient molecular chaperone. *Protein J.* 30, P. 549.

## Ability of Silver Nanoparticles to Inhibit Amyloid Aggregation and their Potential Role in Prevention of Alzheimer's Disease

**Ramshini, H., Ph.D.** Associate Professor, Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran- Corresponding Author: ramshini@alumni.ut.ac.ir

**Moghaddasi, A-S., MSc.** Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran

Received: Aug 21, 2017

Accepted: Jun 13, 2017

### ABSTRACT

**Background and Aim:** The aggregation of misfolded proteins leads to various cellular malfunctions and disorders such as Alzheimer's disease. The conventional treatments of such diseases often fail due to their inability to cross the blood-brain barrier. The ability of nanoparticles to influence protein folding and aggregation and, as a result, their potential therapeutic effect in diseases involving protein aggregation, sounds promising. The objective of this study was to determine the effect of silver nanoparticles (AgNPs) on the amyloid aggregation of Hen Egg White Lysozyme (HEWL).

**Material and Methods:** Lysozyme was dissolved at 2 mg/mL in a 50 mM glycine buffer (pH 2.5) and incubated at 57 °C while being stirred gently with Teflon magnetic bar; the result was conversion of lysozyme to amyloid. The effect of the particles was assessed using different technics: Thioflavin T (ThT), Congo Red, atomic force microscopy (AFM) and Toxic test (MTT). Data were analyzed using SPSS 16, the statistical test being the independent t-test.

**Results:** Incubation of lysozyme with AgNPs at a concentration of 3-60 mcg/L could inhibit the HEWL fibrillation ( $p < 0.05$ ). Surprisingly, the lowest concentration (3 mcg/L) was found to be the most effective; at this concentration, the lag time (nucleation phase) became longer and the fibrillation phase considerably shortened. In addition, the cytotoxicity of the aggregated amyloids in the cell culture decreased.

**Conclusion:** Based on the findings, it is concluded that silver nanoparticle surfaces can act as nano-chaperones and inhibit HEWL fibrillation; thus, they can potentially be used in the treatment of Alzheimer's disease.

**Keywords:** Lysozyme, Amyloid Aggregation, Cell Cytotoxicity, Nanosilver