

تأثیر نانوذرات الماس بر ساختار هورمون گنادوتروپین جفتی انسانی و بررسی سطح سرمی آن در موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار

زینب اکبر کاشانی^۱، آزاده حکمت^{۲*} و سید محمد اطیابی^۱

۱- گروه بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور، تهران، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: آزاده حکمت، دکتری تخصصی بیوفیزیک، hekmat@ut.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۱۰/۱۰ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۲/۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۳/۲۷

چکیده

پیشینه مطالعه و هدف: هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (hCG) گلیکوپروتئینی است که در حین بارداری توسط سلول‌های تروفوبلاست و سنسایشیوتروفوبلاست جفت تولید می‌شوند. هورمون تولید شده بر روی جسم زرد اثر گذاشته و از تحلیل رفتن آن جلوگیری می‌کند. نانو ذرات الماس با سیستم‌های بیولوژیکی مانند پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و آنتی‌بادی‌ها برهمکنش دارند. به عبارتی نانو الماس توانایی جذب توسط بیومولکول‌ها را دارد و می‌تواند به عنوان حامل برای انتقال مواد فعال بیولوژیکی استفاده شود. هدف از انجام این مطالعه بررسی تأثیر نانو ذرات الماس بر ساختار هورمون hCG و سطح آن در موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار بود.

روش مطالعه: با استفاده از تکنیک‌های طیف‌سنجی تأثیر نانوذرات الماس بر ساختار هورمون hCG بررسی شد. موش‌ها به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم و سالین، ۲۵، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات الماس دو بار در هفته دریافت نمودند. سطح هورمون hCG در پایان مطالعه اندازه‌گیری گردید. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج: نانوذرات الماس می‌توانند با hCG کمپلکس ایجاد کنند. نتایج پتانسیل زتا و DLS نشان داد که نانوذرات موجب کاهش بار سطحی و اندازه hCG می‌گردند. تزریق نانوذرات در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش معنادار سطح هورمون hCG در مقایسه با نمونه‌های کنترل شد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نانوذرات الماس می‌توانند موجب تغییر ساختار سوم پروتئین شوند. همچنین بر فعالیت هورمون hCG اثر سمی دارد. انجام مطالعات بیشتر در بررسی آثار سمی نانوذرات الماس در دوزهای مختلف و زمان‌های مختلف در معرض قرارگیری ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (hCG)، نانو ذرات الماس، طیف‌سنجی، پتانسیل زتا، موش صحرایی

مقدمه

که سطح مناسبی از استروئیدهای جنسی را که توسط جسم زرد تولید می‌شوند حفظ می‌کند. بنابراین hCG به عنوان یک مولکول غده جنسی عمل می‌کند که بر روی تخمدان اثر کرده و به سنتز استروئید کمک می‌کند (Al-Hakeim et al., 2015; Mozafari Z. et al., 2016). گنادوتروپین‌ها هورمون‌های گلیکو پروتئینی هستند. این هورمون‌ها در رشد، تولید مثل و عملکرد جنسی نقش اساسی دارند. معروف‌ترین

هورمون‌ها مولکول‌های علامت‌دهنده (Signaling) هستند که انتقال اطلاعات را از سلولی به سلول دیگر انجام می‌دهند و می‌توانند بر اساس ماهیت شیمیایی خود به پپتید، پروتئین و استروئید طبقه‌بندی شوند. هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (hCG) یک هورمون بارداری است

دارند که توسط سلول‌های متفاوتی تولید می‌شوند و عملکردهای غیر وابسته دارند. فرم‌های hCG یک طیف گسترده از عملکردهای بیولوژیکی را در بر می‌گیرند (Cole, 2012). بسته به گونه حیوانات زیر واحد α و β hCG به ترتیب شامل ۱۲۱-۱۰۵ و ۱۰۰-۹۹ اسید آمینه می‌باشند. هر یک از این زیرواحدها به تنهایی غیرفعال می‌باشند، اما در اتصال به گیرنده و انتقال پیام، به هورمون هتروداپمر نیاز است (Garcia-Campayo *et al.*, 2001).

نانو ذرات الماس (ND; Nondiamond) اولین بار در سال ۱۹۶۰ تولید شدند. سوسپانسیون‌های کلوییدی نانو ذرات الماس با قطر ۴ تا ۵ نانومتر برای مطالعات فلورسانس استفاده می‌شوند. نانو ذرات الماس می‌توانند یک مارکر ایمن و غیر سمی برای کاربردهای پزشکی باشند. خواص سطحی جدید نانو الماس می‌توانند برای کاربردهای پزشکی مثل دارورسانی استفاده شوند. مطالعات نشان می‌دهند که نانو ذرات الماس ایمن ترین نانو مواد بر پایه کربن هستند که تاکنون استفاده شده است. نانوذرات از طریق نیروهای متفاوتی مثل برهم‌کنش هیدروفوبیک، پیوند هیدروژنی، الکترواستاتیک، پیوند کوالانسی و برهم‌کنش اندروالسی با بیومولکول‌ها در تعامل هستند. نانوذرات الماس برهم‌کنش بالایی با سیستم‌های بیولوژیکی مانند پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و آنتی‌بادی‌ها دارند. این موضوع نشان دهنده این است که نانو الماس توانایی برای جذب توسط بیومولکول‌ها را دارد و همچنین می‌تواند به عنوان حامل برای انتقال مواد فعال بیولوژیکی استفاده شوند. هر چند که این برهم‌کنش ممکن است منجر به تغییر ساختار بیومولکول شده و به مطالعات بیشتری احتیاج باشد. برای کشف مکانیسم جذب پروتئین در سطح نانو الماس ضروری است که تغییرات ساختاری پروتئین را در برهم‌کنش با نانو ذرات الماس بررسی شود که توسط تکنیک‌های UV- visible، CD، FTIR، NMR انجام می‌شود (Pishkar *et al.*, 2017). در بررسی *in vivo* در حیوانات آزمایشگاهی، با تزریق ND در خون، ND با اتصال به غشای RBC حائل ۳۰ دقیقه در گردش خون باقی می‌ماند. همچنین پاسخ ایمنی سایتوکاین التهابی TNF- α در محیط *in vivo* در مجاورت نانو ذره الماس بررسی شد که نتایج نشان داد که تحریک پاسخ ایمنی رخ نداد (Tsai *et al.*, 2016). در پژوهشی که در سال ۲۰۱۹ به بررسی اثرات ساختاری نانو ذرات الماس و داروی پکلی تاکسل (داروی درمان سرطان سینه) بر ماکرومولکول ct-DNA پرداخته شد. مقادیر ثابت اتصال، ΔH ، ΔG ، ΔS نشان داد که کمپلکس نانو الماس-پکلی تاکسل در هم افزایی با هم، نسبت به نانوذرات الماس تنها و یا داروی تنها، بر هم‌کنش قوی‌تری با DNA داشته و نیروهای هیدروفوبیک نقش اصلی را در برهم‌کنش داشته‌اند. همچنین مطالعات حاکی از پایداری DNA در حضور کمپلکس نانو الماس-پکلی تاکسل بود (Pashah *et al.*, 2019). همچنین مطالعه تاثیر نانوذرات الماس بر پروتئین سرم آلبومین انسانی نشان

گنادوتروپ‌ها در پستانداران هورمون محرکه فولیکولی (FSH)، هورمون لوتئینه کننده (LH)، تیروتروپین (TSH)، هورمون گنادوتروپین انسانی جفت (hCG; Human chorionic gonadotropin) و HMG هستند. خانواده گنادوتروپین‌ها شامل هورمون لوتئینه کننده LH، هورمون تحریک کننده فولیکول FSH با منشا هیپوفیز، گنادوتروپین کوریونی hCG با منشا جفت و هورمون تحریک کننده تیروئید و TSH می‌باشند. زیر واحد α در همه هورمون‌ها مشترک بوده و نشان دهنده هومولوژی قابل توجه از یک گونه به گونه‌های دیگر است. زیر واحد β برای هر کدام از این هورمون‌ها متفاوت است (Ryan *et al.*, 1987; Mozafari Z. *et al.*, 2016; Hekmat *et al.*, 2021). علت این که انواع hCG، همه hCG نامیده می‌شوند این است که همه آنها یک زیر واحد آلفا مشترک دارند (Cole, 2012). گنادوتروپین جفتی انسان (hCG) یک گلیکوپروتئین اسیدی است، که از مقدار زیادی قند تشکیل شده و عملکردهای بسیاری از کنترل بارداری تا سرطان دارد. hCG به ۵ فرم مختلف وجود دارد: hCG، hCG سولفات، hCG هایپرگلیکوزیله، hCG فاقد بتا و بتای فاقد هایپرگلیکوزیله، که توسط سلول‌های سنسیتیو تروفوبلاست جفت و سلول‌های گنادوتروپ هیپوفیز تولید می‌شوند (گروه ۱) و همین طور توسط سلول‌های سیتوتروفوبلاست و تومورهای بدخیم هم تولید می‌شوند (گروه ۲).

گروه ۱: هر دو هورمون هستند که عملکرد آنها روی گیرنده hCG/LH است. این مولکول‌ها چرخه قاعدگی و بارداری را در انسان کنترل می‌کنند.
گروه ۲: مولکول‌های اتوکراین هستند و عملکردی ضد رسپتور TGF بتا دارند. این سلول‌ها در بدخیمی‌های پیشرفته نقش مهمی دارند (Cole and Endocrinology, 2009).

کلمه hCG برگرفته از کلمه chorion است که از کلمه لاتین chordata به معنی پس از تولد گرفته شده است. و گنادوتروپین به این علت که یک مولکول غده جنسی است که بر روی تخمدان عمل کرده و تولید استروئید را افزایش می‌دهد. hCG از دو زیر واحد α و β تشکیل شده که به صورت غیر کوالانسی هیدروفوبیک و برهم‌کنش یونی به هم متصل هستند. وزن مولکولی hCG تقریباً ۳۶۰۰۰ است (۳۶KDa) است (Hao and Liu, 2016). این پروتئین، اسیدی‌ترین پروتئین در انسان است. بعضی از فرم‌های hCG نقطه ایزوالکتریک (pI) در حدود ۳/۱ دارند. شکل‌های مختلف hCG بیشتر گلیکوپروتئین‌های sialylated (حاوی اسید سیالیک) با نهایتاً ۱۵ رزیدو سیالیک اسید هستند. ۳۰٪ از وزن hCG قند است. در نهایت با این وزن مولکولی بالا طولانی‌ترین گردش در خون با نیمه عمر ۳۶ ساعت دارد. هر کدام از این فرم‌های hCG زیر واحدهای آمینو اسیدی یکسان

بررسی زتا پتانسیل و پراکندگی نور پویا: پتانسیل زتا و شعاع هیدرودینامیک هورمون hCG (۷ میکرومولار) در عدم حضور و حضور نانوذرات الماس ۷۱/۱۴ میکرومولار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از Zeta potential, Malvern, UK اندازه‌گیری گردید.

حیوانات، گروه بندی و تیمار: در این مطالعه تجربی، از ۲۵ سر موش صحرایی ماده بالغ از نژاد ویستار و وزن تقریبی ۱۸۰-۲۱۰ گرم استفاده گردید. همه آزمایشات بر اساس قوانین مجمع عمومی حمایت از حیوانات انجام شدند. موش‌ها در شرایط کنترل شده نور ۱۲ ساعت روشنایی / ۱۲ ساعت تاریکی، رطوبت نسبی 55 ± 5 درصد و حرارت 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حیوانات در طول مدت نگهداری به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. موش‌های آبستن به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۵ تایی شامل کنترل (فاقد تیمار)، شاهد (سالین) و گروه تجربی دریافت‌کننده نانوالماس (با دوزهای ۲۵، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. تیمار از روز ۱۲ حاملگی تا زمان زایمان به صورت دو بار در هفته و تزریق زیرپوستی انجام شد. به منظور سنجش هورمون hCG توسط کیت تشخیصی نمونه‌های در هفته آخر بارداری سانتریفیوژ (دور ۳۰۰۰) و توسط دستگاه الیزا (Automatic Elisa TKA, USA) اندازه‌گیری شدند.

آنالیز داده‌ها: داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SPSS و پیرایش ۱۸ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. به منظور تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

مطالعات طیف جذبی فرابنفش مرئی: طیف جذبی hCG در بیشینه طول موج ۲۱۸ نانومتر نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نانو الماس به آن جذب کاهش پیدا می‌کند. بررسی طیف جذبی hCG در طول موج ۲۷۶ نانومتر نشان می‌دهد (شکل ۱) که با افزایش غلظت نانو الماس به آن جذب افزایش پیدا می‌کند که به معنی تغییر در ساختار هورمون hCG می‌باشد.

مطالعات فلورسانس: شکل ۲ نمودار طیف نشر فلورسانس هورمون hCG در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قبل و پس از افزودن نانو الماس به آن را نشان می‌دهد. با افزایش نانو الماس به hCG در غلظت‌های پایین شدت فلورسانس hCG افزایش می‌یابد و با افزایش غلظت جابه

داد که ساختار پروتئین در غلظت‌های بالا تغییر می‌کند اما در غلظت‌های پایین تغییر ساختار کمی مشاهده شد (Hekmat et al., 2020).

باتوجه به مطالعات انجام شده نانوذرات الماس می‌تواند به عنوان یک داروی ضد سرطان به‌کار رود، این سوال مطرح می‌شود که آیا مصرف این نانوذرات می‌تواند بر هورمون گنادوتروپین جفتی انسان، هورمون موثر در بارداری، تاثیر بگذارد. لذا هدف کلی این مطالعه بررسی تاثیر نانوذرات الماس بر ساختار هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (hCG) و همچنین بر سطح هورمون hCG در موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار می‌باشد.

روش مطالعه

مواد مورد استفاده: پودر hCG با در صد خلوص بسیار بالا (۵۰۰۰ واحد) استخراج شده از ادرار زنان باردار، از شرکت Karma Pharmatech خریداری شد. نانو ذرات الماس (پودر، اندازه کمتر از ۱۰ نانومتر ۹۹٪ خلوص) ساخت کشور چین خریداری شد. کیت Rapid hCG از شرکت پیشنازطب خریداری شد.

مطالعات طیف جذبی مرئی - فرابنفش: در این سری آزمایشات مقدار ۲۰ میلی‌گرم از هورمون hCG (۵۰۰۰ IU) در ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر تریس ۰/۱ مولار حل گردید. طیف جذبی hCG (۷ میکرومولار) در دمای ۳۷ درجه با روبش در محدوده طول موج ۴۵۰-۲۰۰ نانومتر بدست آمد. سپس طیف جذبی hCG و نانوذرات الماس در ناحیه ۴۵۰-۲۰۰ نانومتر با استفاده از (UV-Visible Cary 60) ساخت شرکت Agilent، مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که تیتراسیون نانو ذرات الماس بر هورمون انجام شد. نانو ذرات الماس با غلظت ۷۱/۱۴-۳/۵۶ میکرومولار در دمای ۳۷ درجه (دمای فیزیولوژیک) به hCG افزوده شد، سپس تغییرات طیف جذبی hCG بررسی شد. در هنگام هر تیتراسیون محلول به خوبی هم زده شده و طیف جذبی هر تیتراسیون اندازه‌گیری شد.

مطالعات نشر فلورسانس ذاتی: اندازه‌گیری شدت نشر فلورسانس ذاتی هورمون hCG در محدوده طول موج ۳۴۰-۳۰۰ نانومتر، با طول موج تهیج در ۲۸۰ نانومتر با استفاده از Varian Cary Eclips Fluorescence Spectrophotometer انجام شد. پهنای شکاف مورد استفاده در تهیج و نشر به ترتیب ۱۰ و ۱۰ نانومتر تنظیم گردید. طیف hCG با غلظت ۷ میکرومولار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرفته شد. سپس طیف نشر فلورسانس پس از تیتراسیون نانوذرات الماس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در غلظت‌های ۷۱/۱۴-۳/۵۶ میکرومولار انجام شد.

مطالعات حیوانی: یافته‌ها نشان داد که میانگین هورمون hCG در گروه دریافت کننده ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های کنترل و دریافت کننده نانوذرات با ۲۵ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش یافته است ($p < 0.05$) (جدول ۲).

جدول ۱- تغییرات پتانسیل زتا و شعاع هیدرودینامیک گلیکوپروتئین hCG قبل و پس از افزودن نانوذرات الماس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

سیستم	R_H (nm)	پتانسیل زتا (mv)
hCG	۳/۴۰	-۱۶/۴۲
hCG+NDs	۳/۰۵	-۱۴/۳۲
NDs	۱۲۲	-۳/۵۸

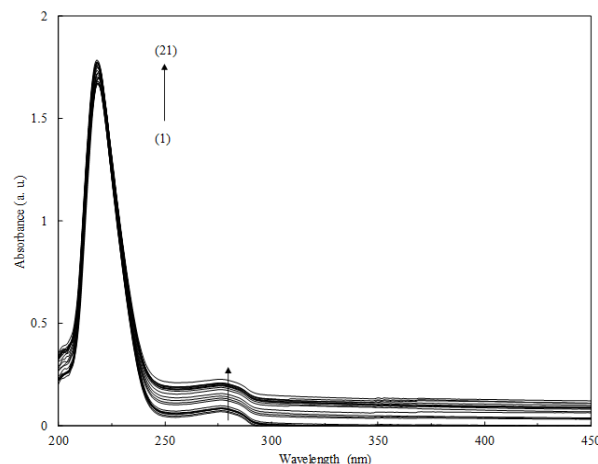
جدول ۲- میانگین و انحراف معیار hCG در گروه‌های مختلف

P value	hCG mIU/mL	شاخص گروه
	۳۳۸/۸۶	کنترل
	۳۳۵/۸۶	شم
> 0.05	۳۱۵/۳۰	۲۵ mg/kg
> 0.05	۳۰۰/۷۷	۷۵ mg/kg
< 0.05	۲۰۰/۷۷	۱۰۰ mg/kg

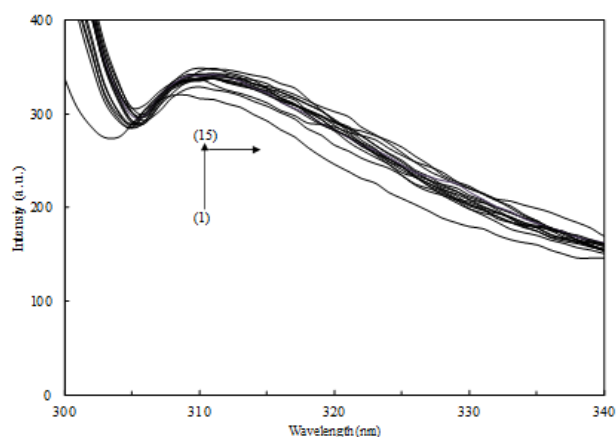
بحث

گنادوتروپین کوریونی (CG) بخشی از یک خانواده از هورمون‌ها است که شامل LH، هورمون تحریک کننده فولیکول (FSH) و هورمون تحریک کننده تیروئید (TSH) است که هورمون‌های گلیکوپروتئینی هستند که یک زیر واحد α مشترک کد شده توسط یک ژن واحد و یک زیر واحد جداگانه β که عملکرد هورمون را دیکته می‌کند، به طور مشترک دارند (Cole and Endocrinology, 2009). مطالعات نشان داده‌اند که جذب پروتئین بر سطح ممکن است باعث تغییر ساختار و باز شدن ساختاری آنها شود. به علاوه نانوذرات کروی به علت سطح وسیع و کروی خود می‌توانند وارد سلول شده و به سطح وسیعی از فرایندهای بیولوژیکی دسترسی داشته باشند (Lynch, 2008). پس از تیتراسیون نانو ذرات الماس بر روی پروتئین hCG، طیف جذبی در ۲۷۶ nm افزایش می‌یابد و جابجایی در ماکزیمم جذب دیده نمی‌شود که به معنی تغییر در ساختار hCG و تغییر در محیط اطراف اسید آمینه آروماتیک تیروزین در سطح پروتئین است (Hao and Liu, 2016). این مطلب بیانگر تغییر در ساختار پروتئین و پیش‌روی به سمت باز شدن آن است. با افزایش غلظت نانوذرات الماس نشر فلورسانس تیروزین‌ها به تدریج

جایی (Shift) اندکی به سمت طول موج‌های بیشتر (red shift) نیز در طیف دیده می‌شود.



شکل ۱- طیف جذب UV-Vis گلیکوپروتئین hCG (۱) پس از افزودن نانوذرات الماس (۲-۲۱) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH ۷/۴



شکل ۲- تغییرات در نشر hCG با افزایش غلظت نانوذرات الماس در ۳۷ درجه سانتی‌گراد. (۱) نشر hCG و (۲-۱۵) خاموشی نشر با افزایش غلظت نانوذرات الماس (۱۴/۵۶-۳/۷۱ میلی مولار). آزمایش دو بار تکرار پذیرفت.

مطالعات زتا پتانسیل و پراکندگی نور پویا (DLS): جدول ۱ تغییرات پتانسیل زتا پروتئین hCG قبل و پس از افزودن نانوذرات الماس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود بار سطحی به دست آمده از نمونه hCG برابر با -۱۶/۴۲ میلی‌ولت اندازه‌گیری شده است که در اثر برهم کنش با نانو الماس بار سطحی آن افزایش می‌یابد. همان گونه که مشاهده می‌شود شعاع هیدرودینامیک به دست آمده از hCG برابر با ۳/۴۰ نانومتر می‌باشد که پس از برهم کنش با نانو الماس مقدار آن کاهش یافته است.

با اضافه شدن نانو ذرات الماس به پروتئین، میزان پتانسیل زتا کاهش می‌یابد. اضافه شدن نانو ذرات الماس به پروتئین شکل‌گیری کمپلکس نانوذره-پروتئین را القا می‌کند که به معنی تمایل اتصال نانو الماس به پروتئین می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین بر سطح نانوالماس جذب شده است.

مطالعه حاضر همچنین نشان داد که میانگین هورمون hCG در گروه دریافت کننده ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های کنترل و دریافت کننده نانوذرات با ۲۵ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش یافته است. در بررسی برهم‌کنش ND با گلبول‌های قرمز خون در انسان و همین‌طور rat، که با UV-visible و FTIR انجام شد، نشان داده شد که نانوذرات الماس به علت خواص نوری و سطحی خود به پروتئین‌های خون جذب می‌شوند. در بررسی *in vivo* در حیوانات آزمایشگاهی، با تزریق ND در خون، ND با اتصال به غشای RBC حائل ۳۰ دقیقه در گردش خون باقی می‌ماند. همچنین پاسخ ایمنی سایتوکاین التهابی TNF- α در محیط *in vivo* در مجاورت نانو ذره الماس بررسی شد که نتایج نشان داد که تحریک پاسخ ایمنی رخ نداد (Tsai *et al.*, 2016).

رخصانی و همکاران، نشان دادند سطح سرمی FSH و LH در رت‌ها در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره، نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری می‌یابد ولی میزان پروژسترون تغییری نشان نداد (Ramezani *et al.*, 2016).

نتایج مطالعه دیگری نشان داد که نانو ذرات اکسید روی در دوزهای ۲۵۰ و ۷۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب باعث افزایش معنی‌داری در سطح هورمون‌های FSH و تستوسترون سرم خون در مقایسه با گروه کنترل در موش نر بالغ نژاد NMRI گردید در حالی که تغییر معنی‌داری در سطح هورمون LH دیده نشد (Mozafari Z. *et al.*, 2016).

اندازه‌ی نانوذرات ارتباط مستقیم با بسیاری از ویژگی‌ها مثل ویژگی سطح، انحلال‌پذیری و واکنش‌پذیری دارد. این امر بر رفتارهای سمیت نانوذرات در موجود زنده تأثیر دارد. برخلاف مزایای بی‌شمار نانوذرات کاربرد در زمینه‌ها و صنایع مختلف، برخی مطالعات سمیت و خطرات جانبی استفاده از نانوذرات را گوشزد کرده‌اند، اما در غالب موارد نتایج این مطالعات متفاوت است. با توجه به تغییرات مشاهده‌شده در سطح هورمون hCG می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات الماس بر فعالیت این هورمون اثر سمی دارد. مطالعات بیشتر در بررسی آثار سمی نانوذرات الماس در دوزهای مختلف و زمان‌های مختلف در معرض قرارگیری با نانوذرات ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

افزایش می‌یابد. همچنین افزایش بیشینه نشر فلورسانس hCG با یک جابه‌جایی به سمت راست (red shift) همراه است. این نتایج بیانگر تغییر محیط اطراف اسید آمینه تیروزین پروتئین می‌باشد. در واقع تغییرات ساختاری منطقه‌ای مربوط به تغییر محیط اطراف اسید آمینه تیروزین و یا تغییر در ساختار سوم پروتئین و آرایش کلی آن را نشان می‌دهد (Bortolotti *et al.*, 2016). نتایج بررسی تأثیر نانوذرات کلسیم فسفات (Calcium phosphate nanoparticles; CaPNP) بر hCG که توسط ال‌حکیمی و همکاران انجام شد، نشان داد شدت نشر فلورسانس پس از برهم‌کنش به میزان اندک افزایش می‌یابد. بنابراین بیان کردند که تغییراتی در ساختار سوم پروتئین در نزدیکی محیط اسید آمینه آروماتیک تیروزین روی داده و این تغییرات ناشی از برهم‌کنش بین hCG و CaPNP است (Al-Hakeim *et al.*, 2015). در بررسی دیگری رادهی در سال ۲۰۱۷ برهم‌کنش گلیکوپروتئین hCG با نانوذرات طلا را مورد بررسی قرار داد و در مطالعات طیف‌سنجی فلورسانس، افزایش نشر طیف فلورسانس پس از افزودن نانوذرات طلا دیده شد که ناشی از برهم‌کنش در نزدیکی محیط اطراف آمینواسیدهای آروماتیک تیروزین و فنیل‌آلانین هورمون hCG و همچنین تغییرات در ساختار سوم hCG بوده است (Radhi, 2017).

همچنین نتایج هائو و لیو در سال ۲۰۱۶ نیز حاکی از افزایش شدت نشر فلورسانس پس از افزودن کوانتوم دات به hCG بود که ناشی از برهم‌کنش کوانتوم دات با hCG است. در واقع ساختار hCG تغییر پیدا کرده و منجر به قرار گرفتن رزیدو تیروزین در سطح hCG شده است، که با نتایج فلورسانس تحقیق حاضر مطابقت دارد (Hao and Liu, 2016). در این پژوهش مطالعات زتا پتانسیل جهت بررسی پتانسیل سطح hCG در حضور نانو ذرات الماس انجام گرفته و در جدول ۱ گردآوری شده است. مقدار pI گلیکوپروتئین hCG معادل ۳/۱ و اسیدی‌ترین گلیکوپروتئین است. بنابراین مقدار بسیار منفی بار سطحی گلیکوپروتئین hCG در نتیجه قندهای دارای بار منفی و رزیدوهای دارای بار منفی پروتئین است (Cole, 2012). افزودن نانو ذرات الماس به گلیکوپروتئین hCG، منجر به کاهش پتانسیل زتا از ۱۶/۴۲- به ۱۴/۳۲- میلی‌ولت شده و بار سطحی پروتئین کاهش یافت. مقدار کم بار سطحی پروتئین و نانوذرات الماس بیانگر آن است که پروتئین و نانوذرات تمایل به تجمع دارند (Pishkar *et al.*, 2017). بنابراین می‌توان این‌طور استدلال کرد که اتصال بین پروتئین و نانو الماس صورت گرفته و در نتیجه باعث تغییر در پتانسیل سطح hCG شده است (Pishkar *et al.*, 2017). البته این مطلب نیاز به بررسی بیشتر دارد. بر طبق جدول ۴-۳ شعاع هیدرودینامیک به دست آمده از گلیکوپروتئین hCG برابر با ۳/۴۰ nm است که با افزودن نانوذرات الماس مقدار آن کاهش می‌یابد و به مقدار ۳/۰۵ نانومتر می‌رسد. بنابراین برهم‌کنش بین پروتئین و نانوذره تحت تأثیر بار سطحی قرار دارند. به همین دلیل

نانوذرات نشان داد. این نتایج زمینه‌ای برای بررسی‌ها و مطالعات جامع‌تر با غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت است.

تقدیر و تشکر

از کارکنان مجتمع آزمایشگاهی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

مراجع

- Al-Hakeim, H.K., Al-Zabeba, R.S., Grulke, E. and Al-Mulla, E.A.J.J.N.B.e.C. 2015. Interaction of calcium phosphate nanoparticles with human chorionic gonadotropin modifies secondary and tertiary protein structure. 14(2): 141-157.
- Bortolotti, A., Wong, Y.H., Korsholm, S.S., Bahring, N.H.B., Bobone, S., Tayyab, S., Van De Weert, M. and Stella, L.J.R.A. 2016. On the purported "backbone fluorescence" in protein three-dimensional fluorescence spectra. 6(114): 112870-112876.
- Cole, L.A. 2012. Hcg, the wonder of today's science. *Reprod Biol Endocrinol*, 10: 24.
- Cole, L.A. 2012. Hcg, the wonder of today's science. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1): 24.
- Cole, L.A.J.R.b. and *Endocrinology*. 2009. New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. 7(1): 8.
- Garcia-Campayo, V., Boime, I.J.T.i.E. and *Metabolism*. 2001. Novel recombinant gonadotropins. 12(2): 72-77.
- Hao, M. and Liu, R.J.R.A. 2016. Influence of mercaptopropionic-acid-capped cdte quantum dots on the human chorionic gonadotropin structure and activity alterations. 6(84): 80383-80389.
- Hekmat, A., Gheisari, A. and Divsalar, A. 2021. Structural properties of human chorionic gonadotropin (hcg) affected by ultrasonic irradiation: An in vitro study. *Physical Chemistry Research*, 9(3): 467-482.
- Hekmat, A., Salavati, F. and Hesami Tackallou, S. 2020. The effects of paclitaxel in the combination of diamond nanoparticles on the structure of human serum albumin (hsa) and their antiproliferative role on mda-mb-231 cells. *Protein J*: 268-283.
- Mozafari Z., Hayati Roodbari N., Parivar K. and SH., I. 2016. Investigation on the effect of zinc oxide nanoparticle on lh, fsh and testosterone hormones in adult male nmri mice. *Journal of Animal Biology*, 8(2): -.
- Pashah, Z., Hekmat, A., Hesami Tackallou, S.J.N., *Nucleotides and Acids*, N. 2019. Structural effects of diamond nanoparticles and paclitaxel combination on calf thymus DNA. 38(4): 249-278.
- Pishkar, L., Taheri, S., Makarem, S., Alizadeh Zeinabad, H., Rahimi, A., Saboury, A.A. and Falahati, M. 2017. Studies on the interaction between nanodiamond and human hemoglobin by surface tension measurement and spectroscopy methods. *J Biomol Struct Dyn*, 35(3): 603-615.
- Radhi, S.W.J.N.B.E. 2017. Interaction of colloidal gold nanoparticles with protein. 9(4): 298-305.
- Ramezani, M., Rezaei, S., Nasri, S. and Hooshyar, L. 2016. Investigation the effects of silver nano particles on ovary tissue and hpg axis in rats. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 6(24): 37-42.
- Ryan, R., Keutmann, H., Charlesworth, M., McCormick, D., Milius, R., Calvo, F. and Vutyavanich, T. 1987. Structure-function relationships of gonadotropins. In: *Proceedings of the 1986 Laurentian Hormone Conference*. Elsevier: pp: 383-429.
- Tsai, L.W., Lin, Y.C., Perevedentseva, E., Lugovtsov, A., Priezhev, A. and Cheng, C.L. 2016. Nanodiamonds for medical applications: Interaction with blood in vitro and in vivo. *Int J Mol Sci*, 17(7), 1111.

Research Article

The effect of diamond nanoparticles on the structure of human chorionic gonadotropin and its serum level in Female Wistar Rats

Zeynab Akbarkashani¹, Azadeh Hekmat^{2,*}, and Seyed Mohammad Atyabi¹

¹ Department of Pilot Biotechnology, Pasteur Institute, Tehran, Iran

² Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Correspondence to Azadeh Hekmat, Ph.D., hekmat@ut.ac.ir

Received 2nd December 2020 Revised 6th March 2021 Accepted 6th May 2021

Abstracts

Introduction and Aim: Human chorionic gonadotropin (hCG) is a glycoprotein produced during pregnancy by trophoblast and placental syncytiotrophoblast cells. The produced hCG hormone affects the corpus luteum and prevents it from being destroyed. Studies show that diamond nanoparticles (NDs) interact with biological systems such as proteins, enzymes, and antibodies. In other words, NDs are capable of being absorbed by biomolecules and can also be used as a carrier for the transport of biologically active substances. This study aimed to investigate the effect of NDs on hCG structure and on hCG level in Wistar rats.

Methods: The effect of 10 nm NDs on the structure of hCG was investigated using spectroscopic techniques. Rats were randomly divided into five groups: Control, sham, and experimental groups (received NDs solution at doses of 25, 75, and 100 mg/ml). Injections were carried out twice a week. Then, serum biochemical parameters were calculated. Data were analyzed utilizing one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.

Results: The results showed that NDs could form a complex with hCG. The zeta potential and DLS results showed that NDs cause a decrease in the surface charge and size of hCG. Administration of NDs in concentrations of 100 mg/ml significantly decreased hCG levels compared with that of control samples ($P < 0.05$).

Conclusion: Based on the investigation NDs could change the tertiary structure of hCG. NDs had toxic effects on hCG function. More studies to explore the toxic effects of NDs in various doses and times of exposure seem to be necessary.

Keywords: Human Chorionic Gonadotropin (hCG); Diamond nanoparticles; Spectroscopy; Zeta potential, Rats