

## بررسی میانکنش نانوذره اکسید آهن ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) با آلبومین سرم انسانی با استفاده از تکنیک‌های فلورسانس و دورنگ‌نمایی دورانی

علی ریاحی مدوار<sup>۱</sup>، علیرضا قاسمی نسب<sup>۲</sup>، فرشید برزگری دهج<sup>۳</sup>، فاطمه رضائی<sup>۴</sup> و زهرا زمانی<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> ایران، بجنورد، دانشگاه کوثر بجنورد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی.

<sup>۲</sup> ایران، کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، گروه بیوتکنولوژی.

<sup>۳</sup> ایران، کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی.

<sup>۴</sup> ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی.

<sup>۵</sup> ایران، کرمان، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی.



تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱

### چکیده

نانوذرات کاربردهای وسیعی در صنایع مختلف دارند، بنابراین می‌توان انتظار داشت که آنها راهی را برای ورود به محیط زیست پیدا کنند و حیات موجودات زنده را با عواقب غیر قابل پیش‌بینی تحت تاثیر قرار دهند. با توجه به کاربردهای گسترده نانوذره اکسید آهن ( $\text{nFe}_2\text{O}_3$ ) در صنایع مختلف، در این مطالعه، میانکنش این نانوذره در غلظت‌های مختلف با یکی از فراوانترین پروتئین‌های موجود در خون، یعنی آلبومین سرم انسانی (HSA) با استفاده از روش‌های فلورسانس ذاتی در دماهای مختلف، فلورسانس خارجی و دورنگ‌نمایی حلقوی (CD)، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نانوذره در محیط و در تمام دماها، نشر فلورسانس ذاتی پروتئین کاهش می‌یابد. بر اساس ثابت سرعت خاموشی، مشخص گردید که مکانیسم برهمکنش بین HSA و  $\text{nFe}_2\text{O}_3$  از نوع پایا می‌باشد. پارامترهای ترمودینامیکی نشان داد که آنتالپی ( $\Delta H$ ) و آنتروپی ( $\Delta S$ ) هر دو منفی می‌باشند که این مساله نشان دهنده نقش پیوندهای هیدروژنی و نیروهای واندروالسی در این میانکنش می‌باشند. منفی بودن تغییرات انرژی آزاد واکنش ( $\Delta G^\circ$ )، بیانگر انرژی‌زا بودن و خودبخودی بودن این واکنش می‌باشد. از طرف دیگر، نشر فلورسانس خارجی ANS در حضور HSA میانکنش داده با نانوذره نسبت به HSA بیشتر افزایش می‌یابد. علاوه بر این، طیف‌های ناحیه دور دورنگ‌نمایی حلقوی، نشان دهنده تغییر در ساختار دوم پروتئین پس از میانکنش با نانوذره می‌باشد. این نتایج در مجموع، نشان دهنده تغییراتی در ساختار پروتئین بعد از در معرض قرار گرفتن با این نانوذره می‌باشد که می‌تواند عملکرد آن را تحت تاثیر قرار دهد.

**واژه‌های کلیدی:** آلبومین سرم انسانی، فلورسانس، دورنگ‌نمایی دورانی، نانوذره اکسید آهن.

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۸۳۲۲۶۲۸۶۳، پست الکترونیکی: [Riahi.ali@gmail.com](mailto:Riahi.ali@gmail.com)

### مقدمه

غذایی، میکروالکترونیک، نساجی، نظامی و ساختمان سازی)، بیوتکنولوژی (انتقال ژن و طراحی نانوبیوسنسورها) و پزشکی (ساخت داروی خاص، غربال-گری دارو، طراحی روش‌های دارو رسانی و تصویر برداری

در سال‌های اخیر استفاده از نانوذرات در محصولات تجاری و صنعتی با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد آن-ها از قبیل اندازه و ابعاد آن‌ها افزایش چشمگیری داشته است (۳۳). نانوذرات در صنایع مختلف (از قبیل صنایع

منظور بررسی میانکنش نانوذرات با پروتئین‌ها انجام شده است (۹، ۳۱، ۱، ۳۶ و ۵۳).

آلبومین سرم انسانی (HSA)، پروتئین کروی با ۵۸۵ اسید-آمین می‌باشد. این پروتئین با غلظت ۴۲ گرم بر لیتر فراوان‌ترین پروتئین موجود در پلاسما خون و بیشترین تاثیر (حدود ۸۰ درصد) را بر فشار اسمزی خون دارد (۲۷) و همچنین در انتقال برخی ترکیبات داخلی و خارجی از قبیل داروها، هورمون‌ها و اسیدهای چرب، نقش مهمی بر عهده دارد (۲۹ و ۴۵). تا کنون از روش‌های مختلفی جهت مطالعه تاثیر مواد بر ساختار پروتئین‌ها استفاده شده است، که از مهمترین آنها می‌توان به روش‌های طیف‌سنجی فلورسانس، طیف‌سنجی مرئی-ماورای بنفش، دورنگ نمایی حلقوی (CD) و رزونانس مغناطیس هسته‌ای (NMR) اشاره نمود (۲۴ و ۴۷). از بین روش‌های مذکور، فلورسانس به دلیل حساسیت بالا، انتخابگری و سهولت کاربرد آن به صورت گسترده‌تری مورد استفاده قرار گرفته است (۱۳). میانکنش HSA با Ciprofloxacin (ماده‌ای با خاصیت ضد باکتریایی) در حضور و عدم حضور با نانوذرات نقره با استفاده از طیف‌سنجی فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت و نشان داد شد که در حضور Ciprofloxacin، نشر فلورسانس این پروتئین با مکانیسم پایا خاموش ولی در حضور نانوذرات نقره، میانکنش HSA با این ماده متفاوت می‌باشد (۲۳). در اتصال لیگاند به پروتئین اساساً چهار نوع میانکنش غیرکوالانسی (پیوندهای هیدروژنی، میانکنش‌های هیدروفوبی، نیروی واندروالسی و الکتروستاتیک) نقش دارند. نوع نیروی دخیل در این میانکنش‌ها را می‌توان با توجه به علامت و بزرگی پارامترهای ترمودینامیکی شامل آنتالپی ( $\Delta H^\circ$ ) و آنتروپی ( $\Delta S^\circ$ ) در یک واکنش مشخص نمود. اگر پارامترهای آنتالپی و آنتروپی هر دو بزرگتر از صفر باشند، میانکنش هیدروفوب و اگر هر دو پارامتر مذکور کوچکتر از صفر باشند، میانکنش‌های واندروالسی و پیوند هیدروژنی و اگر آنتروپی بزرگتر از صفر و آنتالپی کوچکتر از صفر باشند،

از سلول‌ها و بافت‌ها) کاربردهای بسیار زیادی دارند (۱۵ و ۴۸). بطور کلی به ذرات و ترکیبات که ابعاد آن‌ها کمتر از ۱۰۰ نانومتر باشند نانو ذره گفته می‌شود (۶ و ۳۲).

فناوری نانوذرات آهن یکی از اولین نسل‌های فناوری‌های محیطی در مقیاس نانو است (۴۴). در طی چند سال گذشته، تکنیک‌های مختلفی برای ساخت و تولید این نانوذرات (۵۴)، تغییر خواص سطحی (۳۹) و افزایش کارایی برای واکنش‌پذیری آن‌ها ایجاد شده است (۵۴). مطالعات گسترده آزمایشگاهی نشان داده است که ذرات آهن در مقیاس نانو برای انتقال دامنه وسیعی از آلودگی‌های زیست محیطی مانند حلال‌های زیستی اشباع از کلر (۵۴)، آفت‌کش‌های ارگانوکلراید (۳۹)، رنگ‌های آلی، ترکیبات غیرآلی مختلف و یون‌های فلزی مانند Pb(II), As(III), Ni(II), Cu(II) و Cr(VI) (۴) کارآمد هستند. علاوه بر آن، نانوذرات اکسید آهن به طور گسترده به عنوان حامل‌هایی برای دارورسانی به دلیل خاصیت مغناطیسی و زیست‌سازگاری (۲) در درمان چندین نوع سرطان بکار گرفته شده‌اند (۱۴). خواص منحصر به فرد نانوذرات مثل سطح ویژه بالا، جایگاه سطحی فعال و تحرک می‌تواند منجر به خطرات زیست محیطی یا سلامتی شود. گزارش‌های متعددی از سمیت نانوذرات بر موجودات مختلف از جمله سلول‌های ریه (۵۰)، سلول‌های قرمز خون (۳۵)، گیاهان (۲۶)، موش‌ها (۵۵)، ماهی‌ها (۱۹) و حتی رده‌های سلولی پستانداران (۱۰) و خرچنگ‌ها (۷) ثابت شده است.

بررسی میانکنش نانوذرات و سلول‌های زنده می‌تواند منجر به توانایی‌های تشخیصی و درمانی جدیدی مانند ژن درمانی و دارورسانی هدفمند شود (۳۰). برای مثال، به دلیل خاصیت مغناطیسی و زیست‌سازگاری نانوذرات اکسید آهن (۲)، این نانوذره به طور گسترده به عنوان حامل‌هایی برای دارو رسانی در درمان چندین نوع سرطان مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۴). مطالعات مختلفی به

و  $K_2HPO_4$  از شرکت مرک خریداری گردید. طیف‌های فلورسانس HSA در حضور و عدم حضور نانو دره از دستگاه اسپکتروفلوریمتر (Cary-Eclipse luminescence spectrophotometer apparatus; Varian, Australia) ثبت گردید.

**آماده‌سازی مواد:** یک استوک از سرم آلبومین انسانی (غلظت ۰/۵ میلی‌مولار) در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی-مولار با  $pH=7/4$  تهیه گردید. استوک  $nFe_2O_3$  با غلظت یک میکرومولار در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار ( $pH=7/4$ ) تهیه شد. از دستگاه سونیکاتور جهت تهیه سوسپانسیونی یکنواخت از نانوذره اکسید آهن (پنج دقیقه با فاصله زمانی یک دقیقه استراحت) استفاده شد.

**اندازه‌گیری تغییرات شدت فلورسانس ذاتی HSA در میانکنش  $nFe_2O_3$ :** طیف‌های فلورسانس مربوط HSA در حضور و عدم حضور  $nFe_2O_3$  در طول موج تحریک ( $\lambda_{ex}$ ) ۲۹۵ و محدوده طول موج نشری ( $\lambda_{em}$ ) ۵۰۰-۳۰۰ نانومتر ثبت شدند. سرعت اسکن (Scan Speed) ثبت طیف‌ها برابر ۵۰۰ نانومتر بر دقیقه و پهنای باند نور ثبت شده یا تابیده شده توسط دتکتور (Slit) ۵ نانومتر بود. در این مطالعه، پس از اضافه کردن پروتئین با غلظت ۵ میکرومولار و نانوذره با محدوده غلظت‌های ۰-۴ نانومولار (صفر، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۲، ۱/۶، ۲/۰، ۲/۴، ۲/۸، ۳/۲، ۳/۶ و ۴) در سل کوارتز با طول مسیر عبور نور یک سانتی‌متری، حجم نهایی محلول، با بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با  $pH$  برابر ۷/۴، به ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد و پس از انکوبه شدن محلول مورد نظر در دماهای ۲۹۸، ۳۰۳ و ۳۱۰ درجه کلون به مدت ۱۰ دقیقه، طیف فلورسانس ذاتی HSA در طول موج تحریک ۲۹۵ نانومتر ثبت گردید (۱). مطالعات قبلی نشان داده است که HAS در محدوده دمایی ۲۹۸، ۳۰۳ و ۳۰۸ درجه کلون، تغییر ساختاری بارزی پیدا نمی‌کند (۱۲ و ۴۲). مطالعات نشان داده شده است که در دمای بالاتر از ۳۳۳ درجه کلون، ساختار HSA تغییر

میانکنش‌های الکتروستاتیک در اتصال پروتئین با لیگاند دخالت دارند (۳۴). بررسی میانکنش بین نانوذرات نقره با سرم آلبومین گاوی (BSA) نشان داد که میانکنش‌های هیدروفوب و الکتروستاتیک در این میانکنش دخالت دارند و واکنش از طریق مکانیسم پویا انجام می‌شود (۳۶). بررسی میانکنش بین نانوذرات مس با BSA توسط Bhogale و همکاران در سال ۲۰۱۴ (۹) نشان داد که میانکنش‌های هیدروفوب از طریق مکانیسم پایا انجام می‌گیرد. مطالعات انجام شده نشان داد که میانکنش بین نانوذرات مس با سرم آلبومین انسانی از طریق مکانیسم پایا و با استفاده از میانکنش‌های الکتروستاتیک صورت می‌گیرد (۱). همچنین بررسی مکانیسم‌های برهمکنش HSA با نانو حامل مغناطیسی غیر آلی حاوی L-Dopa با استفاده از طیف سنجی فلورسانس نشان داد که با افزایش دما، ثابت استرن-ولمر (Ksv) کاهش می‌یابد. همچنین طیف سنجی UV-vis و CD نشان داد که برهم کنش HSA با این نانوذره برخی از تغییرات ساختاری را در HSA اعمال می‌کند (۴۱). علاوه بر این، برهمکنش نانوذره اکسید منیزیم (MgO NPs) با HSA با استفاده از طیف‌سنجی فلورسانس و CD نشان داد که میانکنش این نانوذره با HSA از طریق میانکنش آبریز صورت می‌گیرد (۸). در این تحقیق، با استفاده از روش-های طیف‌سنجی فلورسانس و دورنگ نمایی حلقوی، میانکنش آلبومین سرم انسانی با غلظت‌های مختلف نانوذره  $Fe_2O_3$  در شرایط شبه فیزیولوژیک مورد بررسی قرار داده شد.

## مواد و روشها

در این مطالعه، مواد مورد استفاده شامل نانوذره اکسید آهن ( $nFe_2O_3$ ) با درصد خلوص ۹۹/۲٪، مساحت سطح  $m^2g^{-1}$  ۵۵ و میانگین اندازه ۴۰ نانومتر از شرکت ناباند تکنولوژی (NaBond Technologies Co., Ltd., China) خریداری شد. سرم آلبومین انسانی (HSA) و 8-Anilino-naphthalene-1-sulfonic acid (ANS) از شرکت سیگما تهیه شدند.  $KH_2PO_4$

$$\ln K = \frac{-\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad \text{معادله ۴}$$

در این معادله؛  $\Delta H^0$  و  $\Delta S^0$  بترتیب آنتالپی واکنش (بر حسب کالری بر مول بر درجه کلوین) و آنتروپی واکنش (ژول بر مول.کلوین) میباشند و همچنین R: ثابت گازها (مول.کلوین بر ژول) و K: ثابت استرن ولمر در دماهای مختلف (برحسب عکس مولار) می‌باشند (۱۳ و ۳۷).

براساس معادله ۵، مقدار انرژی آزاد گیبس (کیلوکالری بر مول) محاسبه گردید.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad \text{معادله ۵}$$

اندازه‌گیری فلورسانس ANS: فلورسانس ANS با غلظت ۳۰ میکرومولار در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (۷/۴ pH) حاوی غلظت یک میکرومولار HSA در عدم حضور (غلظت صفر نانوذره) و حضور  $n\text{Fe}_2\text{O}_3$  (۰/۴ نانومولار) با شرایط زیر اندازه‌گیری شد.

طیف‌های فلورسانس مربوط ANS در حضور و عدم حضور  $n\text{Fe}_2\text{O}_3$  در طول موج تحریک ۳۵۰ و محدوده طول موج نشری ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر ثبت شدند. سرعت اسکن طیف‌ها و پهنای باند نور ثبت شده مشابه اندازه‌گیری تغییرات شدت فلورسانس ذاتی بود.

**مطالعه برهمکنش HSA با  $n\text{Fe}_2\text{O}_3$  با استفاده از مطالعات CD:** بمنظور بررسی ساختار دوم پروتئین سرم آلبومین انسانی در برهمکنش با  $n\text{Fe}_2\text{O}_3$  از دستگاه اسپکتروپلاریومتر (AVIV Spectropolarimeter, model 215, USA) استفاده شد. طیف‌ها، در محدوده ۱۹۰ تا ۲۵۰ نانومتر (Far-UV CD) در محلول پروتئین با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حضور و عدم حضور نانوذره (۲ نانومولار) پس از ۱۰ دقیقه انکوبه کردن در دمای اتاق، ثبت شدند.

در نهایت نتایج به صورت بیضی واری مولی،  $[\theta]$  (deg<sup>2</sup>cm<sup>2</sup>dmol<sup>-1</sup>)<sup>4</sup> بر اساس میانگین وزن اسیدآمین

می‌کند (۴۶)، لذا در دماهای بالاتر از این دما، مطالعات فلورسانس جهت بررسی تغییرات اتصال لیگاند به این پروتئین پیشنهاد نمی‌شود.

**بررسی نوع مکانیسم میانکنش HSA با  $n\text{Fe}_2\text{O}_3$  و تعداد جایگاه اتصال:** جهت تعیین نوع میانکنش HSA با  $n\text{Fe}_2\text{O}_3$  نمودار استرن-ولمر مربوط به شدت فلورسانس (در طول موج ۳۴۰ نانومتر) بر غلظت نانوذره، ترسیم گردید. بر اساس معادله ۱، ثابت‌های خاموشی بدست آمد.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad \text{معادله ۱}$$

F شدت فلورسانس پروتئین در حضور و  $F_0$  در عدم حضور خاموش کننده می‌باشند.  $K_{SV}$ : ثابت خاموشی دینامیک استرن-ولمر می‌باشد که از رگرسیون خطی نمودار  $F_0/F$  در مقابل غلظت خاموش کننده (Q) بدست می‌آید،  $k_q$ : ثابت سرعت خاموشی پروتئین، [Q]: غلظت خاموش کننده (۱۸، ۲۵، ۱۶) و  $\tau_0$ : متوسط نیمه عمر پروتئین بدون خاموش کننده (۵ نانوثانیه) می‌باشند (۵۱). علاوه بر این، براساس معادله ۲ مقدار  $k_q$  محاسبه گردید.

$$K_{SV} = K_q \tau_0 \quad \text{معادله ۲}$$

ثابت اتصال و همچنین تعداد جایگاه‌های اتصال پروتئین به نانوذره بر اساس معادله ۳ مشخص گردید.

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_A + n \log [Q] \quad \text{معادله ۳}$$

در این معادله F شدت فلورسانس پروتئین در حضور و  $F_0$  در عدم حضور خاموش کننده، n: تعداد جایگاه‌های اتصال HSA برای  $n\text{Fe}_2\text{O}_3$  و  $K_A$ : ثابت اتصال برحسب مولار می‌باشد (۲۲).

**تعیین پارامترهای ترمودینامیکی:** براساس معادله ۴، پارامترهای ترمودینامیکی شامل آنتالپی و آنتروپی بمنظور تشخیص نیروهای دخیل در میانکنش HSA با  $n\text{Fe}_2\text{O}_3$  تعیین شدند.

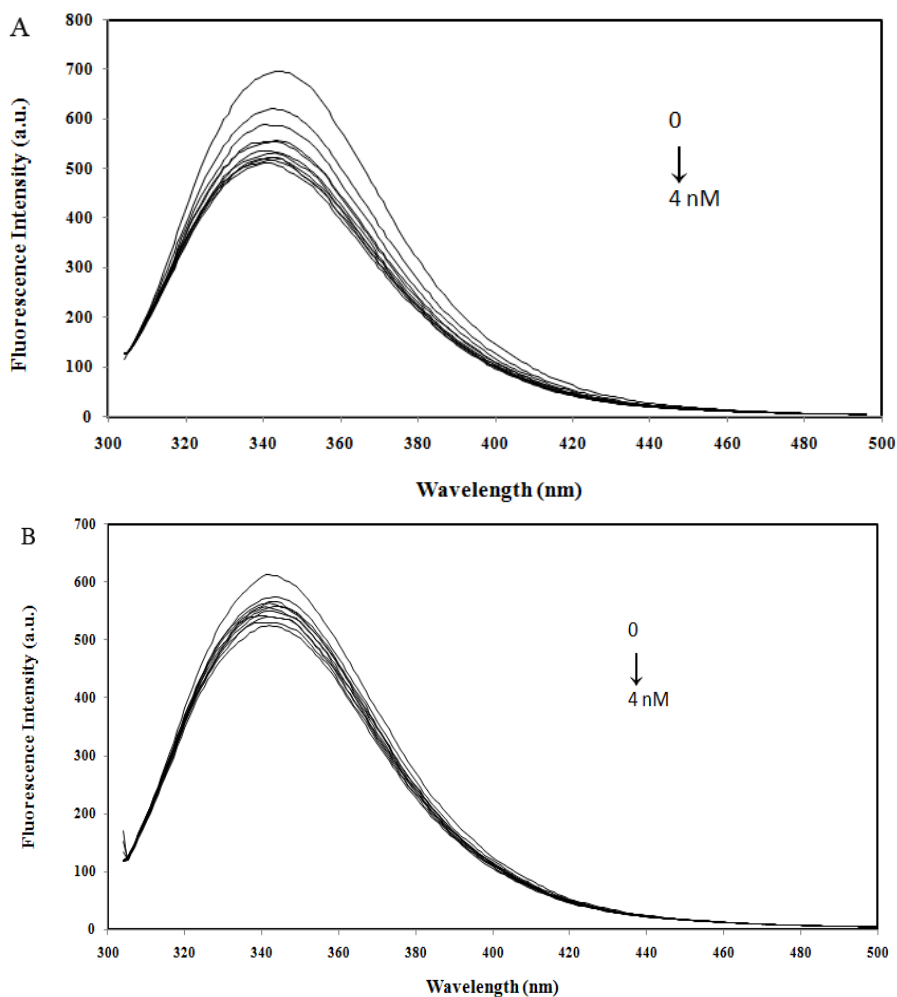
تغییرات فلورسانس ذاتی HSA در حضور  $n\text{Fe}_2\text{O}_3$  در دماهای مختلف ۲۹۸، ۳۰۳ و ۳۰۸ درجه کلوین: نتایج مربوط به طیف فلورسانس ذاتی HSA در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن و در دماهای مختلف در شکل ۱ بیانگر این است که شدت فلورسانس با افزایش غلظت نانوذره در محیط کاهش می‌یابد. علاوه بر این، نتایج بدست آمده از معادله استرن-ولمر مربوط به این طیف‌ها (شکل ۲) نشان دهنده کاهش خطی نشر فلورسانس ذاتی پروتئین HSA با افزایش غلظت نانوذره در محیط در تمامی دماها می‌باشد. شیب معادله استرن-ولمر مربوط به HSA در حضور غلظت‌های مختلف  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  بیانگر این است که با افزایش دما، شدت فلورسانس کمتر کاهش یافته است (شکل ۲).

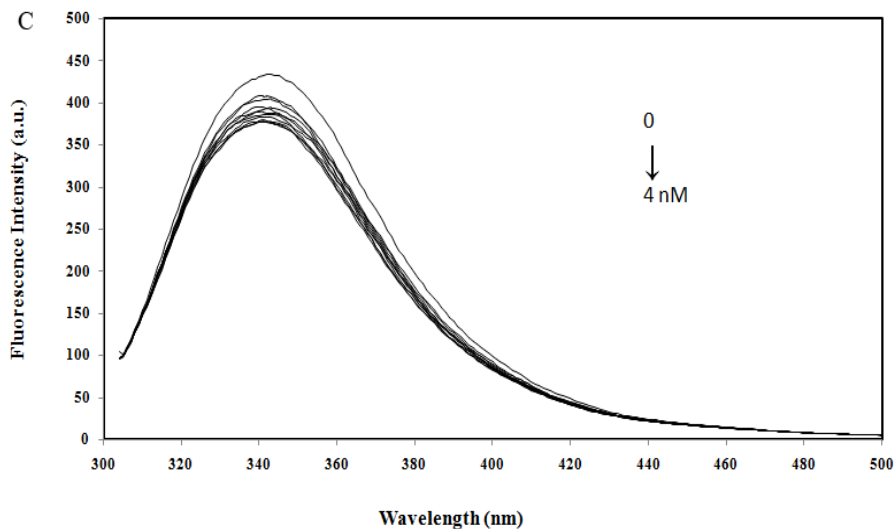
(MRW; 113.9) ارائه شد. این پارامتر با فرمول زیر محاسبه گردید.

$$[\theta]_{\lambda} = (\theta \times 100 \text{MRW}) / (c \cdot l)$$

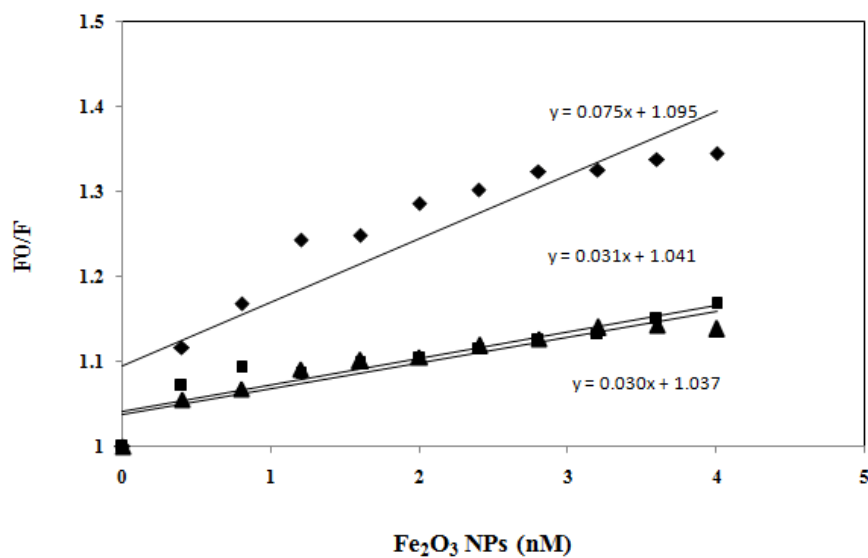
C غلظت پروتئین برحسب  $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ ، L طول مسیر نور (cm) از کووت حاوی نمونه و  $\theta$  پارامتر بیضی‌واری اندازه‌گیری شده برحسب درجه در طول موج ( $\lambda$ ) خاص می‌باشند. دستگاه توسط Comphorsolpnic -۱۰ (+) با فرض  $[\theta]_{291} = 7820 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$  nonhydroscopic (+) -۱۰-Comphorsulphonte با فرض  $[\theta]_{290.5} = 7820 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$  ammonium کالیبر گردید (۳۸).

## نتایج





شکل ۱- فلورسانس ذاتی HSA در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار،  $\text{pH}=7.4$ ). (A) دمای ۲۹۸، (B) دمای ۳۰۳ و (C) دمای ۳۱۰ درجه کلوین.



شکل ۲- مقایسه نمودار استرن-ولمر برهمکنش پروتئین HSA با غلظت‌های مختلف  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  در دمای‌های ۲۹۸ (◆)، ۳۰۳ (■) و ۳۱۰ (▲) درجه کلوین.

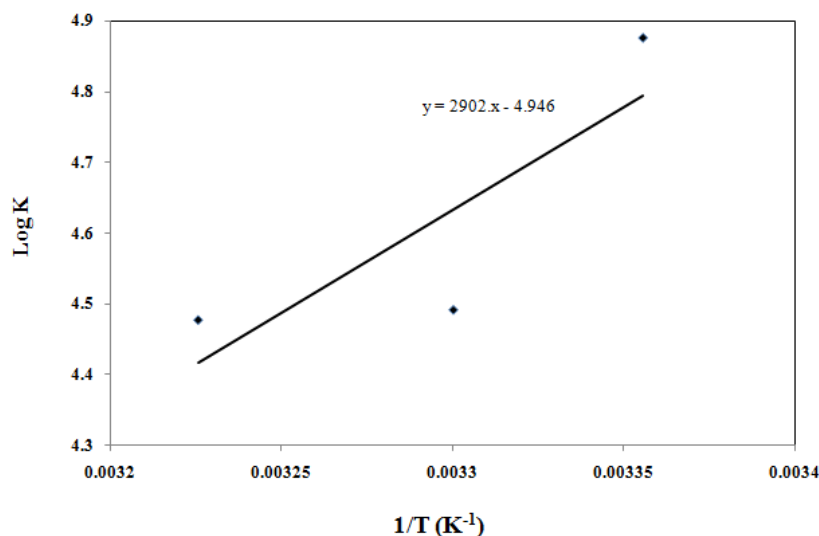
تعیین پارامترهای ترمودینامیکی در میانکنش HSA و  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ : محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی میانکنش  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  با HSA بر مبنای معادله خط بدست آمد از نمودار وانت هوف (شکل ۳) و بر اساس معادله ۴، بیانگر این است که علامت هر دو پارامترهای آنتالپی و آنتروپی منفی می‌باشد (جدول ۲). از طرف دیگر، محاسبه مقدار انرژی

تعیین نوع میانکنش HSA و  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ : با توجه به معادله مربوط به نمودارهای استرن-ولمر،  $K_{sv}$  و  $K_q$  محاسبه و در جدول ۱ نشان داده شد. همانطور که در جدول قابل مشاهده است، ثابت خاموشی استرن-ولمر ( $K_{sv}$ ) با افزایش دما کاهش یافته است و روند مشابهی برای ثابت سرعت خاموشی فلورسانس ( $K_q$ ) نیز مشاهده می‌گردد.

جدول ۱- ثابت‌های خاموشی میانکنش HSA با  $n\text{Fe}_2\text{O}_3$ 

دما (کلوین)	$K_{sv}$ ( $1 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1}$ )	$K_q$ ( $1 \times 10^{16} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
۲۹۸	۷/۵	۱۵
۳۰۳	۳/۱	۶/۲
۳۰۸	۳/۰	۶

آزاد بر اساس معادله ۵ برای این میانکنش در دماهای مختلف بیانگر این است که علامت این انرژی منفی بوده و همچنین با افزایش دما افزایش یافته است.



شکل ۳- نمودار وانت هوف مربوط به میانکنش نانوذره اکسید آهن با آلبومین سوم انسانی.

حضور نانوذره) افزایش یافته است. این افزایش در حضور HSA میانکنش داده با نانوذره اکسید آهن، بیشتر می‌باشد.

جدول ۳- ثابت اتصال و تعداد جایگاه برای  $n\text{Fe}_2\text{O}_3$  با HSA.

دما (کلوین)	$K_a$ ( $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ )	n
۲۹۸	۱۹/۴	۰/۴۷۲
۳۰۳	۹	۰/۳۳۶
۳۱۰	۸	۰/۴۳۴

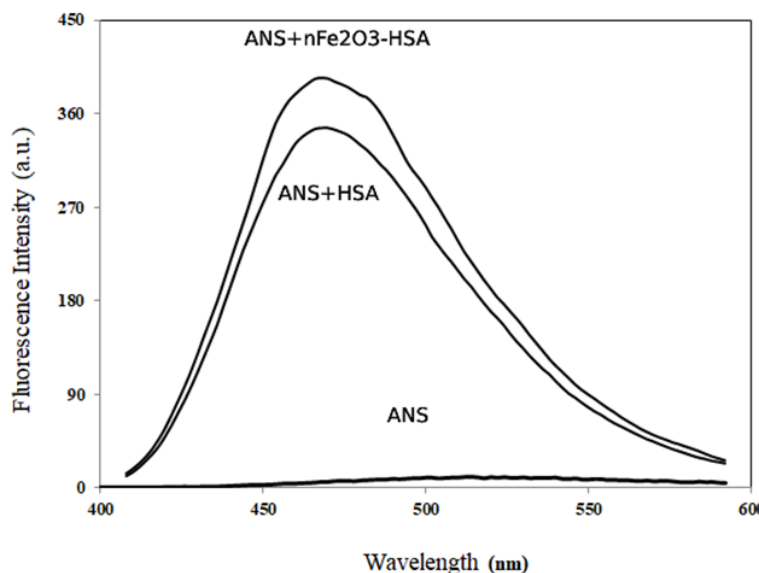
نتایج طیف‌سنجی دورنگ نمای دورانی: شکل ۵، طیف مربوط به دورنگ‌نمایی دورانی در ناحیه فرابنفش دور پروتئین HSA واکنش داده با نانوذره اکسید آهن را در مقایسه با پروتئین HSA نشان می‌دهد. براساس شکل، میزان بیضوی‌واری در پروتئین میانکنش داده با نانوذره، افزایش یافته است (شکل ۵).

جدول ۲- پارامترهای ترمودینامیکی میانکنش  $n\text{Fe}_2\text{O}_3$  با آلبومین سوم انسانی.

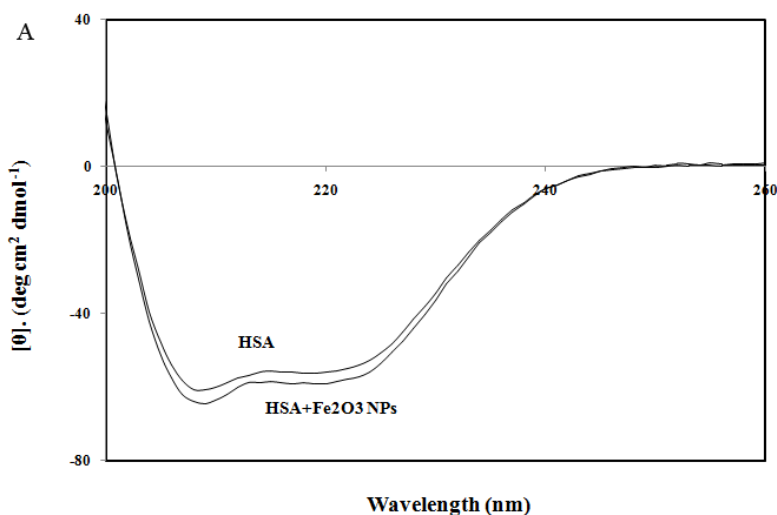
دما (کلوین)	$\Delta G$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$\Delta H$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$\Delta S$ ( $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )
۲۹۸	-۱۱/۸۶		
۳۰۳	-۱۱/۶۵	-۲۴/۱۱	-۰/۰۴۱۱
۳۱۰	-۱۱/۳۶		

تعیین ثابت اتصال و جایگاه‌های اتصال  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  بر روی HSA: براساس نتایج جدول ۳، مقادیر  $K_a$  و n برای برهمکنش نانوذره اکسید آهن با پروتئین سرم آلبومین انسانی بیانگر این است که با افزایش دما، میزان n و ثابت اتصال کاهش می‌یابد.

فلورسانس ANS در حضور و عدم حضور نانو ذره اکسید آهن: همانطور که در شکل ۴ قابل مشاهده است، شدت فلورسانس ANS در حضور HSA (در حضور و عدم



شکل ۴- طیف فلورسانس خارجی ANS (به تنهایی) و در حضور HSA و HSA میانکنش داده با غلظت ۰/۴ نانومولار  $n\text{Fe}_2\text{O}_3$ .



شکل ۵- طیف دو رنگ‌نمایی دورانی پروتئین سرم آلبومین انسانی با غلظت ۲ نانومولار  $n\text{Fe}_2\text{O}_3$  در ناحیه فرابنفش دور (بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار،  $\text{pH}=7/4$ ، دمای ۲۹۸ درجه کلوین).

## بحث

دارد (۱۱). مطالعه میانکنش داروها با این پروتئین اطلاعاتی راجع به موقعیت، انتقال، متابولیسم و اثر بخشی داروها در خون می‌دهد. بنابراین، اهمیت مطالعه اتصال مولکول‌های کوچک به این پروتئین مورد توجه قرار گرفته است (۱۳). بمنظور بررسی میانکنش مولکول‌های کوچک با پروتئین‌ها، روش فلورسانس یک ابزار قدرتمند به دلیل دقت و حساسیت به حساب می‌آید (۴۹). فلورسانس ذاتی HSA به

آزاد شدن نانوذرات در محیط زیست به دلیل افزایش تولید و کاربرد زیاد آن‌ها امری اجتناب ناپذیر است. بسیاری از نانوذرات در نهایت در مقیاس وسیع به محیط زیست رها سازی می‌شوند (۲۸)، در حالیکه سمیت و ضرر آن‌ها برای موجودات زنده و ارگانیسم‌ها ناشناخته مانده است. آلبومین نقش‌های مهمی در انتقال، پخش داروها و تنظیم pH خون



در جدول ۲ انرژی آزاد ( $\Delta G$ ) منفی است که بیانگر آزاد شدن انرژی طی انجام این واکنش و خودبه‌خودی واکنش می‌باشد (۲۳).

بر اساس نتایج، آنتالپی و آنتروپی هر دو کوچکتر از صفر می‌باشند که نشان دهنده نقش پیوند هیدروژنی و نیروهای واندروالس در این میانکنش می‌باشد. نتایج مشابهی در میانکنش آنزیم بتا گالاکتوزیداز با نانوذرات اکسید مس نیز گزارش شده است (۳۱). این مشاهدات با نتایج گزارش شده در میانکنش HSA با نانوذره اکسید مس (با اندازه متوسط ۶۰ نانومتر) مطابقت ندارد، مشخص شده بود که میانکنش‌های الکتروستاتیک عامل اصلی اتصال نانوذره اکسید مس با پروتئین HAS می‌باشد (۱). مطالعات انجام شده بمنظور بررسی تغییر اندازه نانوذره نقره توسط ایرانفر و همکاران در سال ۲۰۱۲ (۲۳) نشان داده شده است که ثابت معادله استرن-ولمر و همچنین ثابت سرعت خاموشی با تغییر و افزایش اندازه نانوذره نقره در حضور Ciprofloxacin افزایش می‌یابد. لذا بنظر می‌رسد که اندازه، ماهیت و همچنین غلظت نانوذره می‌تواند به نوع نیروهای دخیل در اتصال و همچنین مکانسیم اتصال نیز تاثیر بگذارد.

همانطور که در جدول ۳ قابل مشاهده می‌باشد، تعداد جایگاه‌های اتصال (n) برای برهمکنش این نانوذره با HSA با افزایش دما، کاهش می‌یابد، این نتایج با گزارشات مربوط به میانکنش HSA با نانوذره اکسید مس مغایرت دارد (۱). از طرف دیگر، نتایج نشان داد که در میانکنش HSA با نانوذره اکسید آهن، ثابت اتصال ( $K_a$ ) کاهش می‌یابد که با نتایج بدست آمده از میانکنش HSA با نانوذره اکسید مس مغایرت (۱) و با میانکنش HAS با ترکیب جدیدی از آکریدین (N-{[N-(2-dimethylamino) ethyl] acridine-4-} [N-(ACR-4-CA)-a-ALA] (carboxamide)-a-alanine) مطابقت دارد (۱۳). در هر صورت، تغییر در ثابت اتصال نانوذره اکسید آهن (با اندازه متوسط ۴۰ نانومتر) و نانوذره

دلیل وجود یک مولکول تریپتوفان در موقعیت ۲۱۴ ساختار آن می‌باشد (۲۰).

همانطور که در نتایج (شکل ۱) نشان داده شده است، شدت فلورسانس در تمامی دماها با افزایش غلظت نانوذره در محیط کاهش می‌یابد. از معادله استرن-ولمر مربوط به این طیف‌ها، مشخص می‌شود که بین شدت خاموشی فلورسانس و غلظت نانوذره در محیط رابطه خطی وجود دارد. این نتایج با مطالعات انجام شده توسط Sun و همکارانش همخوانی دارد (۴۳). آنها نشان دادند که یک رابطه خطی بین افزایش غلظت نانوذره اکسید آلومینیوم با کاهش نشر فلورسانس HSA در محیط وجود دارد. علاوه بر این، مطالعات انجام شده بر روی این پروتئین در تیمار با نانوذره اکسید مس نیز نشان داد، که بین کاهش نشر فلورسانس ذاتی HSA و غلظت نانوذره اکسید مس رابطه مستقیمی وجود دارد (۱) که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. از طرف دیگر، تغییر جزئی در انتقال ماکزیم طول موج نشری در حضور نانوذره به سمت ناحیه آبی (blue shift)، می‌تواند دلیلی به تغییر قطبیت محیط اطراف تریپتوفان باشد (۳۳).

ثابت خاموشی استرن-ولمر (Ksv) بیانگر کارایی خاموشی می‌باشد (۲۱)، همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، با افزایش دما، این ثابت کاهش می‌یابد که نشان دهنده کاهش تمایل اتصال لیگاند به HSA با افزایش دما می‌باشد. روند مشابهی در برهمکنش نانوذره اکسید مس با پروتئین سرم آلبومین انسانی گزارش شده است که با نتایج حاصل از این تحقیق کاملاً همخوانی دارد (۱). علاوه بر این، نتایج مشابهی در اتصال CdTe:Zn2+ به HSA گزارش گردیده است (۲۳). از آنجائیکه، ثابت سرعت خاموشی در تمامی دماها، بالاتر از Kq مربوط به این مولکول زیستی (1 s-1 mol-1 × 2.0) می‌باشد، پیشنهاد می‌گردد که مکانسیم میانکنش بین HSA و nFe2O3 از نوع پایا می‌باشد (۱۳، ۱۸، ۲۳). بر اساس نتایج گزارش شده

دو طول موج افزایش می‌یابد که پیشنهاد می‌شود، محتوای آلفا هلیکس در میانکنش با این ذره افزایش یافته است (۳۳ و ۱۷).

میانکنش این نانوذره با HSA منجر به تغییراتی در ساختار دوم این پروتئین می‌شود که با مشاهدات Sen و همکاران مطابقت دارد (۴۰). آنها گزارش کردند که ساختار دوم HSA پس از اتصال به نانو ذرات طلا تغییر می‌کند. مجموع مطالعات فلورسانس ذاتی، ANS و دورنگ‌نمایی دورانی نشان دهنده تغییر ساختار پروتئین پس از اتصال به  $n\text{Fe}_2\text{O}_3$  می‌باشد. لذا حضور این مواد در طبیعت و وارد شدن احتمالی آنها به داخل بدن موجودات زنده به ویژه انسان، می‌تواند ساختار و عملکرد پروتئین‌ها را تحت تاثیر قرار دهد و حیات آنها را مختل نماید. بنابراین در نظر گرفتن جنبه‌های زیستی محیطی و ایمنی استفاده از نانومواد در مراحل اولیه از اهمیت بالایی برخوردار است (۷).

#### تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته با شماره قرارداد ۱/۴۰۳۱ انجام شده است. لذا مجری و همکاران مراتب سپاس و قدردانی خود را از آن مجموعه محترم اعلام می‌دارند.

اکسید مس (با اندازه متوسط ۶۰ نانومتر) می‌تواند به دلیل اندازه متفاوت این ذرات باشد (۲۳).

ANS به علت اینکه یک فلوروفور هیدروفوب است، نشر آن پس از اتصال به محیط‌های هیدروفوب افزایش می‌یابد (۵ و ۵۲). براساس شکل ۴، شدت نشر فلورسانس ANS در حضور HSA افزایش یافته است، ولی شدت نشر در زمانیکه پروتئین به نانوذره متصل می‌باشد بیشتر می‌شود. با توجه به افزایش بیشتر شدت نشر ANS در پروتئین میانکنش داده با نانوذره، پیشنهاد می‌شود که نانوذره با پروتئین میانکنش داده و باعث افزایش پاکت‌های هیدروفوب در دسترس می‌شود (۳۱). نتایج حاصل از میانکنش HSA با نانوذره اکسید آهن با نتایج مربوط به افزایش نشر فلورسانس ANS در HSA میانکنش داده با نانوذره اکسید مس، مطابقت دارد (۱). افزایش نشر افزایش نشر فلورسانس ANS و همچنین کاهش نشر فلورسانس ذاتی HSA در کمپلکس با نانوذره اکسید آهن، می‌تواند نشان دهند باز شدن (فشرده‌گی کمتر) ساختار این پروتئین پس از اتصال به نانوذره باشد (۳).

همانطور که در شکل ۵ قابل مشاهده است، پیک‌ها در دو طول موج ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر مینیمم می‌باشد که نشان دهنده محتوی بالای آلفا هلیکس در این پروتئین‌ها می‌باشد. در میانکنش HSA با نانوذره، میزان باند منفی در این

#### منابع

- ۱- ریاحی مدوار، ع، قاسمی نسب، ع. ۱۳۹۶. مطالعه میانکنش نانوذره اکسید مس با آلبومین سرم انسانی با استفاده از تکنیک فلورسانس.
- 2- Akbarzadeh, A. Samiei, M. Davaran, S. 2012. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res Lett*: 7:1-13.
- 3- Alipour, BS. Hosseinkhani, S. Ardestani, SK. Moradi, A. 2009. The effective role of positive charge saturation in bioluminescence color and thermostability of firefly luciferase. *Photochem Photobiol Sci*: 8: 847-855.
- 4- Alowitz, MJ. Scherer, MM. 2002. Kinetics of nitrate, nitrite, and Cr (VI) reduction by iron metal. *Environ Sci Technol*: 36: 299-306.
- 5- Andrade, JD. Hlady, V. Feng, L. Tingey, K. 1996. Proteins at interfaces: principles, problems, and potential. *Interfacial phenomena and bioproducts*: 19-55.
- 6- Ball, P. 2002. Natural strategies for the molecular engineer. *Nanotechnology*: 13: 15-28
- 7- Baun, A. Hartmann, NB. Grieger, K. Kusk, KO. 2008. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology*: 17: 387-95.

- 8- Behzadi, E. Sarsharzadeh, R. Nouri, M. Attar, F. Akhtari, K. Shahpasand, K. Falahati, M. 2019. Albumin binding and anticancer effect of magnesium oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*: 14: 257-270.
- 9- Bhogale, A. Patel, N. Mariam, J. Dongre, PM. Miotello, A. Kothari, DC. 2014. Comprehensive studies on the interaction of copper nanoparticles with bovine serum albumin using various spectroscopies. *Colloids Surf B Biointerfaces*: 113: 276-284.
- 10- Brunner, TJ. Wick, P. Manser, P. Spohn, P. Grass, RN., Limbach, LK. Bruinink, A. Stark, WJ. 2006. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ Sci Technol*: 40: 4374-4381.
- 11- Carter, DC. Ho, JX. 1994. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem*: 45: 153-203.
- 12- Chamani, J. Vahedian-Movahed, H. Saberi, MR. 2011. Lomefloxacin promotes the interaction between human serum albumin and transferrin: A mechanistic insight into the emergence of antibiotic's side effects. *J Pharm Biomed Anal*: 55: 114-124.
- 13- Chen, L. Wu, M. Lin, X. Xie, Z. 2011. Study on the interaction between human serum albumin and a novel bioactive acridine derivative using optical spectroscopy. *J Lumin*: 26: 172-177.
- 14- Chertok, B. Moffat, BA. David, AE. Yu, F. Bergemann, C. Ross, BD. Yang, VC. 2008. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials*: 29: 487-496.
- 15- Corredor, E. Testillano, PS. Coronado, MJ. Gonzalez-Melendi, P. Fernandez-Pacheco, R. Marquina, C. Ibarra, MR. Fuente, JM. Rubiales, D. Perez-de-Luque, A. Risueno, MC. 2009. Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: in situsubcellular identification. *BMC Plant Biol*: 9: 1-11.
- 16- Sani, FD. Shakibapour, N. Beigoli, S. Sadeghian, H. Hosainzadeh, M. Chamani, J. 2018. Changes in binding affinity between ofloxacin and calf thymus DNA in the presence of histone H1: Spectroscopic and molecular modeling investigations. *J Lumin*: 203: 599-608.
- 17- Fu, H. ed., 2004. Protein-protein interactions: methods and applications (Vol. 261). Springer Science & Business Media (SSBM).
- 18- Gelamo, EL. Silva, CHTP. Imasato, H. Tabak, M. 2002. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling. *BBA Protein Struct Mol Enzym*: 1594: 84-99.
- 19- Griffitt, RJ. Weil, R. Hyndman, KA. Denslow, ND. Powers, K. Taylor, D. Barber, DS. 2007. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol*: 41: 8178-8186.
- 20- He, XM. Carter, DC. 1992. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*: 358: 209-215.
- 21- Hosainzadeh, A. Gharanfoli, M. Saberi, MR. Chamani, J. 2012. Probing the interaction of human serum albumin with bilirubin in the presence of aspirin by multi-spectroscopic, molecular modeling and zeta potential techniques: Insight on binary and ternary systems. *J Biomol Struct Dyn*: 29: 1013-1050.
- 22- Huang, S. Qiu, H. Liu, Y. Huang, C. Sheng, J. Su, W. Xiao, Q. 2015. Molecular interaction investigation between three CdTe: Zn<sup>2+</sup> quantum dots and human serum albumin: a comparative study. *Colloids Surf B Biointerfaces*: 136: 955-962.
- 23- Iranfar, H. Rajabi, O. Salari, R. Chamani, J. 2012. Probing the interaction of human serum albumin with ciprofloxacin in the presence of silver nanoparticles of three sizes: multispectroscopic and  $\zeta$  potential investigation. *J Phys Chem B*: 116: 1951-1964.
- 24- Kandagal, PB. Shaikh, SMT. Manjunatha, DH. Seetharamappa, J. Nagaralli, BS. 2007. Spectroscopic studies on the binding of bioactive phenothiazine compounds to human serum albumin. *J Photochem Photobiol A Chem*: 189: 121-127.
- 25- Lakowicz, JR. ed. 2013. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer science & business media (SSBM).
- 26- Lee, WM. An, YJ. Yoon, H. Kweon, HS. 2008. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environ Toxicol Chem*: 27: 1915-1921.
- 27- Li, Y. He, W. Liu, H. Yao, X. Hu, Z. 2007. Daidzein interaction with human serum albumin studied using optical spectroscopy and molecular modeling methods. *J Mol Struct*: 831: 144-150.
- 28- Nowack, B. Bucheli, TD. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ Pollut*: 150: 5-22.

- 29- Petitpas, I. Grüne, T. Bhattacharya, AA. Curry, S. 2001. Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *J Mol Biol*: 314: 955-960.
- 30- Pinto-Alphandary, H. Andremont, A. Couvreur, P. 2000. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *Int J Antimicrob Agents* 13: 155-168.
- 31- Rabbani, G. Khan, MJ. Ahmad, A. Maskat, MY. Khan, RH. 2014. Effect of copper oxide nanoparticles on the conformation and activity of  $\beta$ -galactosidase. *Colloids Surf B Biointerfaces*: 123: 96-105.
- 32- Roco, MC. 2003. Broader societal issues of nanotechnology. *J Nanopart Res* 5: 181-189.
- 33- Roco, MC. 1999. Nanoparticles and nanotechnology research. *J Nanopart Res*: 1: 1.
- 34- Ross, PD. Subramanian, S. 1981. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*: 20: 3096-3102.
- 35- Rothen-Rutishauser, BM. Schürch, S. Haenni, B. Kapp, N. Gehr, P. 2006. Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environ Sci Technol*: 40: 4353-4359.
- 36- Roy, S. Das, TK. 2014. Spectroscopic studies of interaction between biologically synthesized silver nanoparticles and bovine serum albumin. *J Nanosci Nanotechnol*: 14: 4899-4905.
- 37- Sanei, H. Asoodeh, A. Hamedakbari-Tusi, S. Chamani, J. 2011. Multi-spectroscopic investigations of aspirin and colchicine interactions with human hemoglobin: binary and ternary systems. *J Solution Chem*: 40: 1905-1931.
- 38- Sarvandi-Dehghanpoor, E. Riahi-Madvar, A. Lotfi, S. Torkzadeh-Mahani, M. 2018. Improvement of kinetic properties and thermostability of recombinant *Lepidium draba* peroxidase (LDP) upon exposed to osmolytes. *Int J Biol Macromol* 119: 1036-1041.
- 39- Schrick, B. Blough, J.L. Jones, AD. Mallouk, TE. 2002. Hydrodechlorination of trichloroethylene to hydrocarbons using bimetallic nickel-iron nanoparticles. *Chem Mater*: 14: 5140-5147.
- 40-Sen, T. Mandal, S. Haldar, S. Chattopadhyay, K. Patra, A. 2011. Interaction of gold nanoparticle with human serum albumin (HSA) protein using surface energy transfer. *J Phys Chem C* : 115: 24037-24044.
- 41- Shahabadi, N. Razlansari, M. 2020. Exploring the binding mechanisms of inorganic magnetic nanocarrier containing L-Dopa with HSA protein utilizing multi spectroscopic techniques. *J Biomol Struct Dyn*:1-8.
- 42- Sharifi-Rad, A. Mehrzad, J. Darroudi, M. Saberi, MR. Chamani, J. 2021. Oil-in-water nanoemulsions comprising Berberine in olive oil: biological activities, binding mechanisms to human serum albumin or holo-transferrin and QMMD simulations. *J Biomol Struct Dyn*: 39: 1029-1043.
- 43- Sun, W. Du, Y. Chen, J. Kou, J. Yu, B. 2009. Interaction between titanium dioxide nanoparticles and human serum albumin revealed by fluorescence spectroscopy in the absence of photoactivation. *J Lumin*: 129: 778-783.
- 44- Sun, YP. Li, XQ. Cao, J. Zhang, WX. Wang, H.P. 2006. Characterization of zero-valent iron nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci*: 120: 47-56.
- 45- Tang, J. Lian, N. He, X. Zhang, G. 2008. Investigation of the interaction between sophoricoside and human serum albumin by optical spectroscopy and molecular modeling methods. *J Mol Struct*: 889: 408-414.
- 46- Wang, SL. Lin, SY. Li, MJ. Wei, YS. Hsieh, TF. 2005. Temperature effect on the structural stability, similarity, and reversibility of human serum albumin in different states. *Biophys Chem*: 114: 205-212.
- 47- Volkova, KD. Kovalska, VB. Tatarets, AL. Patsenker, LD. Kryvorotenko, DV. Yarmoluk, SM. 2007. Spectroscopic study of squaraines as protein-sensitive fluorescent dyes. *Dyes Pigm*: 72: 285-292.
- 48- Wei, C. Zhang, Y. Guo, J. Han, B. Yang, X. Yuan, J. 2010. Effects of silica nanoparticles on growth and photosynthetic pigment contents of *Scenedesmus obliquus*. *J Environ Sci*: 22: 155-160.
- 49- Wei, YL. Li, JQ. Dong, C. Shuang, SM. Liu, DS. Huie, CW. 2006. Investigation of the association behaviors between biliverdin and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy. *Talanta*: 70: 377-382.
- 50- Wörle-Knirsch, JM. Kern, K. Schleh, C. Adelhelm, C. Feldmann, C. Krug, HF. 2007. Nanoparticulate vanadium oxide potentiated vanadium toxicity in human lung cells. *Environ Sci Technol*: 41: 331-336.

- 51- Xie, MX. Long, M. Liu, Y. Qin, C. Wang, YD. 2006. Characterization of the interaction between human serum albumin and morin. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*: 1760: 1184-1191.
- 52- Yousefi-Nejad, M. Hosseinkhani, S. Khajeh, K. Ranjbar, B. 2007. Expression, purification and immobilization of firefly luciferase on alkyl-substituted Sepharose 4B. *Enzyme Microb Technol*: 40: 740-746.
- 53- Zhang, H. Wu, P. Zhu, Z. Wang, Y. 2015. Interaction of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles with fibrinogen. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*: 151: 40-47.
- 54- Zhang, WX. 2003. Nanoscale iron particles for environmental remediation: an overview. *J Nanopart Res*: 5: 323-332.
- 55- Zhu, MT. Feng, WY. Wang, Y. Wang, B. Wang, M. Ouyang, H. Zhao, YL. Chai, ZF. 2009. Particokinetics and extrapulmonary translocation of intratracheally instilled ferric oxide nanoparticles in rats and the potential health risk assessment. *Toxicol Sci*: 107: 342-351.

## Investigation of the Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticle interaction with human serum albumin using fluorescence and circular dichroism techniques

Riahi-Madvar A.<sup>1\*</sup>, Ghaseminasab A.<sup>2</sup>, Barzegary-Dehaj F.<sup>3</sup>, Rezaee F.<sup>4</sup> and Zamani Z.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, Kosar University of Bojnord, Bojnord, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> Dept. of Biotechnology, Faculty of Science and Modern Technology, Technology and Advanced Technology University, Kerman, I.R. of Iran.

<sup>3</sup> Dept. of Biotechnology, Institute of Science and High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran.

<sup>4</sup> Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

<sup>5</sup> Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. of Iran.

### Abstract

Nanoparticles (NPs) have broad applications in various industries, that it can be expected them find a way to enter into the environment and affected the living organism with unexpected consequences. According to the broad applications of the Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles (nFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in different industries, in this study, its interaction with human serum albumin (HSA), as an abundant protein in blood, was investigated using intrinsic fluorescence at different temperature ranges, extrinsic fluorescence and circular dichroism (CD) methods. Results showed, with increasing NP concentration in media, intrinsic fluorescence intensity of the protein decreased in all temperatures. Based on the quenching rate constant (K<sub>q</sub>), it revealed that interaction between HSA and nFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> take place through static mechanism. Thermodynamic parameters indicate the sign of enthalpy and entropy are negative, which implies the role of hydrogen bonds and Van der Waals forces in this interaction. The negative sign of free energy ( $\Delta G^\circ$ ), revealed this reaction is exergonic and spontaneously. On the other hand, ANS fluorescence intensity increased more for HSA in interaction with NP in contrast to the ANS. Furthermore, Far-UV CD spectra shows an alteration in the secondary structure of this protein in interaction with the NP. The results all together revealed changes in the structure of HSA upon exposed to this nanoparticle which can affected its performance.

**Keywords:** Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles, Fluorescence, CD, Human Serum Albumin.