

اثر اندازه نانوذره‌های آهن بر ساختار و فعالیت لیزوزیم سفیده تخم مرغ

شقایق کیلاشکی

مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

حامد قنبری

دانشکده شیمی، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

علی اکبر صبوری

مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

حسین درخشان خواه*

مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

چکیده: نانوذره‌های اکسید آهن سوپرپارامغناطیس (SPIONs) با ترکیب مولکولی Fe_3O_4 برای برهمکنش‌های پروتئینی و مطالعه دارورسانی در نظر گرفته شد. با توجه به این که SPIONs در نانوپزشکی و سامانه‌های دارورسانی نقش چشمگیری دارند، بررسی برهمکنش بین SPIONs و یک پروتئین مدل و تغییرهای ساختاری و عملکردی آن می‌تواند در پژوهش‌های علمی روشنگر باشد. SPIONs با اندازه‌های ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ نانومتر انتخاب شدند. مطالعه طیف‌سنجی UV-visible، برهمکنش بین پروتئین-نانوذره را نشان داد. دورنگ نمایی دورانی به منظور اندازه‌گیری تغییرها در ساختار ثانویه لیزوزیم در برهمکنش با SPIONs استفاده شد و کاهش چشمگیری در ساختارهای مارپیچ پروتئین مشاهده شد. تجزیه و تحلیل خاموشی فلورسانس پروتئین به منظور درک ماهیت برهمکنش پروتئین-نانوذره مورد استفاده قرار گرفت. برهمکنش SPIONs و لیزوزیم ترکیبی از خاموش شدن دینامیک و استاتیک را نشان دادند. فعالیت و ویژگی‌های آنزیمی لیزوزیم متصل به SPIONs در مقایسه با لیزوزیم آزاد اندازه‌گیری شد. فعالیت به طور چشمگیری در هر اندازه از SPIONs کاهش یافته است، اما K_m تحت تاثیر شرایط گوناگون واکنش تغییر کرده است.

واژگان کلیدی: لیزوزیم، اکسید آهن سوپرپارامغناطیس، نانوذره‌ها، ساختار و عملکرد پروتئین، برهمکنش‌های نانو-زیستی

KEYWORDS: Lysozyme; Superparamagnetic iron oxide; Nanoparticles; Size effect; protein structure and function; Nano-Bio interactions

مقدمه

جذب برخی از پروتئین‌ها روی سطوح نانوذره‌ها ممکن است منجر به تغییرهایی در ساختار و فعالیت شود [۱، ۲]. این تغییرها به نوع پروتئین و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذره بستگی دارد [۳، ۴]. جذب سطحی پروتئین ابزار مفیدی را برای درک برهمکنش پروتئین-پروتئین [۵] معرفی می‌کند که جنبه اصلی بسیاری از عملکردهای پیچیده سلولی است [۶]. نانوذره‌ها به دلیل اندازه‌های گوناگون، دارای ویژگی‌های متمایزی در مقایسه با فرم توده‌ای یک ماده مشابه هستند، بنابراین پیشرفت‌های جدیدی در زمینه‌های زیست پزشکی، حسگرهای زیستی و نانو تکنولوژی زیستی ارائه می‌دهند. جذب پروتئین بر روی نانوذره‌ها و پیامدهای آن بر ساختار و عملکرد آن تا حد زیادی به اندازه و شکل نانوذره‌ها بستگی دارد [۷]. مطالعه برهمکنش ذره‌ها در اندازه نانو با پروتئین‌ها به دلیل کاربردهای آن در زمینه‌های متعددی از جمله ایمنی زیستی، علوم زیستی-نانو، نانو زیست پزشکی، فعالیت ساختار-عملکرد و نانو زیست فناوری اهمیت زیادی به خود جلب کرده است. اگرچه، وابستگی اندازه بر برهمکنش‌های نانوذره‌ها-پروتئین و اثرهای آن بر ساختار و عملکرد پروتئین نامشخص باقی مانده است. در کار حاضر، ما اثر اندازه نانوذره‌های اکسید آهن (Fe_3O_4) را بر پایداری و ساختار لیزوزیم سفیده تخم مرغ (HEWL) به عنوان پروتئین مدل بررسی کردیم [۸]. انگیزه سنتز انواع نانوذره‌های Fe_3O_4 از نظر اندازه و شکل به دلیل ویژگی‌ها و کاربردهای بالقوه آن‌ها در زمینه‌های گوناگون به دلیل غیرسمی بودن، سازگاری با محیط زیست، هزینه کم، پایداری بالا، مقاومت در برابر خوردگی در شرایط کاربردی، مورد توجه بوده است. اندازه، شکل و ریزساختار نانوذره‌های Fe_3O_4 به شدت به شرایط تجربی و مسیر سنتز اعمال شده وابسته است [۹].

از زمانی که الکساندر فلمینگ کشف کرد که لیزوزیم یک عامل باکتریولیتیک قوی در برابر باکتری‌های گرم-مثبت است، این پروتئین کاربردهای متنوعی در صنایع غذایی و بسته‌بندی پیدا کرد [۱۰]. لیزوزیم به طور طبیعی در ترش‌های محافظ حیوانات از جمله مخاط، اشک، بزاق و بافت‌های لنفاوی یافت شده است. علاوه بر این، در گرانول‌های سیتوپلاسمی ماکروفاژها و نوتروفیل‌های چند هسته‌ای نیز وجود دارد [۱۱]. این قابلیت آنزیمی که به هیدرولیز پیوند پپتیدوگلیکان بین N -استیل مورامیک اسید و چهارمین اتم کربن N -استیل گلوکز آمین کمک می‌کند، توانایی چشمگیری به

لیزوزیم می‌دهد تا پپتیدوگلیکان‌های موجود در دیواره سلولی باکتری‌های گرم-مثبت را تجزیه کند. علاوه بر نقش باکتریولیتیک ذکر شده، بر اساس شواهد گزارش شده از سایر پژوهش‌های فارماکولوژیک و فیزیولوژیکی با سوبستراهای گوناگون، ویژگی‌های دیگری از جمله اثرهای ضد التهابی، القای ایمنی ذاتی و فعالیت ضد ویروسی به لیزوزیم نسبت داده شده است [۱۲، ۱۳].

لیزوزیم (همچنین به عنوان مورامیداز یا N -استیل مورامید گلیکان هیدرولاز، EC 3.2.1.17 نیز شناخته می‌شود)، دارای ۱۲۹ آمینو اسید با pH ایزوالکتریک برابر با ۱۱/۱۶ و وزن مولکولی برابر با ۱۴۰۳۸۸ دالتون است که حدود ۳/۵ درصد از کل پروتئین‌های سفیده تخم مرغ را تشکیل می‌دهد [۱۴، ۱۵]. برخلاف بسیاری از پروتئین‌ها، ساختار سه‌بعدی لیزوزیم سفیده تخم مرغ در سال ۱۹۵۳ میلادی با استفاده از کریستالوگرافی اشعه ایکس آشکار شد و نشان داده شد که یک ساختار کروی زیر واحدی دارد که شامل دو دامنه است. یک دامنه از ۵ مارپیچ آلفا تشکیل شده است در حالی که دامنه دیگر شامل یک صفحه بتا و یک حلقه بلند است که در آن بین دو دامنه سایت فعال قرار دارد [۱۶]. به جز نقش فیزیولوژیکی آن، برخی از آزمایش‌های پاتوفیزیولوژیکی مستند، نگرانی‌هایی را در مورد این واقعیت ایجاد می‌کنند که تاکنون شش جهش پلی مورفیسم-وابسته طبیعی و همچنین جایگزینی آمینو اسید یگانه در ناحیه بتا آن منجر به ظهور صفحه‌های کوچک فیبریلاسیون شده است [۱۶]. به دلیل ویژگی‌های خاص آنزیم لیزوزیم از جمله سادگی خالص سازی، ساختار کریستالوگرافی مشخص، اندازه کوچک، حلالیت بالا [۱۷]، تاکنون مطالعه‌های زیست فیزیکی زیاد در مورد چین خوردگی/دنا توره شدن لیزوزیم [۱۸]، پایداری گرمایی، انعطاف پذیری ساختاری [۱۹] و همچنین خود تجمعی/تجمعی [۲۰] انجام شده است. این قابلیت‌های خاص، امکان استفاده از لیزوزیم را به عنوان مدلی برای بررسی برهمکنش‌های دوطرفه بین پروتئین و لیگاندها را افزایش می‌دهد. جالب است که وقتی صحبت از دارورسانی با واسطه فناوری نانو و نگرانی‌های نانو سم‌شناسی به میان می‌آید، پروتئین لیزوزیم به‌عنوان یک پروتئین نسبتاً فراوان، زمینه‌ای را برای پژوهش در ارتباط با نانو-زیستی ایجاد می‌کند که در آن برگشت‌پذیری اتصال، فارماکوکینتیک لیگاندها، و همچنین ارتباط بین ساختار-عملکرد پروتئین می‌تواند مورد بررسی قرار گیرد [۲۱-۲۳].

(۱) Hen egg-white lysozyme

جدول ۱. محاسبه جرم SPIONs

اندازه نانوذره‌ها (نانومتر)	حجم ذره‌ها ($4/3\pi r^3$) (سانتی‌متر مکعب)	تعداد Fe_3O_4	وزن ذره‌ها (گرم)
۲۰	$4/18 \times 10^{-18}$	$5/6639 \times 10^4$	$21/7 \times 10^{-18}$
۵۰	$10/45 \times 10^{-18}$	$14/1599 \times 10^4$	$54/4 \times 10^{-18}$
۱۰۰	$20/9 \times 10^{-18}$	$28/3197 \times 10^4$	$108/8 \times 10^{-18}$

مواد و روش‌ها

آنزیم لیزوزیم از سیگما خریداری شد. نانوذره‌ها در سه اندازه از شرکت مایکرومود خریداری شدند. نیل رد از فراورده‌های مرک تهیه شد. معرف‌های دیگر از درجه آنالیزی از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) بودند. تمام محلول‌ها به صورت تازه در آب دوبار تقطیر تهیه شدند.

محاسبه غلظت نانوذره‌ها

SPIONs به شکل ذره‌های کلوئیدی با فرمول مولکولی Fe_3O_4 هستند. دو روش برای اندازه‌گیری غلظت مولی نانوذره‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در روش اول، صرف نظر از تجمع‌های ذره‌های کلوئیدی، غلظت میلی‌گرم/میلی‌لیتر به غلظت مولی تبدیل می‌شود که در آن وزن مولکولی Fe_3O_4 پیش‌تر محاسبه شده است. این روش دارای یک اشکال است که در آن اندازه نانوذره‌ها نادیده گرفته می‌شود. با این حال، این نقطه ضعف ممکن است به عنوان یک ابزار قوی برای بررسی اثرهای اندازه نانوذره‌ها با وزن مولکولی و حالت مولکولی یکسان بر روی سطح قابل دسترس نانوذره‌ها برای برهمکنش با پروتئین‌ها تفسیر شود.

برای محاسبه تغییر در غلظت مولی، با فرض کروی بودن شکل نانوذره‌ها، تعداد مولکول‌های موجود در کره‌ای که اندازه آن برابر با نانوذره‌ها است، محاسبه شد. حجم هر مولکول Fe_3O_4 تقریباً $73/8 \times 10^{-24}$ سانتی‌متر مکعب گزارش شده است. جرم هر واحد حجمی معادل $3/45 \times 10^{-23}$ گرم و وزن مولکولی هر نانوذره در جدول ۱ نشان داده شده است. در مطالعه حاضر، محاسبه غلظت مولی نانوذره‌ها در معادله‌های خاموشی و همچنین محاسبه ثابت واکنش از روش دوم انجام شد.

اسپکتروفتومتری UV-Vis

در مورد پروتئین‌ها، به خوبی مستند شده است که ساختارهای حلقوی در آمینو اسیدهای آروماتیک قادر به جذب نور UV هستند

اخیرا در مورد ارتباط برهمکنش لیزوزیم با نانوذره‌های سیلیکا، مشاهده شده است که قرار گرفتن پروتئین در معرض نانوذره‌های سیلیکا آبدوست‌تر و اندازه کوچک‌تر، منجر به پایداری بیشتر در ساختارهای دوم و سوم لیزوزیم می‌شود. این رفتار مطابق با یافته‌های قطعی به دست آمده از برهمکنش نانوذره‌های سیلیکا با پروتئین RNase A بود که در آن نانوذره سیلیکا با سطح وسیع‌تر، منجر به بی‌ثباتی بیشتر در ساختار و عملکرد پروتئین شد [۲۵، ۲۴]. رشته‌های پروتئینی در اثر تا خوردن، آرایش فضایی خاصی می‌گیرند که تنها در آن ساختار می‌توانند در سامانه فیزیولوژی نقش بازی کنند [۲۶]. در مطالعه دیگری برهمکنش لیزوزیم با نانوذره‌های اکسید روی، با استفاده از فناوری‌های کالریمتری و همچنین اسپکتروفتومتری، تغییرهای ساختار دو/سه بعدی از روش محل سایت فعال تفسیر شد. اتصال مبتنی بر آنتالپی بین نانوذره‌های اکسید روی و لیزوزیم شاید نزدیک‌ترین ناحیه به محل فعال را در بر می‌گیرد که در آن محل تشکیل دایمر در یک ساختار همولوگ نیز وجود دارد. ترکیب‌های لیزوزیم-ZnO در مقایسه با پروتئین آزاد، پایداری بیشتری را در هنگام قرار گرفتن در معرض عامل‌های مختل کننده از خود نشان دادند که شاید به علت افزایش محتوای ماریچ آلفا در اثر متقابل است [۲۷]. نانوذره‌های آهن سوپرپارامغناطیس که زیست سازگاری بالا، رسانایی پارامغناطیس و قابلیت تنظیم اندازه/شکل دارند آن‌ها را به عنوان یکی از نانوذره‌های مورد تایید سازمان غذا و داروی آمریکا^۱ FDA برای تجسم مغناطیسی در محیط‌های بالینی تبدیل کرده است که به طور گسترده برای دارورسانی هدفمند، تشخیص و درمان مورد توجه قرار می‌گیرند [۲۸]. با این حال، هیچ پژوهشی در مورد برهمکنش لیزوزیم با نانوذره‌های اکسید آهن سوپرپارامغناطیس^۲ (SPIONs) انجام نشده است. در این مطالعه برای اولین بار، برهمکنش بین SPIONs و لیزوزیم به طور جامع بررسی شده است. با استفاده از چندین آنالیز اسپکتروفتومتری شامل UV-Vis، دورنگ نمایی دورانی^۳ و اسپکتروسکوپی فلورسانس، ارتباط ساختار-عملکرد پروتئین در حضور سه اندازه از SPIONs مورد بررسی قرار گرفت.

(۱) Food and Drug Administration

(۳) Circular dichroism

(۲) Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs)

نانوذره‌های متصل به آنزیم، مخلوط لیزوزیم و نانوذره‌ها انکوبه شده به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از اندازه‌گیری غلظت مایع رویی و نمونه شاهد با روش برادفورد، میزان جذب در سطح نانوذره‌ها تعیین شد و حجم رسوب به حدی تنظیم شد که غلظت آنزیم ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر شود.

دورنگ‌نمایی دورانی

در مطالعه عناصر ساختار ثانویه لیزوزیم با دورنگ‌نمایی دورانی، ما از دستگاه Aviv 215 در دمای اتاق و بازه طیفی طول موج ۱۹۰-۲۶۰ نانومتر استفاده کردیم که شامل UV نزدیک و UV دور^۴ است. نمونه شاهد برای پروتئین‌های آزاد و پنج غلظت از ترکیب نانوذره‌ها و لیزوزیم سفیده تخم مرغ برای سه اندازه از نانوذره‌ها تهیه شد، به طوری که غلظت پروتئین یکسان و معادل ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. برای سه اندازه، پنج نمونه دارای نانوذره‌های با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. برای تهیه تمام نمونه‌ها، لیزوزیم از همان استوک تهیه شد. نسبت‌های غلظت پروتئین به نانوذره‌ها شامل ۲:۱، ۳:۱، ۱:۱، ۵:۲ و ۱:۲ تهیه و اندازه‌گیری شد. این نسبت‌های غلظت بر اساس ارزیابی خاموشی فلورسانس انتخاب شدند که در آن آخرین نسبت غلظت کمی بالاتر از غلظت اشباع نانوذره‌ها/پروتئین‌ها است. SPIONs سیگنال دورنگ‌نمایی دورانی ندارند. سرانجام، به منظور بررسی ساختار ثانویه لیزوزیم در حضور نانوذره‌ها، پیک‌های خروجی دورنگ‌نمایی دورانی با برنامه SELCON3 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به منظور بررسی تغییرها در ساختار سوم لیزوزیم، از دستگاه Aviv 215 با تنظیمات طول موج ۳۲۰-۲۶۰ نانومتر در دمای اتاق (۲۵ درجه سلسیوس) استفاده شد. نمونه شاهد برای پروتئین‌های آزاد و هشت غلظت متشکل از نانوذره‌ها و لیزوزیم برای سه اندازه تهیه شد، به گونه‌ای که غلظت پروتئین در کل نمونه‌ها یکسان و معادل ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. هشت نمونه برای هر اندازه از نانوذره‌های دارای غلظت ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶ و ۰/۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند. برای همه نمونه‌ها از محلول استوک لیزوزیم یکسان استفاده شد. بر این اساس، نسبت غلظت‌های پروتئین به نانوذره‌ها شامل ۱:۱، ۲:۱، ۳:۱، ۴:۱، ۵:۱، ۶:۱ و ۷:۱ بود دوباره آماده شد. این نسبت غلظت‌ها تا حدی افزایش یافت که غلظت نانوذره‌ها در سیگنال دورنگ‌نمایی

و بنابراین این پارامتر می‌تواند رفتار پروتئین و به ویژه تغییرهای ساختاری بسیار واضحی را نشان دهد. این ارزیابی برای الف) تعیین غلظت نمونه‌ها و ساخت محلول‌هایی با غلظت‌های معین، ب) مطالعه برهمکنش بین نانوذره‌ها و پروتئین، ج) بررسی میزان جذب لیزوزیم در حضور SPIONs و سرانجام، د) مطالعه تغییرهای فعالیت لیزوزیم در اثر متقابل با نانوذره‌ها انجام شد [۲۹].

برهمکنش نانوذره‌ها با لیزوزیم

به منظور مطالعه برهمکنش بین نانوذره‌ها و لیزوزیم، جذب اسپکتروفتومتری لیزوزیم در ناحیه ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر در حضور/غیاب SPIONs ثبت شد. غلظت لیزوزیم در همه نمونه‌ها ۰/۱۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و همه نمونه‌ها از یک استوک لیزوزیم تهیه شدند. در نمونه‌های دارای نانوذره‌ها غلظت نهایی ۰/۰۸۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

سنجش میزان لیزوزیم جذب شده روی سطح SPIONs

برای بررسی میزان جذب پروتئین‌ها در سطح نانوذره‌ها، غلظت یکسان از سه اندازه SPIONs به محلول لیزوزیم اضافه شد. با استفاده از روش برادفورد و منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی^۱ (BSA)، پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون روی یخ، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند تا پروتئین‌های آزاد در مایع رویی باقی بمانند و پروتئین‌هایی که به نانوذره‌ها متصل شدند با رسوب‌ها جدا شدند. سپس غلظت پروتئین‌های آزاد در مایع رویی با استفاده از روش برادفورد تعیین شد. تفاوت بین غلظت مایع رویی و غلظت نمونه اول، میزان پروتئین جذب شده روی نانوذره‌ها را نشان می‌دهد.

مطالعه تغییرهای فعالیت لیزوزیم بر اثر برهمکنش با نانوذره‌ها

مرحله‌های سنجش آنزیمی لیزوزیم بر اساس دستورالعمل کتاب ورثینگتون^۲ اجرا شد [۳۰]. استوک میکروکوکوس لیزودیکتیوکوس^۳ با غلظت ۰/۳۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات (pH=۷/۴) به عنوان سوپسترا در نظر گرفته شد. با استفاده از طیف‌سنجی UV-Vis در طول موج ۴۵۰ نانومتر، تغییرها در جذب میکروکوکوس لیزودیکتیوکوس مشاهده شد. بنابراین، فعالیت آنزیم از روش کاهش جذب سوپسترا دنبال شد. هر مخلوط برای هر سنجش دارای ۵۰۰ میلی‌لیتر حجم بود، در حالی که برای آنزیم از استوک ۵ میلی‌لیتر ساخته شده ۰/۵ گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. به منظور تعیین

(۱) Bovine serum albumin

(۳) Micrococcus lysodeikticus

(۲) Worthington book's

(۴) Near and Far-UV

خاموشی فلورسانس و محاسبه ثابت این برهمکنش مورد استفاده قرار گرفت. براساس معادله شماره ۲، k_{sv} ، τ و Q به ترتیب ثابت خاموشی، ثابت استرن-ولمر، طول عمر حالت برانگیخته تابشی و غلظت خاموش کننده را نشان می‌دهند [۳۱، ۳۲].

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (2)$$

با این حال، از آن جایی که انتظار نمی‌رود این معادله برای برهمکنش دینامیکی و دینامیکی جزئی خطی باشد، معادله اصلاح شده استرن-ولمر توجه زیادی را به خود جلب کرد [۳۳-۳۵].

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a K_{sv} [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (3)$$

در این معادله f_a کسری از فلورسانس اولیه است که برای خاموش کننده قابل دسترسی است.

سنجش Nile Red

برای سنجش آنیزوتروپی Nile Red، از Carry Eclipse ساخته شده توسط شرکت Varian مجهز به قطب‌سنج دستی استفاده شد. از استوک ۲ میکرومولار Nile Red استفاده شد. آنیزوتروپی لیزوزیم آزاد و در حضور هر یک از انواع نانوذره‌ها اندازه‌گیری شد، در حالی که غلظت لیزوزیم و هر نانوذره یکسان و معادل ۰/۰۵ و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نگهداری شد. طول موج تحریکی ۵۵۰ نانومتر بود، در حالی که نور ساطع کننده در بازه ۸۰۰-۵۷۰ نانومتر ثبت شد. غلظت‌ها بر اساس نسبت غلظت اشباع که با داده‌های خاموشی فلورسانس به دست آمد تعیین شد.

نتیجه‌ها و بحث

اندازه‌گیری جذب لیزوزیم در حضور SPIONs

نانوذره‌ها با غلظت ۰/۴۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با لیزوزیم با غلظت ۰/۳۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آنکوبه شدند. پس از سانتی‌فیوژ، اختلاف غلظت بین استوک و مایع رویی محاسبه شد. در جدول ۲ این تفاوت به عنوان درصد جذب لیزوزیم گزارش شده است. این جدول درصد جذب لیزوزیم را در سطح SPIONs با اندازه‌های گوناگون را نشان می‌دهد. با توجه به غلظت مولی و اندازه نانوذره‌ها، مساحت موجود هر نانوذره در محلول محاسبه شد. همان‌گونه که نشان می‌دهد، درصد جذب لیزوزیم در حضور نانوذره‌ها به طور

دورانی نوین ایجاد نکرد. بنابراین، غلظت نانوذره‌های نهایی، غلظت محلول نانوذره‌های اشباع شده نیست.

مطالعه فلورسانس

مولکول‌های متعدد و همچنین پروتئین‌ها دارای کروموفورهایی هستند که به موجب آن می‌توانند طول موج خاصی از نور را جذب کنند. آن‌ها را می‌توان به دو نوع ذاتی^۱ و بیرونی^۲ طبقه‌بندی کرد. آمینو اسیدهای آروماتیک شامل فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین فلورسانس ذاتی هستند در حالی که آمینو اسیدهای خارجی گونه‌هایی هستند که برای تولید فلورسانس در طول موج مشخصی به نمونه‌ها اضافه می‌شوند. به عنوان مثال، تیوفلاوین^۳ رنگی است که به طور گسترده برای فرایند فیبریلاسیون در پروتئین‌ها و پپتیدها استفاده می‌شود.

مطالعه خاموشی فلورسانس SPIONs

این مورد برای تجزیه و تحلیل رفتار خاموشی فلورسانس پروتئین و همچنین به دست آوردن پارامترهای خاموشی و اتصال نانوذره‌ها انجام شد. فلورسانس ذاتی لیزوزیم به علت آمینو اسیدهای حلقوی و ویژه تریپتوفان است. از بین ۵ آمینو اسید تریپتوفان، سه مورد از آن‌ها شامل Trp62، Trp108 و Trp63 روی سطح و محل فعال قرار دارند و نقش مهمی در این سناریو دارند. تیتراسیون لیزوزیم با سه اندازه نانوذره در دماهای ۲۵، ۳۷ و ۵۰ درجه سلسیوس انجام شد و شدت فلورسانس پروتئین بررسی شد. این آزمایش با استفاده از دستگاه Carry Eclipse انجام شد. نمونه لیزوزیم ۴۵۰ میکرولیتری با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی استوک نانوذره‌ها با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تیتراژ شد. پس از هر بار افزودن نانوذره‌ها، چهار دقیقه به مخلوط زمان داده شد تا به تعادل برسد. نانوذره‌ها در غلظت نهایی خود هیچ سیگنال فلورسانسی را نشان ندادند. با فرض ماهیت متعادل اتصال بین پروتئین و نانوذره‌ها، معادله خاموش کردن فلورسانس را می‌توان با استفاده از معادله شماره ۱ محاسبه کرد، که در آن F_0 و F به ترتیب شدت فلورسانس را در غیاب و حضور نانوذره‌ها با غلظت ارایه شده نشان می‌دهند.

$$Q = \frac{F_0 - F}{F_0} \quad (1)$$

علاوه بر این، معادله استرن-ولمر^۴ برای بررسی سازوکار

(۱) Intrinsic

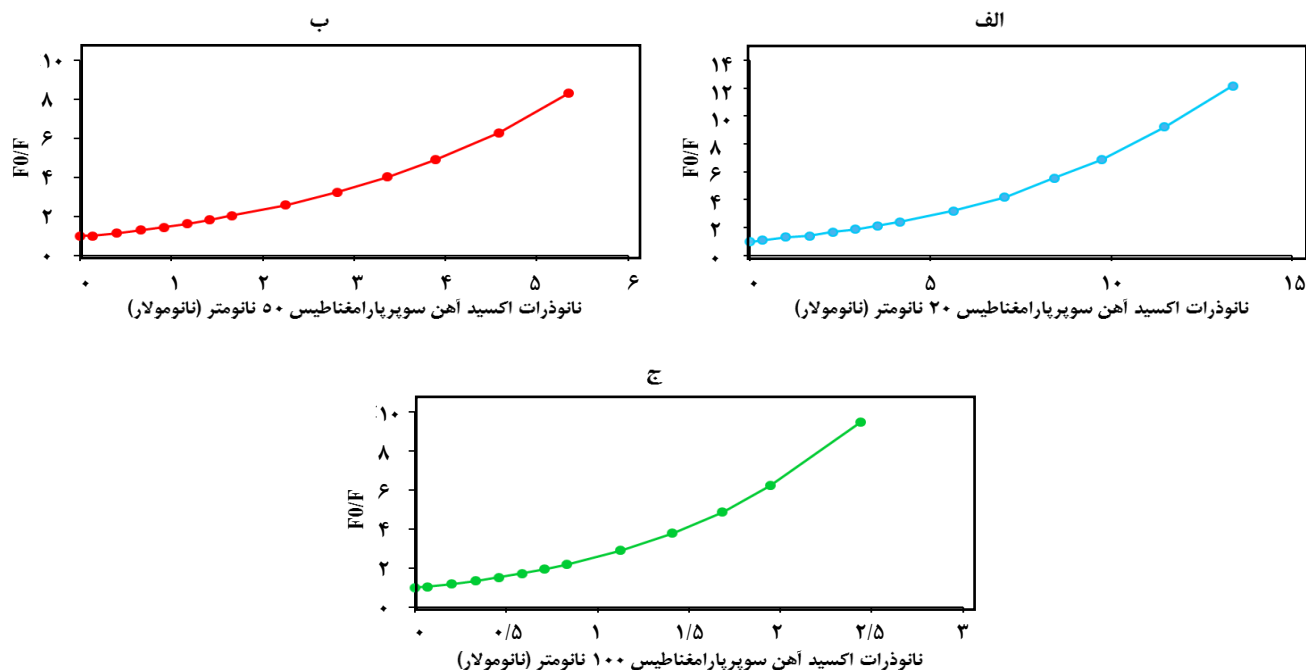
(۳) Thioflavin T

(۲) Extrinsic

(۴) Stern-Volmer equation

جدول ۲. درصد جذب لیزوزیم در سطح SPIONs

اندازه نانوذره (نانومتر)	درصد جذب لیزوزیم در سطح ۰/۴ میلی گرم نانوذره	مساحت سطح نانوذره‌ها
۲۰	۸/۶۴ %	۲/۷۲
۵۰	۱۲/۳ %	۵/۵۳
۱۰۰	۱۵/۸ %	۱۱/۳۴



شکل ۱. نمودار استرن-ولمر مربوط به تیتراسیون لیزوزیم با SPIONs در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با اندازه‌های (الف) ۲۰، (ب) ۵۰ و (ج) ۱۰۰ نانومتر

شده است، نمودار استرن-ولمر هیچ یک از نانوذره‌های شکل خطی را در هر دمای معین نشان نمی‌دهند. از آنجایی که نمودار به سمت محور عمودی منحرف می‌شود، پیشنهاد می‌شود که سازوکار خاموشی شامل حالت‌های دینامیک و استاتیک باشد.

مطالعه برهمکنش بین نانوذره‌ها و لیزوزیم

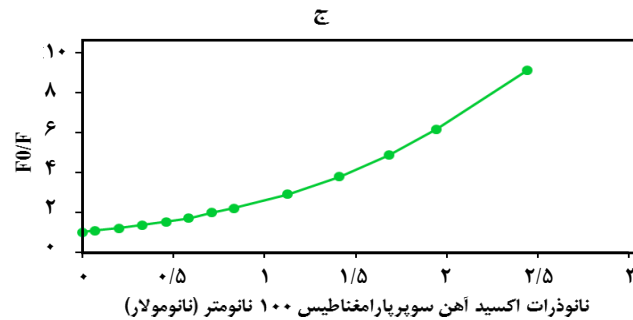
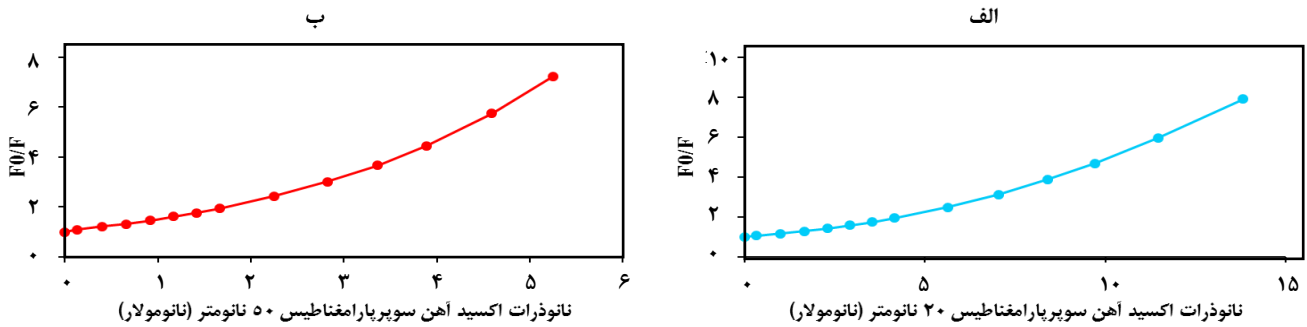
اثبات تشکیل کمپلکس از روش طیف‌سنجی UV-Visible

پروتئین خالص به دلیل وجود آمینو اسیدهای آروماتیک و پیوندهای دی سولفید دارای بیشترین جذب در ۲۸۰ نانومتر است که در آن شدت جذب با غلظت پروتئین به صورت خطی ارتباط دارد. هر تغییر در چین خوردگی لیزوزیم و همچنین برهمکنش ریزمحیط اطراف سطح آمینو اسیدها باعث تغییر شدت جذب در ۲۸۰ نانومتر می‌شود. شکل‌های ۴ و ۵ طیف جذب لیزوزیم را با غلظت ۰/۱۷ میلی گرم بر میلی لیتر در حالت آزاد و در حضور ۰/۰۸۵ میلی گرم بر میلی لیتر نانوذره نشان می‌دهد.

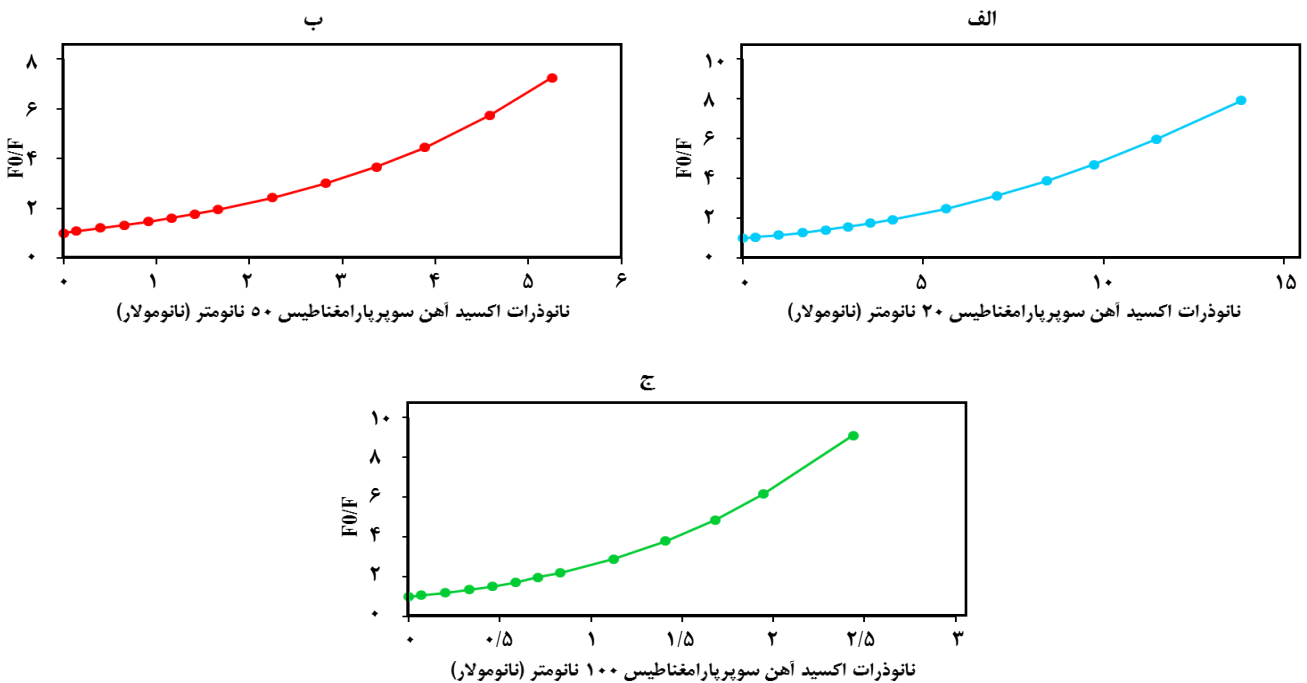
مستقیم با مساحت سطح نانوذره‌ها در ارتباط است. با توجه به این واقعیت که نانوذره‌های انتخاب شده بیشترشان مشابه هستند اما اندازه‌های متفاوتی دارند، انتظار می‌رود که جذب لیزوزیم فقط به اندازه نانوذره‌ها بستگی داشته باشد. جدول ۲ ارتباط مستقیم بین مساحت سطح نانوذره‌ها را نشان می‌دهد.

سازوکار خاموشی نانوذره‌ها

نانوذره‌ها می‌توانند فلورسانس پروتئین را از روش ایجاد یک کمپلکس پایدار خاموش کنند و بر اساس داده‌های ما، برهمکنش بین SPIONs و لیزوزیم به صورت استاتیک است. با این حال، سازوکار خاموشی دیگری که به عنوان حالت دینامیکی برخورد شناخته می‌شود، از برخورد تصادفی لیگاندها با کروموفور به دست می‌آید. در این پژوهش برای بررسی کمپلکس پایدار بین نانوذره‌ها و پروتئین، مدل برهمکنش استاتیکی اتخاذ شده است. برای بررسی سازوکار، نمودار استرن-ولمر ترسیم شد. همان‌گونه که در شکل‌های ۳-۱ نشان داده



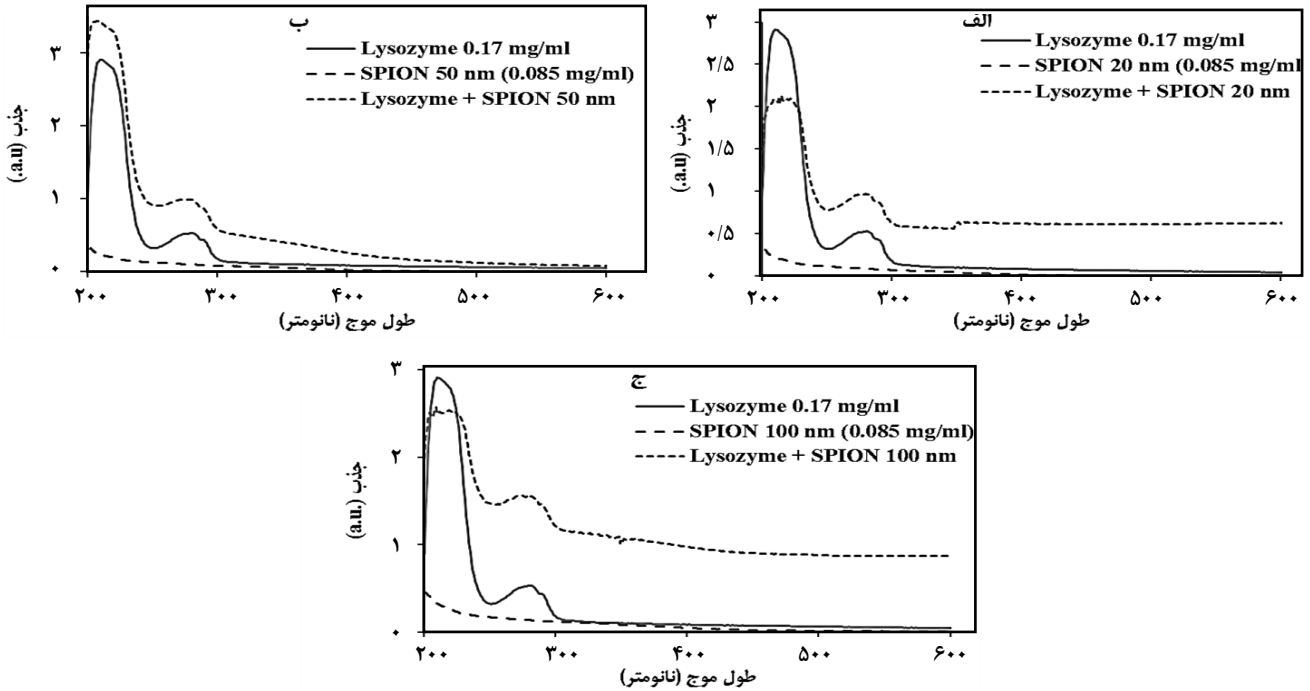
شکل ۲. نمودار استرن-ولمر مربوط به تیتراسیون لیزوزیم با SPIONs در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با اندازه‌های (الف) ۲۰، (ب) ۵۰ و (ج) ۱۰۰ نانومتر



شکل ۳. نمودار استرن-ولمر مربوط به تیتراسیون لیزوزیم با SPIONs در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد با اندازه‌های (الف) ۲۰، (ب) ۵۰ و (ج) ۱۰۰ نانومتر

یک کمپلکس پایدار شامل پروتئین‌ها و نانوذره‌ها تشکیل می‌شود. تشکیل کمپلکس پایدار در اثر تغییر در محیط آمینو اسیدهای آروماتیک یا باز شدن ساختار پروتئین منجر به افزایش یا کاهش جذب پروتئین در ۲۸۰ نانومتر می‌شود. علاوه بر این، با قرار گرفتن

بیشترین جذب لیزوزیم در حضور نانوذره‌ها تغییر چشمگیری دارد و همچنین از جذب ترکیب پروتئین‌ها و نانوذره‌ها پیشی می‌گیرد. این پدیده نشان می‌دهد که افزودن نانوذره‌ها به محیط پروتئین با برهمکنش بین پروتئین و نانوذره‌ها همراه بوده است به طوری که

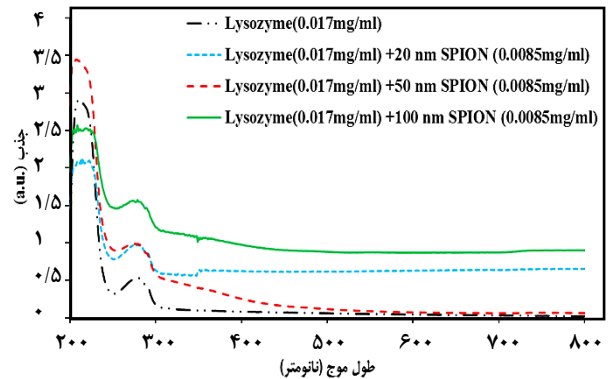


شکل ۴. طیف‌سنجی جذب لیزوزیم در حضور SPIONs با سه اندازه (الف) ۲۰، (ب) ۵۰ و (ج) ۱۰۰ نانومتر همراه با کنترل‌های لیزوزیم و نانوذره

نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل ۴ نشان داده شده است، در حضور نانوذرها با اندازه ۵۰ نانومتر، ارتفاع پیک افزایش می‌یابد در حالی که در حضور نانوذرها با اندازه‌های ۲۰ و ۱۰۰ نانومتر، ارتفاع پیک به طور چشمگیری کاهش می‌یابد. این مشاهده‌ها نشان می‌دهد که نانوذرها با اندازه ۲۰ و ۱۰۰ نانومتر تاثیرهای متفاوتی بر ساختار لیزوزیم دارند.

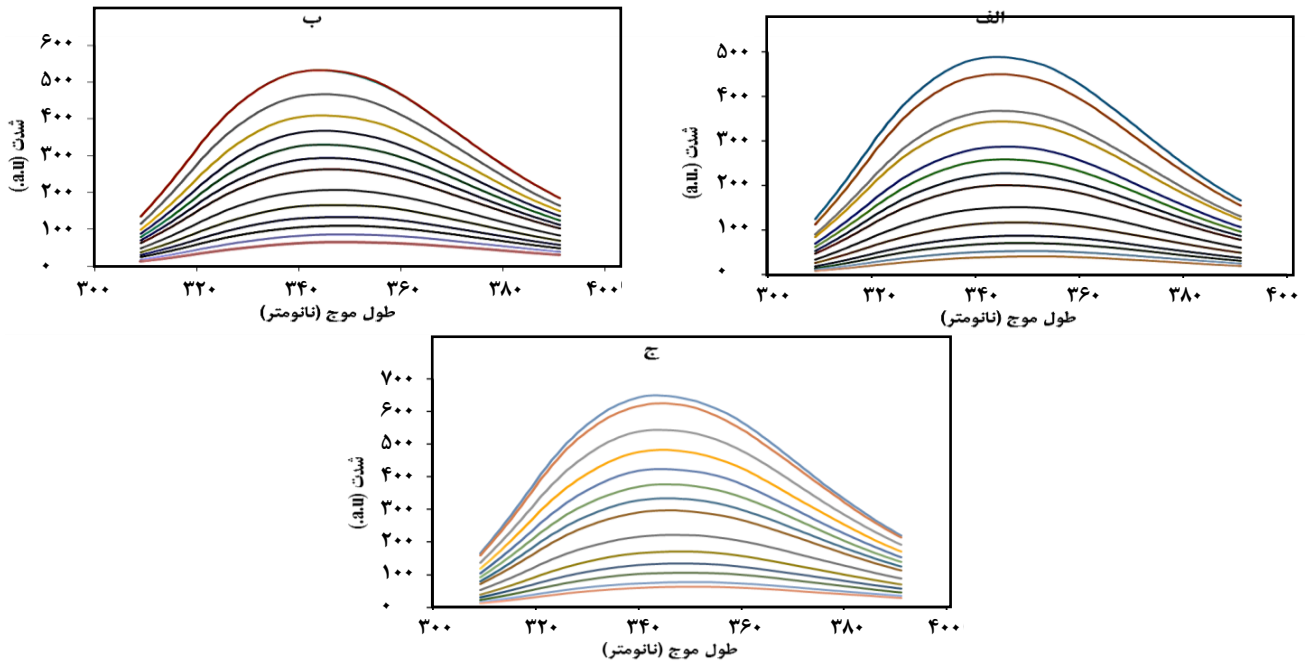
مطالعه تشکیل کمپلکس از روش طیف‌سنجی فلورسانس

فلورسانس ذاتی تریپتوفان بیشتر به محیط اطراف آن بستگی دارد. هر چه اسید آمینه‌های تریپتوفان بیشتر در معرض حلال باشد، فلورسانس ذاتی کمتری مشاهده می‌شود. علاوه بر این، برهمکنش باقی‌مانده‌های تریپتوفان با یکدیگر، فلورسانس ذاتی را کاهش می‌دهد. بنابراین، تغییرهای ساختاری لیزوزیم از این دیدگاه قابل بررسی است. طیف فلورسانس ذاتی لیزوزیم در سه دمای ۲۵، ۳۷ و ۵۰ درجه سلسیوس ثبت شد. بیشترین پیک جذبی آنزیم لیزوزیم در ۳۴۴ نانومتر اتفاق می‌افتد. در هر یک از سه نوع نانوذره و هر یک از سه دما، افزایش غلظت نانوذرها منجر به کاهش فلورسانس ذاتی می‌شود که تغییرهای ساختاری در برهمکنش لیزوزیم با نانوذرها را نشان می‌دهد. پیشنهاد می‌شود که ساختار لیزوزیم در طول اتصال به SPIONs، تحت باز شدن قرار گرفته و در آن تریپتوفان‌ها در معرض حلال قرار گرفته و فلورسانس ذاتی خود را از دست می‌دهند.

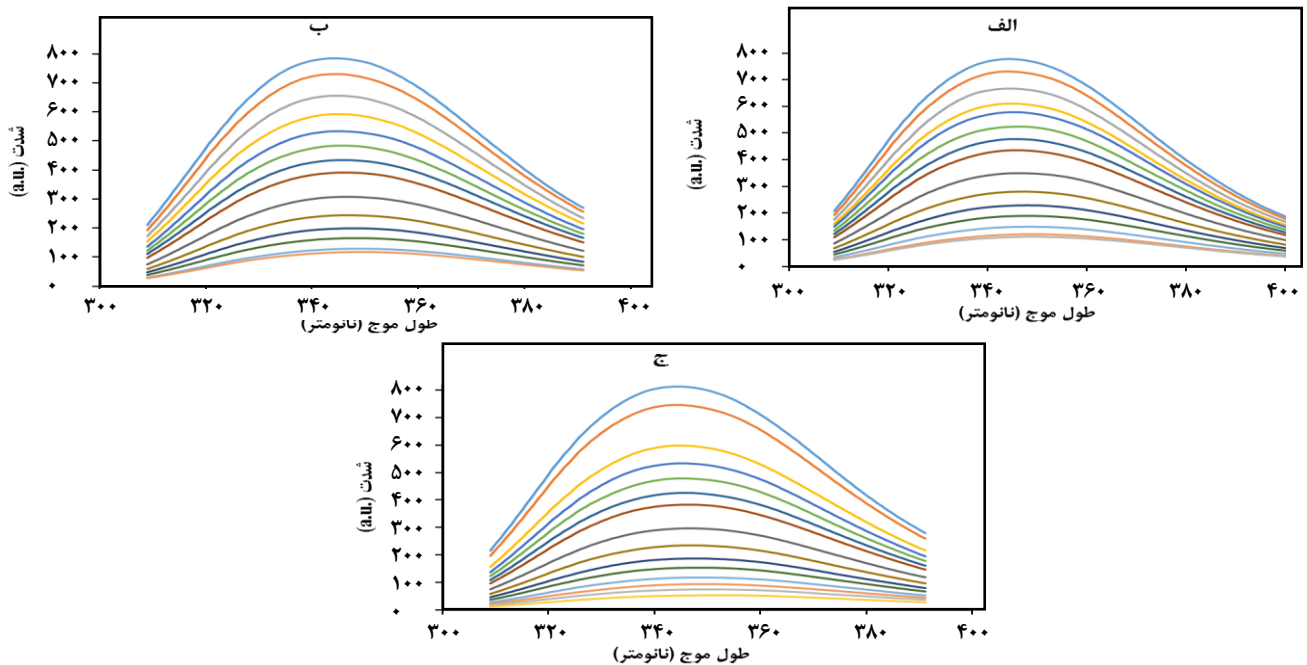


شکل ۵. تغییر در طیف جذب لیزوزیم در حالت آزاد و در حضور سه اندازه SPIONs

لیزوزیم در برابر نانوذرها با اندازه ۱۰۰ و ۵۰ نانومتر، پیک لیزوزیم به ترتیب از ۲۸۱ نانومتر به ۲۷۸ و ۲۷۴ نانومتر تغییر کرد. این پیک پس از برهمکنش با نانوذرها پهن‌تر شد. این تغییرها شامل تغییرهای پیک جذب و پیک در حال پهن شدن، بر تغییرهای محیطی در مجاورت آمینو اسیدهای آروماتیک دلالت دارد. به دنبال تشکیل کمپلکس بین نانوذرها و پروتئین و متعاقب آن تغییرهای ساختاری لیزوزیم در مقایسه با وضعیت عادی، محیط اطراف آمینو اسیدها تغییر می‌کند و در نتیجه پیک جذب تغییر می‌کند. پروتئین‌ها پیک جذب دیگری در ۲۲۰ نانومتر دارند که از پیوند پپتیدی می‌آید. تغییرها در این پیک فروپاشی در ساختار پروتئین را



شکل ۶. طیف فلورسانس ذاتی لیزوزیم در حضور نانوذره‌ها با سه اندازه (الف) ۲۰، (ب) ۵۰ و (ج) ۱۰۰ نانومتر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس



شکل ۷. طیف فلورسانس ذاتی لیزوزیم در حضور نانوذره‌ها با سه اندازه (الف) ۲۰، (ب) ۵۰ و (ج) ۱۰۰ نانومتر در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

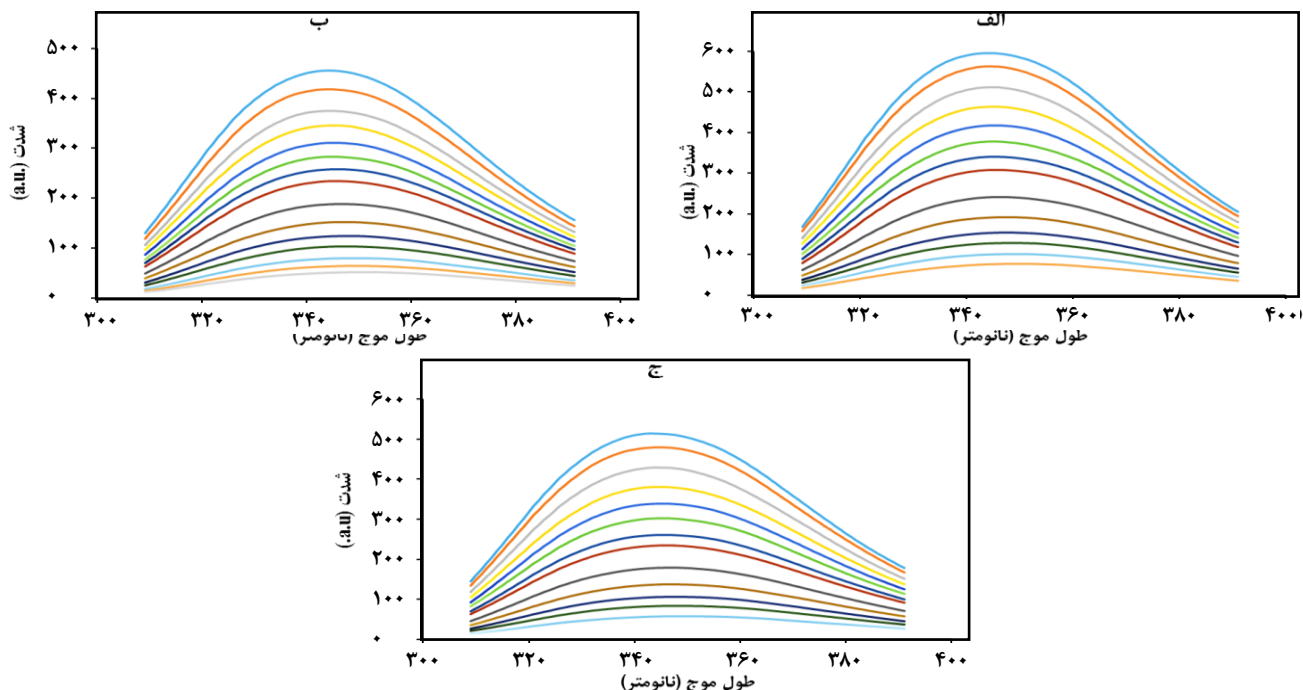
ثابت ارتباط حالت پایه است.

$$K_{app} = \left[\frac{F_0}{F} - 1 \right] \frac{1}{[Q]} = (K_D + K_S) + K_D K_S [Q] \quad (4)$$

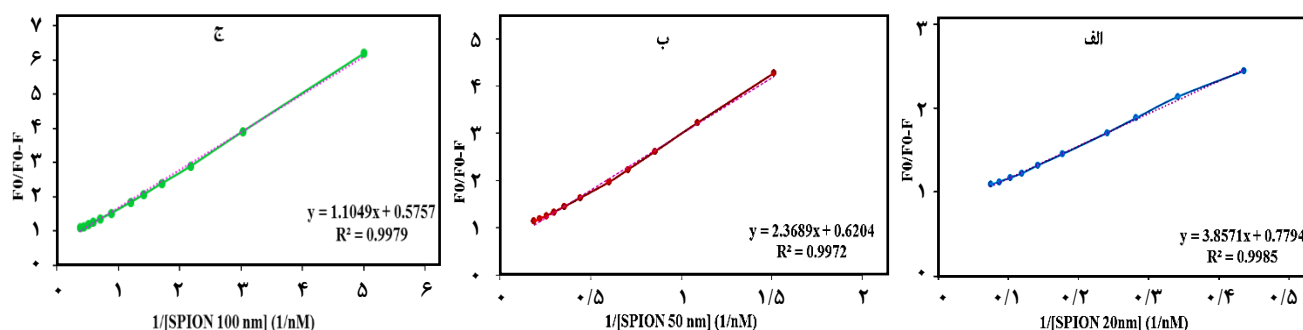
پس از ترسیم نمودارهای مربوط به معادله شماره ۴ (دیتا نشان داده نشد)، تقریباً تمام نمودارها در نقاط ابتدایی مربوط به

محاسبه ثابت‌های خاموشی برهمکنش نانوذره‌ها با آنزیم

برای رویکرد سازوکاری دقیق‌تر در خاموشی، نمودار مربوط به پارامترهای استرن-ولمر و پارامترهای مربوط به سازوکار خاموشی برهمکنش نانوذره‌ها-پروتئین با استفاده از معادله شماره ۴ بررسی شد [۳۶]. در این معادله K_D و K_S به ترتیب ثابت استرن-ولمر و



شکل ۸. طیف فلورسانس ذاتی لیزوزیم در حضور نانوذرها با سه اندازه (الف) ۲۰، (ب) ۵۰ و (ج) ۱۰۰ نانومتر در دمای ۵۰ درجه سلسیوس



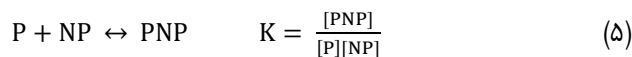
شکل ۹. نمودار اصلاح شده معادله استرن-ولمر برای تیتراسیون با نانوذرها با سه اندازه (الف) ۲۰، (ب) ۵۰ و (ج) ۱۰۰ نانومتر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس

دلیل عدم حلالیت مناسب نانوذرها در غلظت‌های پایین باشد. این اتفاق از نانوذره‌هایی سرچشمه می‌گیرد که هنوز توسط مولکول‌های آب هیدراته نشده‌اند [۸].

برای به دست آوردن ثابت خاموشی (k_q)، نمودار استرن-ولمر اصلاح شده مطابق شکل‌های ۹-۱۱ ترسیم شد.

جدول ۳ مقدارهای K_{sv} و k_q را برای برهمکنش‌های نانوذره-پروتئین نشان می‌دهد. نیمه عمر لیزوزیم در پلاسما به طور متوسط ۷۵ دقیقه در نظر گرفته شد [۳۸]. همان‌گونه که نشان داده شد، همه مقدارهای k_q از بیشترین مقدار ثابت تعادل برای خاموشی دینامیکی که معادل 1×10^{10} 1/M.s بود، فراتر رفت. بنابراین، ممکن است

غلظت‌های اولیه نانوذره‌ها، روند منطقی را نشان نمی‌دهند. با فرض تعادل برای برهمکنش تشکیل کمپلکس نانوذره-پروتئین، به نظر می‌رسد که بر اساس اصل لوشاتلیه [۳۷] که در معادله ۵ نشان داده شده است، افزایش غلظت نانوذره باعث تغییر تعادل برای ایجاد تشکیل بیشتر کمپلکس می‌شود. با توجه به این مورد، ثابت واکنش در نتیجه افزایش می‌یابد.

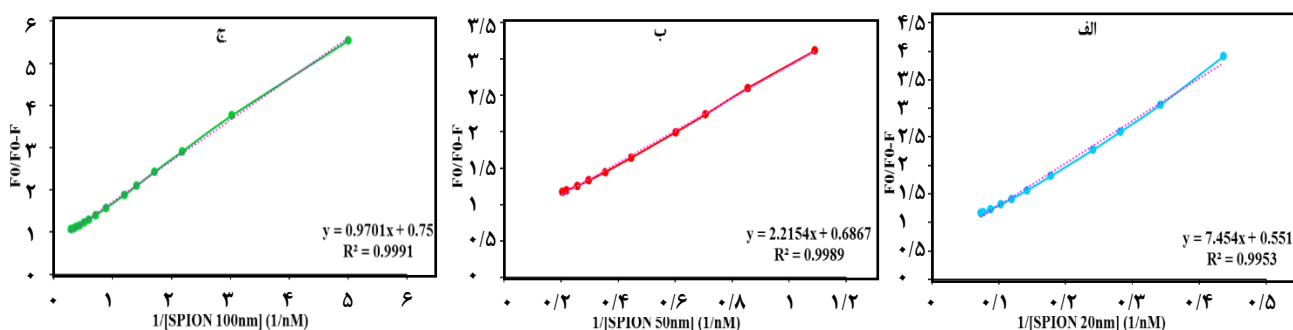


کاهش ثابت واکنش ظاهری مربوط به غلظت کم نانوذره‌ها، عدم پیشرفت فرایند واکنش را نشان می‌دهد که ممکن است به

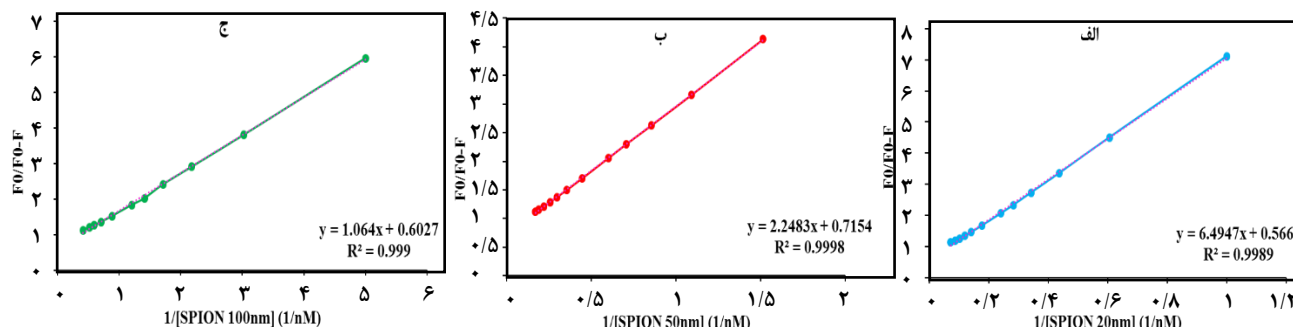
(۱) Le Chatelier

جدول ۳. مقدارهای K_{SV} و k_q برای برهمکنش‌های بین لیزوزیم و نانوذره‌ها با سه اندازه (۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ نانومتر) در دماهای ۲۵، ۳۷ و ۵۰ درجه سلسیوس نشان داده شده است

نانوذره‌ها (نانومتر)	دما (کلوین)	K_{SV} (1/M)	k_q (1/M.s)	f_a	R^2
۲۰	۲۹۸	19×10^{-7}	$10^{-2} \times 10^{-16}$	۱/۲۸	۰/۹۹
۲۰	۳۱۰	$7/8 \times 10^{-7}$	$4/12 \times 10^{-16}$	۱/۸	۰/۹۹
۲۰	۳۲۳	$9/3 \times 10^{-8}$	$5/0.2 \times 10^{-16}$	۱/۷۸	۰/۹۹
۵۰	۲۹۸	$3/12 \times 10^{-8}$	$1/68 \times 10^{-17}$	۱/۶	۰/۹۹
۵۰	۳۱۰	$3/4 \times 10^{-8}$	$1/83 \times 10^{-17}$	۱/۴۷	۰/۹۹
۵۰	۳۲۳	$3/5 \times 10^{-8}$	$1/89 \times 10^{-17}$	۱/۴	۰/۹۹
۱۰۰	۲۹۸	$5/7 \times 10^{-8}$	$3/0.8 \times 10^{-17}$	۱/۷۵	۰/۹۹
۱۰۰	۳۱۰	$7/7 \times 10^{-8}$	$4/16 \times 10^{-17}$	۱/۳	۰/۹۹
۱۰۰	۳۲۳	$6/25 \times 10^{-8}$	$3/38 \times 10^{-17}$	۱/۶	۰/۹۹



شکل ۱۰. نمودار اصلاح شده معادله استرن-ولمر برای تیتراسیون با نانوذره‌ها با سه اندازه (الف) ۲۰، (ب) ۵۰ و (ج) ۱۰۰ نانومتر در دمای ۳۷ درجه سلسیوس



شکل ۱۱. نمودار اصلاح شده معادله استرن-ولمر برای تیتراسیون با نانوذره‌ها با سه اندازه (الف) ۲۰، (ب) ۵۰ و (ج) ۱۰۰ نانومتر در دمای ۵۰ درجه سلسیوس

محل‌های اتصال (n) نشان داده شده است. این معادله برای ارزیابی پارامترهای دینامیکی کمپلکس لیگاند-پروتئین اعمال شده است [۴۰]. هم‌دما جذب لانگمویر برای به دست آوردن ثابت ارتباط ظاهری K_a ، و مکان‌های اتصال n اعمال می‌شود. از این رو، هدف از انجام این محاسبات مقایسه نانوذره‌ها و دماهای آزمایش بوده است و ثابت‌ها به صورت K_a^{app} و تعداد جایگاه‌ها به صورت n^{app} نمایش داده شدند. جدول ۴ واکنش ثابت ظاهری سه اندازه نانوذره‌ها را در دماهای گوناگون نشان می‌دهد.

که برهمکنش استاتیکی اتفاق افتاده و یک کمپلکس پروتئین-نانوذره تشکیل شده است. برای دستیابی به مقدارهای جایگاه‌ها و بررسی ثابت‌های خاموشی استاتیک، از معادله شماره ۶ استفاده کرده‌ایم [۳۹].

$$\frac{F_0}{F} = \frac{F_0[Q]}{F_0 - F} K_a - nK_a [P]_t \quad (6)$$

در این معادله، ثابت ظاهری اتصال به لیزوزیم معادل غلظت نانوذره‌ها $[Q]$ ، غلظت نهایی پروتئین در واکنش مخلوط $[P]_t$ و تعداد

جدول ۴. مقادیرهای ثابت واکنش ظاهری و تعداد محل‌های اتصال در برهمکنش بین نانوذره‌ها با سه اندازه

نانوذره‌ها (نانومتر)	دما (کلوین)	$K_a^{app} (1/M)$	n^{app}	R^2
۲۰	۲۹۸	1×10^9	1×10^{-3}	۰/۹۶
۲۰	۳۱۰	0.8×10^9	$1/2 \times 10^{-3}$	۰/۹۹
۲۰	۳۲۳	0.8×10^9	1×10^{-3}	۰/۹۹
۵۰	۲۹۸	2×10^9	0.41×10^{-3}	۰/۹۸
۵۰	۳۱۰	2×10^9	0.35×10^{-3}	۰/۹۸
۵۰	۳۲۳	2×10^9	0.4×10^{-3}	۰/۹۵
۱۰۰	۲۹۸	5×10^9	0.31×10^{-3}	۰/۹۷
۱۰۰	۳۱۰	5×10^9	0.24×10^{-3}	۰/۹۴
۱۰۰	۳۲۳	5×10^9	0.18×10^{-3}	۰/۹۷

جدول ۵. مقادیرهای معکوس محل‌های اتصال را نشان می‌دهد که میزان لیزوزیم متصل به نانوذره می‌باشد. این اعداد ارتباط بین تعداد مولکول‌های جذب شده و اندازه آن‌ها را توضیح می‌دهند

نانوذره‌ها (نانومتر)	دما (کلوین)	$1/n^{app}$
۲۰	۲۹۸	1×10^3
۲۰	۳۱۰	0.8×10^3
۲۰	۳۲۳	1×10^3
۵۰	۲۹۸	$2/4 \times 10^3$
۵۰	۳۱۰	$2/8 \times 10^3$
۵۰	۳۲۳	$2/5 \times 10^3$
۱۰۰	۲۹۸	$4/7 \times 10^3$
۱۰۰	۳۱۰	$4/2 \times 10^3$
۱۰۰	۳۲۳	$5/5 \times 10^3$

حاکی از واکنش اتصال خود به خود بین پروتئین و نانوذره‌ها است. همان‌گونه که در جدول ۶ ارایه شده است، مقادیرهای منفی ΔH° به حضور نیروهای آگریز از روش برهمکنش‌های نانوذره-پروتئین بستگی دارد، یعنی پنهان کردن ناحیه‌های آگریز لیزوزیم در حین برهمکنش با نانوذره‌ها باعث پایداری بیشتر پروتئین می‌شود و آنتالپی مربوط به واکنش تشکیل کمپلکس کمتر از صفر خواهد بود.

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (۸)$$

بررسی تغییر ساختار دوم لیزوزیم‌ها در برهمکنش با SPIONs

طیف دورنگ نمایی دورانی از ۱۹۰ تا ۲۶۰ نانومتر ثبت شد. یک پیک منفی مشخص در ۲۰۸ نانومتر وجود ساختارهای ماریچ آلفا را نشان می‌دهد، در حالی که یک پیک منفی پهن در ۲۲۲ نانومتر

همان‌گونه که گفته شد، غلظت مولی از روش دوم که ذره‌های کلئیدی را به عنوان اجزای تشکیل دهنده نانوذره‌ها در نظر گرفته شد، محاسبه شد. بر این اساس، انتظار می‌رود تعداد بی‌شماری مولکول لیزوزیم با هر نانوذره پیوند برقرار کنند. داشتن تعداد پیوند کمتر از یک، این واقعیت را تأیید می‌کند. اگر تعداد پیوند برهمکنش نانوذره-پروتئین وارونه شود، تعداد لیزوزیم‌های پیوند شده با نانوذره‌ها را می‌توان به دست آورد.

مقادیرهای معکوس محل‌های اتصال را نشان می‌دهد که میزان لیزوزیم متصل به نانوذره را نشان می‌دهد. این اعداد ارتباط بین تعداد مولکول‌های جذب شده و اندازه آن‌ها را توضیح می‌دهند (جدول ۵).

محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی

محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی می‌تواند سرخ‌های مهمی برای تعیین ماهیت برهمکنش‌های بین لیزوزیم و نانوذره‌ها به ما بدهد. پارامترهای ترمودینامیکی به دست آمده از روش طیف‌سنجی فلورسانس و معادله گیبس و وانت‌هوف^۱ محاسبه شد [۴۱]. همان‌گونه که در جدول ۶ نشان داده شده است، K نشان دهنده ثابت واکنش ظاهری نانوذره‌ها و لیزوزیم است، در حالی که T و R به ترتیب نشان دهنده دما در سامانه کلوین و ثابت جهانی گازها و ΔG نیز نشان دهنده انرژی آزاد گیبس هستند.

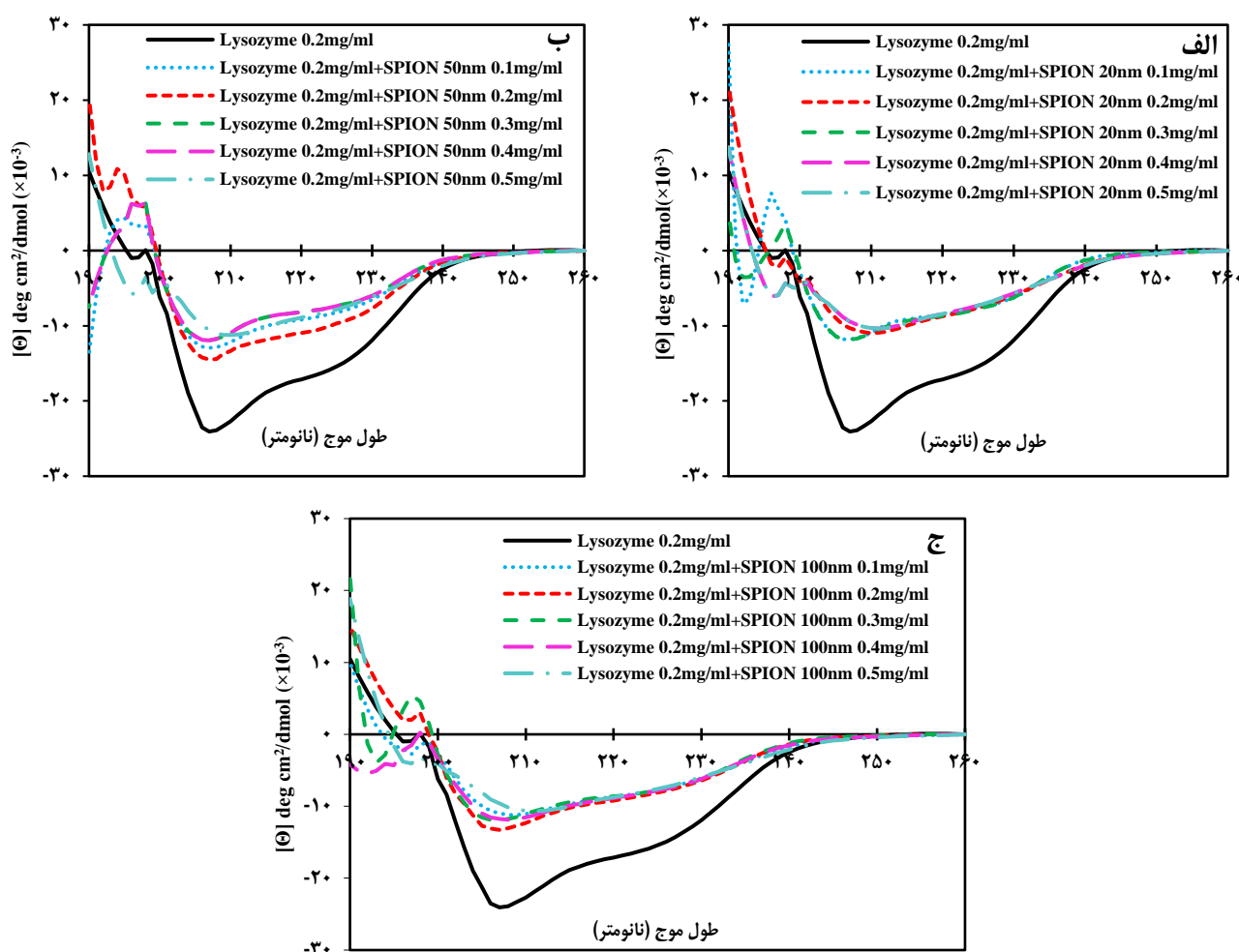
$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (۷)$$

آنتالپی و آنتروپی واکنش‌ها از روش معادله شماره ۸ قابل محاسبه است [۴۱]، که در آن آنتالپی و آنتروپی واکنش‌ها با استفاده از این معادله محاسبه می‌شوند که در آن انرژی آزاد گیبس منفی

(۱) Gibbs and van't Hoff equation

جدول ۶. پارامترهای ترمودینامیکی واکنش مربوط به تشکیل کمپلکس نانوذره-پروتئین

نانوذره (نانومتر)	ΔG° (kJ/mol)	K(1/M)	T(K)	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (kJ/mol)
۲۰	-۵۱/۳۱۸	1×10^{-9}	۲۹۸	-۶/۹۵۲	۰/۱۴۸
۲۰	-۵۲/۸۱	$۰/۸ \times 10^{-9}$	۳۱۰		
۲۰	-۵۵/۰۲۴	$۰/۸ \times 10^{-9}$	۳۲۳		
۵۰	-۵۳/۰۳۵	۲×10^{-9}	۲۹۸	-۰/۰۰۲۶	۰/۱۷۸
۵۰	-۵۵/۱۷	۲×10^{-9}	۳۱۰		
۵۰	-۵۷/۴۸۴	۲×10^{-9}	۳۲۳		
۱۰۰	-۵۵/۳۰۴	۵×10^{-9}	۲۹۸	-۰/۰۰۷۳	۰/۱۸۵
۱۰۰	-۵۷/۵۳۱	۵×10^{-9}	۳۱۰		
۱۰۰	-۵۹/۹۴۳	۵×10^{-9}	۳۲۳		



شکل ۱۲. دورنگی دورانی مربوط به لیزوزیم در برهمکنش با غلظت های گوناگون نانوذره‌ها با سه اندازه گوناگون (الف) ۲۰، (ب) ۵۰ و (ج) ۱۰۰ نانومتر

ثانویه است. جداول ۷، ۸ و ۹ و شکل ۱۲ نتیجه‌های مربوط به تحلیل پیک دورنگ نمای دورانی را با استفاده از نرم‌افزار SELCON3 نشان می‌دهد. با توجه به تغییر کمی که در ساختار

نشان دهنده وجود ساختارهای صفحه بتا است. در اینجا بیضی واری مولار به دنبال افزایش غلظت سه نانوذره کاهش می‌یابد. این به معنای کاهش ساختارهای مارپیچ آلفا و تغییر اساسی در ساختار

جدول ۷. درصد ساختارهای ثانویه لیزوزیم با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حالت آزاد و در روبه رو شدن با غلظت‌های گوناگون SPIONs (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با اندازه ۲۰ نانومتر

SPION 0.5	SPION 0.4	SPION 0.3	SPION 0.2	SPION 0.1	SPION 0	
۲۰/۲	۲۰	۲۵/۶	۲۶/۲	۲۸/۷	۴۰/۲	Helix
۲۵/۶	۲۶/۶	۲۱	۲۲	۱۶/۴	۱۵/۱	Strand
۲۲	۲۱/۲	۲۰/۹	۲۲/۶	۱۸/۷	۲۰/۳	Turn
۳۲	۳۲/۱	۳۲/۳	۲۹	۳۶/۱	۲۴/۲	Unordered

جدول ۸. درصد ساختارهای ثانویه لیزوزیم با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حالت آزاد و در روبه رو شدن با غلظت‌های گوناگون SPIONs (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با اندازه ۵۰ نانومتر

SPION 0.5	SPION 0.4	SPION 0.3	SPION 0.2	SPION 0.1	SPION 0	
۲۹/۸	۳۴/۵	۳۴/۵	۳۳/۱	۳۵	۴۰/۲	Helix
۱۸/۲	۱۵/۵	۱۵/۵	۱۸/۵	۱۲/۴	۱۵/۱	Strand
۲۱/۹	۲۱/۵	۲۱/۵	۲۲/۳	۲۴/۶	۲۰/۳	Turn
۳۰/۶	۲۸/۳	۲۸/۳	۲۵/۹	۲۸	۲۴/۲	Unordered

جدول ۹. درصد ساختارهای ثانویه لیزوزیم با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حالت آزاد و در روبه رو شدن با غلظت‌های گوناگون SPIONs (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با اندازه ۱۰۰ نانومتر

SPION 0.5	SPION 0.4	SPION 0.3	SPION 0.2	SPION 0.1	SPION 0	
۲۳	۱۷/۵	۲۶	۳۳/۴	۳۲	۴۰/۲	Helix
۲۳/۴	۲۶/۳	۱۹/۲	۱۷/۸	۱۹/۶	۱۵/۱	Strand
۲۱/۶	۲۲/۸	۱۹/۷	۲۳/۶	۲۴/۱	۲۰/۳	Turn
۳۱/۸	۳۳/۳	۳۴/۹	۲۵	۲۴/۱	۲۴/۲	Unordered

توسط ساختار حلقوی آمینو اسیدهای آروماتیک از جمله Tyr، Trp و Phe ایجاد می‌شود. این ساختارهای حلقوی می‌توانند نورهای پلاریزه را هنگامی که در یک محلول نامتقارن حل می‌شوند بچرخانند. وقتی روی ساختار پروتئین تمرکز می‌کنیم، عدم تقارن از قسمت‌های داخلی و آبریز پروتئین به دست می‌آید. پس از آشکار شدن ساختار سوم و قرار گرفتن آمینو اسیدهای آروماتیک در برابر حلال‌های قطبی، کاهش و جابه‌جایی در پیک دورنگ نمایی دورانی انتظار می‌رود. کاهش و جابه‌جایی در پیک دورنگ نمایی دورانی به معنای آشکار شدن ساختار سوم و تغییر در محیط اسیدهای آمینه آروماتیک است [۴۱].

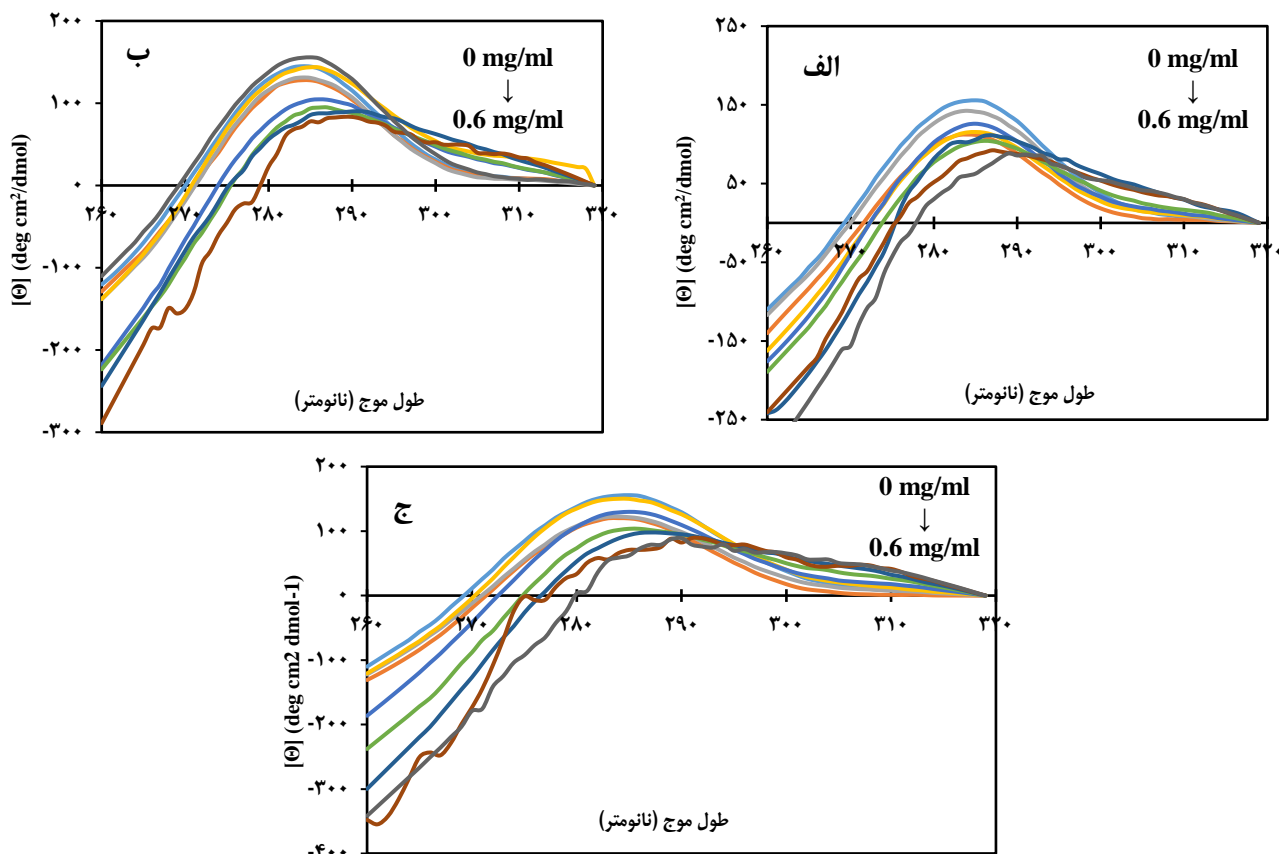
نتیجه‌گیری

به طور کلی، از روش مطالعه لیزوزیم به عنوان یک پروتئین مدل، نشان داده شد که نانوذره‌ها گوناگون قادر به برهم زدن ارتباط پروتئین-پروتئین هستند. SPIONs به سطح پروتئین متصل می‌شوند و در نتیجه به آن کمک می‌کنند تا ساختارهای دوم را حفظ کند و فعالیت آنزیمی را حتی در شرایط داتوره نشان دهد. تاثیر پایداری

ثانویه در طول روبه رو شدن با نانوذره‌های گوناگون رخ می‌دهد، بدیهی است که بیشترین تغییرها در حضور نانوذره‌های با اندازه ۲۰ نانومتر اتفاق می‌افتد. پس از آن، نانوذره‌های با اندازه ۱۰۰ نانومتر در تغییرهای ساختار ثانویه تاثیرگذار بود در حالی که نانوذره‌های با اندازه ۵۰ نانومتر حداقل تغییرها را نشان می‌دهد. این نتیجه‌ها مطابق با داده‌های طیف‌سنجی UV-Vis بود که در حضور نانوذره‌های با اندازه ۲۰ و ۱۰۰ نانومتر کاهش قابل توجهی در پیک ۲۲۰ نانومتری مربوط به پیوندهای پپتیدی مشاهده شد.

بررسی ساختار سوم لیزوزیم در طول برهمکنش با SPIONs

طیف دورنگ نمایی دورانی در ۳۲۰-۲۶۰ نانومتر در حضور غلظت‌های گوناگون نانوذره‌ها ثبت شد (شکل ۱۳). لیزوزیم پیک پهنی نزدیک به ۲۸۵ نانومتر نشان داد که نشان دهنده ترکیب سیگنال‌های تیروزین و تریپتوفان بود. با افزایش غلظت، پیک دورنگ نمایی دورانی کاهش یافت و به سمت طول‌موج‌های بلندتر تغییر کرد. در مجاورت اشعه فرابنفش، مهمترین عامل در مشاهده پیک جذبی،



شکل ۱۳. دورنگی نمایی دورانی آنزیم لیزوزیم (۴ میلی گرم بر میلی لیتر) با افزایش غلظت نانوذره‌ها با اندازه‌های گوناگون (الف) ۲۰، (ب) ۵۰ و (ج) ۱۰۰ نانومتر

نانوذره‌های آهن پیوندهای هیدروژنی را به جای برهمکنش‌های الکترواستاتیک ایجاد می‌کنند. برهمکنش لیزوزیم سفیده تخم مرغ با بار مثبت و نانوذره‌های آهن عمدتاً توسط پیوندهای هیدروژنی به دلیل وجود گروه‌های قطبی روی سطح پروتئین و یک پوسته آب در اطراف نانوذره‌های آهن رخ داده است. در اینجا یک سامانه برهمکنش نانوذره-پروتئین بررسی شده است که تغییرهای ساختاری پروتئین را در پاسخ به تغییرها در محیط سطح به جای بار پروتئین و سطح نانوذره‌ها القا می‌کند. اتصال مولکول‌های آب به سطح ذره‌ها در دمای محیط منجر به تغییر سطح چشمگیری می‌شود که به طور ویژه‌ای جهت مولکول‌های آب سطحی را نسبت به مولکول‌های حجیم تغییر می‌دهد و سرانجام سطحی با گروه‌های عاملی هیدروکسیل فراوان تشکیل می‌دهد. بر اساس پارامترهای ترمودینامیکی، حالت اتصال نانوذره‌های آهن به لیزوزیم سفیده تخم مرغ یک فرایند آنتالپی محور و گرمازا است که پیوند هیدروژنی و برهمکنش واندروالس نقش چشمگیری در تشکیل سامانه پروتئین-نانوذره ایفا می‌کند. از نتیجه‌های طیف‌سنجی فلورسانس و دورنگ نمایی دورانی،

نانوذره‌های آهن بر لیزوزیم و چگونگی برهمکنشی که در این پژوهش توضیح داده شده است برای کاربرد فراوان نانوذره‌ها در مطالعه برهمکنش لیگاند-پروتئین مفید خواهد بود. با توجه به افزایش روزافزون کاربرد نانوذره‌های اکسید آهن، لازم است اطلاعات پایه از تأثیر نانوذره‌ها بر پروتئین‌ها معلوم شود. نتیجه‌های به دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که نانوذره‌ها بسته به اثرهای اندازه خود به عنوان تثبیت کننده یا بی‌ثبات کننده در لیزوزیم سفیده تخم مرغ عمل می‌کنند. این منجر به چشم‌اندازی در مورد اثرهای وابستگی اندازه نانوذره‌ها بر پروتئین‌ها شده است؛ نانوذره‌ها به طور غیرمستقیم بر ساختار و دینامیک پوسته‌های آب هیدراته شده که پروتئین‌ها را احاطه کرده‌اند، تأثیر می‌گذارند که به نوبه خود ساختار و عملکرد پروتئین‌ها را به روشی وابسته به غلظت تحت تأثیر قرار می‌دهند.

تغییرهای ساختاری لیزوزیم سفیده تخم مرغ ممکن است با اتصال نانوذره‌های آهن ایجاد شود. نانوذره‌های آهن باردار به طور معمول به باقیمانده‌های باردار مکمل روی سطح پروتئین‌ها متصل می‌شوند. در این مورد، لیزوزیم سفیده تخم مرغ با بار مثبت و

مولکول‌های اطراف تعیین می‌شود. سازوکار برهمکنش لیزوزیم سفیده تخم مرغ با نانوذره‌های آهن منجر به تغییرهای آنتروپی منفی شد. در این حالت، افزایش آنتروپی مولکول‌های آب آزاد شده بر روی سطوح نانوذره و پروتئین کمتر از کاهش آنتروپی پروتئین‌های متصل است. به عبارت دیگر، تعداد زیادی مولکول آب در برهمکنش‌های هیدروژنی بین سطح پروتئین و نانوذره نقش دارند. در مجموع، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذره‌های آهن اثرهای چشمگیری بر ساختار سوم لیزوزیم سفیده تخم مرغ نشان می‌دهد. از این رو، برای استفاده پزشکی از نانوذره‌های آهن، ممکن است پیش از گسترش کاربرد آن‌ها در سامانه‌های سلولی و درون سلولی، به سنجش سمیت بیشتری نیاز باشد.

فهرست نمادها

F_0	شدت فلورسانس در غیاب نانوذره‌ها
F	شدت فلورسانس در حضور نانوذره‌ها
k_q	ثابت خاموشی
K_{SV}	ثابت استرن-ولمر
τ	طول عمر حالت برانگیخته تابشی
Q	غلظت خاموش کننده
f_a	کسری از فلورسانس اولیه
K_D	ثابت استرن-ولمر
K_s	ثابت ارتباط حالت پایه
$[Q]$	غلظت نانوذره‌ها
$[P]_t$	غلظت نهایی پروتئین در واکنش مخلوط
n	تعداد محل‌های اتصال
K_a^{app}	ثابت ارتباط ظاهری
n^{app}	تعداد جایگاه‌ها
T	دما در سامانه کلونین
R	ثابت جهانی گازها
ΔG	انرژی آزاد گیبس
ΔH	آنتالپی
ΔS	آنتروپی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۹

می‌توان نتیجه گرفت که پس از افزودن نانوذره‌های آهن به لیزوزیم سفیده تخم مرغ، تغییرهای ساختاری در سطح ساختار دوم و سوم رخ می‌دهد. با این حال، درجه تغییر ساختاری نشان داده شده برای پیشی گرفتن از موانع انرژی پتانسیل بخش آبگریز پروتئین کافی نیست. از این رو نانوذره‌ها ممکن است به راحتی به بخش داخلی آبگریز پروتئین‌ها نرسند و باقیمانده‌های کروموفور که تقریباً نزدیک به سطح پروتئین هستند، مستعد تأثیر متقابل با مولکول‌های کوچک هستند. باقیمانده‌های Tyr و Trp به یک اندازه برای سطح پروتئین قابل دسترس نیستند و تشخیص شدت فلورسانس ذاتی پروتئین، جزئیات بسیار مهمی را در کشف وضعیت باقیمانده‌های Tyr و Trp در تغییرهای ساختاری پروتئین ارائه می‌دهد.

در برهمکنش بین نانوذره‌ها و پروتئین‌ها چندین نیرو از جمله نیروهای الکترواستاتیک، پیوندهای هیدروژنی، برهمکنش‌های آبگریز و نیروهای واندروالس نقش دارند. این برهمکنش‌ها نه تنها ماهیت‌های متفاوتی دارند، بلکه از قدرت‌های متفاوتی نیز برخوردارند و انتظار می‌رود متناسب با تنش‌ها، مقاومت‌های متفاوتی نیز مشاهده شود. نانوذره‌ها به دلیل شکل‌ها و اندازه‌های یگانه خود، دارای ویژگی‌های متفاوتی در مقایسه با حالت مولکولی ترکیب‌های خود هستند. یکی از عامل‌های مهم در توصیف نانوذره‌ها اندازه آن‌ها است. بر این اساس، تفاوت در اندازه نانوذره‌ها باعث ایجاد سطح تماس متفاوتی برای برهمکنش با پروتئین‌ها می‌شود. نانوذره‌های کوچک‌تر در مقایسه با نانوذره‌های بزرگ‌تر با غلظت جرمی یکسان، دارای مساحت بزرگتری هستند. تجزیه و تحلیل انجام شده برای بررسی تغییرهای ساختاری ثانویه در حضور نانوذره‌های گوناگون، نشان داد که نانوذره‌های کوچک‌تر در واحد سطح می‌توانند تغییرهای ساختاری بیشتری در پروتئین‌ها ایجاد کنند. این پدیده ممکن است با انحناى سطح مرتبط باشد زیرا انحناى سطح یکی از ویژگی‌های مهم نانوذره‌ها است که مستقیماً با اندازه آن‌ها در ارتباط است. همان‌گونه که پروتئین‌ها روی سطوح جذب می‌شوند، انحناى سطح به ساختار پروتئین القا می‌شود و پروتئین دستخوش تغییرهای ساختاری می‌شود.

علاوه بر این، نتیجه‌ها نشان می‌دهد که واکنش‌پذیری سطوح نانوذره‌ها در کاربرد زیستی هم با بار ذره‌ها و هم ویژگی‌های

مراجع

- [1] Larsericsdotter H., Oscarsson S., Buijs J., *Thermodynamic Analysis of Proteins Adsorbed on Silica Particles: Electrostatic Effects*, *Journal of colloid and interface science*, **237(1)**: 98-103 (2001).

- [2] Billsten P., Carlsson U., Jonsson B.H., Olofsson G., Höök F., Elwing H., [Conformation of Human Carbonic Anhydrase II Variants Adsorbed to Silica Nanoparticles](#), *Langmuir*, **15(19)**: 6395-6399 (1999).
- [3] Hobara D., Imabayashi S.i., Kakiuchi T., [Preferential Adsorption of Horse Heart Cytochrome c on Nanometer-Scale Domains of a Phase-Separated Binary Self-Assembled Monolayer of 3-Mercaptopropionic Acid and 1-Hexadecanethiol on Au \(111\)](#), *Nano Letters*, **2(9)**: 1021-1025 (2002).
- [4] Roach P., Farrar D., Perry C.C., [Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes](#), *Journal of the American Chemical Society*, **127(22)**: 8168-8173 (2005).
- [5] Janin J., Bahadur R.P., Chakrabarti P., [Protein-Protein Interaction and Quaternary Structure](#), *Quarterly reviews of biophysics*, **41(2)**: 133-180 (2008).
- [6] Degtarev A., Lugovskoy A., Cardone M., Mulley B., Wagner G., Mitchison T., Yuan J., [Identification of Small-Molecule Inhibitors of Interaction Between the BH3 Domain and Bcl-x_L](#), *Nature cell biology*, **3(2)**: 173-182 (2001).
- [7] Shang W., Nuffer J.H., Muñiz-Papandrea V.A., Colón W., Siegel R.W., Dordick J.S., [Cytochrome c on Silica Nanoparticles: Influence of Nanoparticle Size on Protein Structure, Stability, and Activity](#), *Small*, **5(4)**: 470-476 (2009).
- [8] Kashanian F., Habibi-Rezaei M., Bagherpour A.R., Seyedarabi A., Moosavi-Movahedi A.A., [Magnetic Nanoparticles as Double-Edged Swords: Concentration-Dependent Ordering or Disordering Effects on Lysozyme](#), *RSC advances*, **7(86)**: 54813-54822 (2017).
- [9] Akhtar Kh., Shah A., Zubair N., Javed K., [Chemical Dynamics of Monodispersed Iron Oxide Nanoparticles](#). *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*, **38(5)**: 21-30 (2019).
- [10] Fleming A., [On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions](#), *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, **93(653)**: 306-317 (1922).
- [11] Sagermann M., Matthews B.W., [Crystal Structures of A T4-Lysozyme Duplication-Extension Mutant Demonstrate that the Highly Conserved B-Sheet Region has Low Intrinsic Folding Propensity](#), *Journal of molecular biology*, **316(4)**: 931-940 (2002).
- [12] Tagashira A., Nishi K., Sugahara T., [Lysozyme from hen Egg White Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Systemic Inflammation in Mice](#), *Cytotechnology*, **71(2)**: 497-506 (2019).
- [13] Takahashi M., Okakura Y., Takahashi H., Imamura M., Takeuchi A., Shidara H., Kuda T., Kimura B., [Heat-Denatured Lysozyme Could be A Novel Disinfectant for Reducing Hepatitis A Virus and Murine Norovirus on Berry Fruit](#), *Int J Food Microbiol*, **266**: 104-108 (2018).
- [14] Kuehner D.E., Engmann J., Fergg F., Wernick M., Blanch H.W., Prausnitz J.M., [Lysozyme Net Charge and Ion Binding in Concentrated Aqueous Electrolyte Solutions](#), *The Journal of Physical Chemistry B*, **103(8)**: 1368-1374 (1999).
- [15] Swaminathan R., Ravi V.K., Kumar S., Kumar M.V., Chandra N., [Lysozyme: A Model Protein for Amyloid Research](#), *Advances in protein chemistry and structural biology*, **84**: 63-111 (2011).

- [16] Mohamadpour M., Pirdashti M., Shahrokhi B., Rostami A.A., [Response Surface Methodology for the Evaluation of Lysozyme Partitioning in Poly \(Vinyl Pyrrolidone\) and Potassium Phosphate Aqueous Two-Phase System](#). *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*, **38(5)**: 197-208 (2019).
- [17] Lesnierowski G., Kijowski J., [Lysozyme](#), *Bioactive egg compounds*, 33-42 (2007).
- [18] Ghosh A., Brinda K., Vishveshwara S., [Dynamics of Lysozyme Structure Network: Probing the Process of Unfolding](#), *Biophysical journal*, **92(7)**: 2523-2535 (2007).
- [19] Knubovets T., Osterhout J.J., Connolly P.J., Klibanov A.M., [Structure, Thermostability, and Conformational Flexibility of Hen Egg-White Lysozyme Dissolved in Glycerol](#), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96(4)**: 1262-1267 (1999).
- [20] Pepys M.B., Hawkins P.N., Booth D.R., Vigushin D.M., Tennent G.A., Soutar A.K., Totty N., Nguyen O., Blake C.C., Terry C.J., Feest T.G., [Human Lysozyme Gene Mutations cause Hereditary Systemic Amyloidosis](#), *Nature*, **362(6420)**: 553-557 (1993).
- [21] Cai H., Yao P., [In Situ Preparation of Gold Nanoparticle-Loaded Lysozyme-Dextran Nanogels and Applications for Cell Imaging and Drug Delivery](#), *Nanoscale*, **5(7)**: 2892-2900 (2013).
- [22] Kwok P.C., Tunsirikongkon A., Glover W., Chan H.K., [Formation of Protein Nano-Matrix Particles with Controlled Surface Architecture for Respiratory Drug Delivery](#), *Pharm Res*, **28(4)**: 788-796 (2011).
- [23] Peng Z.G., Hidajat K., Uddin M.S., [Adsorption and Desorption of Lysozyme on Nano-Sized Magnetic Particles and its Conformational Changes](#), *Colloids Surf B Biointerfaces*, **35(3-4)**: 169-174 (2004).
- [24] Shang W., Nuffer J.H., Dordick J.S., Siegel R.W., [Unfolding of Ribonuclease A on Silica Nanoparticle Surfaces](#), *Nano letters*, **7(7)**: 1991-1995 (2007).
- [25] Vertegel A.A., Siegel R.W., Dordick J.S., [Silica Nanoparticle Size Influences the Structure and Enzymatic Activity of Adsorbed Lysozyme](#), *Langmuir*, **20(16)**: 6800-6807 (2004).
- [26] Eslami Moghadam M., Mansouri-Torshizi H., Saidifar M., [Investigation of the Interaction of Antitumor Palladium and Platinum Complexes of Ethyldithiocarbamate with Human Serum Albumin](#). *Nashrieh Shimi va Mohandesi Shimi Iran*, **37(4)**: 155-166 (2019).
- [27] Chakraborti S., Chatterjee T., Joshi P., Poddar A., Bhattacharyya B., Singh S.P., Gupta V., Chakrabarti P., [Structure and Activity of Lysozyme on Binding to ZnO Nanoparticles](#), *Langmuir*, **26(5)**: 3506-3513 (2009).
- [28] Mahmoudi M., Shokrgozar M.A., Sardari S., Moghadam M.K., Vali H., Laurent S., Stroeve P., [Irreversible Changes in Protein Conformation due to Interaction with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles](#), *Nanoscale*, **3(3)**: 1127-1138 (2011).
- [29] Perkampus H.H., ["UV-VIS Spectroscopy and its Applications"](#). Springer Science & Business Media (2013).
- [30] Worthington C.C., ["Worthington Enzyme Manual: Enzymes and Related Biochemicals"](#). Worthington Biochemical Corporation (1988).

- [31] Stern O., Volmer M., *Über Die Abklingzeit der Fluoreszenz*, *phys. Z*, **20**: 183-188 (1919).
- [32] Lakowicz J.R., "Principles of Fluorescence Spectroscopy". Springer (2006).
- [33] Lehrer S., *Solute Perturbation of Protein Fluorescence. Quenching of the Tryptophyl Fluorescence of Model Compounds and of Lysozyme by Iodide Ion*, *Biochemistry*, **10(17)**: 3254-3263 (1971).
- [34] Karukstis K.K., Gruber S.M., Fruetel J.A., Boegeman S.C., *Quenching of Chlorophyll Fluorescence by Substituted Anthraquinones*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **932**: 84-90 (1988).
- [35] Karukstis K.K., Boegeman S.C., Fruetel J.A., Gruber S.M., Terris M.H., *Multivariate Analysis of Photosystem II Fluorescence Quenching by Substituted Benzoquinones and Naphthoquinones*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **891(3)**: 256-264 (1987).
- [36] Rohatgi-Mukherjee K., "Fundamentals of Photochemistry". New Age International (1978).
- [37] Le Chatelier H., *Estimation of Firedamp by Flammability Limits*, *Annals of Mines*, **19(8)**: 388-395 (1891).
- [38] Ding F., Zhao G., Huang J., Sun Y., Zhang L., *Fluorescence Spectroscopic Investigation of the Interaction between Chloramphenicol and Lysozyme*, *European journal of medicinal chemistry*, **44(10)**: 4083-4089 (2009).
- [39] Liu X.F., Xia Y.M., Fang Y., *Effect of Metal Ions on the Interaction between Bovine Serum Albumin and Berberine Chloride Extracted from a Traditional Chinese Herb Coptis Chinensis Franch*, *Journal of inorganic biochemistry*, **99(7)**: 1449-1457 (2005).
- [40] Ji Z., Yuan H., Liu M., Hu J., *¹H-NMR Study of the Effect of Acetonitrile on the Interaction of Ibuprofen with Human Serum Albumin*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **30(1)**: 151-159 (2002).
- [41] Jelesarov I., Bosshard H.R., *Isothermal Titration Calorimetry and Differential Scanning Calorimetry as Complementary Tools to Investigate the Energetics of Biomolecular Recognition*. *Journal of molecular recognition*, **12(1)**: 3-18 (1999).