



# اندازه‌گیری نوری کاهش تجمعات پروتئینی آمیلوئید بتا در اثر حضور نانوذرات نقره

محمد جمالی<sup>۱</sup>، سارا شیخلی<sup>۲</sup>، سلمان مهاجر مازندرانی<sup>۱،۳\*</sup>، محمد حسین مجلس آرا<sup>۱،۳</sup>

۱ - آزمایشگاه بیوفوتونیک، دانشکده فیزیک، دانشگاه خوارزمی، کرج، ایران

۲ - دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، کرج، ایران

۳ - پژوهشکده علوم کاربردی، دانشگاه خوارزمی، کرج، ایران

**چکیده:** تجمعات آمیلوئیدبتا به عنوان شاخص وجود بیماری‌های متفاوت توجه پژوهشگران است. در حال حاضر، رایج‌ترین روش بررسی مقدار تجمعات آمیلوئیدی در حضور یک ترکیب، استفاده از تست تیوفلاوین تی است که براساس طیف نشری مولکول تیوفلاوین تی عمل می‌کند. بطور معمول باز شدن تجمعات پروتئین آمیلوئیدبتا باعث کاهش نشر فلوروسانس تیوفلاوین تی می‌شود. اما این روش عاری از خطا نبوده و بنابراین، وجود تست‌های تکمیلی دیگر حائز اهمیت است. در این پژوهش، از روش جاروب Z برای اندازه‌گیری ضریب شکست غیرخطی پروتئین آمیلوئیدبتا در حضور نانوذرات نقره با غلظت‌های متفاوت استفاده شده است. مطابق نتایج، نانو ذرات نقره مرتبه‌ی بزرگی ضریب شکست غیرخطی آمیلوئید بتا را از  $10^{-10}$  به  $10^{-9}$  تغییر داد و با افزایش غلظت نانوذرات نقره، اندازه‌ی ضریب شکست غیر خطی بزرگتر شد. در هر دو تست، موثرترین غلظت،  $0.24 \mu\text{g/ml}$  بود که بیشترین کاهش نشر فلوروسانس و بزرگترین اندازه ضریب شکست غیرخطی را نتیجه داد. بنابراین، نتایج هر دو تست کاملاً با هم مطابقت داشتند به صورتی که هرچه اندازه ضریب شکست غیرخطی با زیاد شدن غلظت نانوذرات افزایش پیدا کند، شدت نشر فلوروسانس در آن غلظت‌ها کاهش می‌یابد. در نتیجه حضور نانوذرات نقره باعث کاهش تجمعات آمیلوئیدی می‌شود که بصورت کمی قابل اندازه‌گیری است.

**واژگان کلیدی:** نانوذرات نقره، پروتئین آمیلوئیدبتا، نشر فلوروسانس، ضریب شکست غیرخطی

\*mohajer@khu.ac.ir

تجمعات پروتئین آمیلوئیدتا فرایندی است که طی آن پپتیدهای تکپاری و محلول پروتئینی دچار تاخوردگی اشتباه شده و در هم تنیده می‌شوند. در نهایت فیبریل‌های آمیلوئیدی به وجود می‌آیند که حاوی ساختار ورقه‌ای بتا هستند [۱]. آمیلوئیدتا در نتیجه برش‌های نامناسب و متوالی پروتئین پیشساز آمیلوئیدی توسط آنزیم بتا سکریتاز و به دنبال آن گاما سکریتاز در مغز ایجاد می‌شود [۲]. تجمعات آمیلوئیدتا در بافت‌های مختلف بدن از جمله: مغز و سیستم عصبی مرکزی، ماهیچه، پوست، بافت‌های چربی، روده، اندوتلیوم و قلب توانایی تشکیل دارند. در واقع، انباشتگی تجمعات آمیلوئیدتا در مغز و یا گردش خون حاکی از وجود بیماری‌های متفاوتی است و بدین ترتیب زمینه ایجاد انواع بیماری‌های مزمن مانند: آلزایمر [۳، ۴ و ۵]، تخریب شبکه چشم [۶، ۷ و ۸]، پارکینسون [۵، ۹ و ۱۰]، بیماری‌های قلبی-عروقی [۱۱، ۱۲ و ۱۳]، دیابت نوع II [۵، ۱۴ و ۱۵]، بیماری اسکروز جانبی آمیوتروفیک [۵، ۱۶ و ۱۷] و بیماری کروتز فلد جاکوب [۱۸] را فراهم می‌کند. بنابراین، جلوگیری از تشکیل تجمعات آمیلوئیدی دارای اهمیت بالایی است. درحال حاضر، یکی از رایج‌ترین روش‌های بررسی و کمی‌سازی سینتیک فیبریلاسیون تجمعات آمیلوئیدی در پاسخ به ترکیبات ضد آمیلوئیدی متفاوت تست نشر فلئورسانس با استفاده از مارکر تیوفلاوین تی است. تیوفلاوین تی نوعی رنگ بنزوتیولی است که پس از برخورد با تجمعات آمیلوئیدی حاوی ورقه‌های بتا به آن متصل می‌شود و فلورسانس شدیدی را در طول موج برانگیختگی ۴۹۰ نانومتر نشر می‌کند. بنابراین افزایش شدت نشر فلورسانس حاکی از افزایش مقدار تجمعات آمیلوئیدی است و کاهش نشر بیانگر بازشدگی فیبریل‌ها است. با وجود اینکه این تست به صورت کلی در شناسایی ترکیبات ضد آمیلوئیدی موثر واقع شده اما تحت تاثیر عوامل محیطی امکان خطا در آن وجود دارد. در محیط‌هایی که افزون بر پروتئین مواد دیگری مانند پلی ساکاریدها حضور داشته باشند، تیوفلاوین تی ممکن است حساسیت کافی را در تشخیص پروتئین‌های آمیلوئیدی نداشته باشد و به مولکول‌های دیگر متصل شود. همچنین، برخی از ترکیبات ممکن است گستره طیفی مشابه مانند مولکول‌های تیوفلاوین تی را داشته باشند. در

نتیجه تیوفلاوین تی با آن ترکیبات برای اتصال به تجمعات در رقابت قرار می‌گیرد که ممکن است منجر به نتایج اشتباه شود. علاوه بر این، مولکول تیوفلاوین تی در اتصال به برخی از ترکیبات پلی فنولی حساسیت کافی ندارند و در برخی غلظت‌ها ممکن است به نتایج نادرست منجر شود. همچنین طیف نشر مولکول رنگی تیوفلاوین تی به دلیل حساسیت بالا به عوامل محیطی از جمله گرانش محیطی، pH، و ... می‌تواند دچار خطا در نتیجه‌گیری شود. به همین دلیل، برای صحت نتایج حاصل، می‌توان از تست‌های مکمل دیگری در کنار تست نشر فلئورسانس استفاده کرد تا نتایج حاصل به صورت دقیق‌تر ارائه شود [۱۹-۲۸]. از روش‌های نوری مانند تکنیک جاروب Z به دلیل اندازه‌گیری دقیق، عدم حساسیت بالا به اثرات محیطی و توجیح اقتصادی نسبت به طیف‌سنجی فلئورسانس می‌توان برای بررسی تجمعات آمیلوئیدی استفاده کرد [۲۹]. در این آزمایش از نانوذرات نقره به دلیل ویژگی آنتی اکسیدانی و ضد التهابی استفاده شده است [۳۰ و ۳۱]. در این پژوهش، با استفاده از طیف‌سنجی فلئورسانس و به کمک مارکر تیوفلاوین تی مقدار نشر آمیلوئیدتا خالص اندازه‌گیری شده است. با افزودن نانوذرات نقره به ترکیب آمیلوئیدتا خالص، شدت نشر فلئورسانس ترکیب آمیلوئیدتا-نقره نسبت به آمیلوئیدتا خالص کاهش پیدا کرده است و با افزایش غلظت نانوذرات نقره در آن، پیک شدت فلئورسانس کاهش می‌یابد که نشان دهنده تاثیر مثبت نانوذرات نقره در تخریب ساختار تجمعات و کاهش مقدار تجمعات آمیلوئیدتا است. در ادامه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، تصویر تجمعات آمیلوئیدی را پیش و پس از افزودن نانوذرات نقره به آن نمایش داده شده است. همچنین، با توجه به تست مرئی-فرابنفش از آمیلوئیدتا خالص و ترکیب آمیلوئیدتا-نقره، این تغییر ساختار با توجه به جابه جایی پیک پلاسمونیک آمیلوئیدتا خالص نسبت به ترکیب آمیلوئیدتا-نقره مشخص شده است. جذب خطی هر یک مواد با استفاده از قانون بیر-لامبرت به دست آمده و در ادامه، با استفاده از تکنیک جاروب Z، ضریب شکست غیرخطی آمیلوئیدتا خالص و هر یک از ترکیبات آمیلوئیدی حاوی نانوذرات نقره محاسبه شده است. نتایج حاصل از روش جاروب Z و نشر فلئورسانس مواد با یکدیگر مقایسه شده و نتایج نشان دهنده تطبیق کامل هر دو تست با یکدیگر است.

## ۲- مواد و روش‌ها

در این پژوهش، از نانوذرات نقره با خلوص ۹۹,۹۹ درصد و ابعاد ۲۰ نانومتر، پودر لیزوزیم، هیدروکلریک اسید ۳۷ درصد، گلیسین و آب مقطر به عنوان حلال و مارکر تیوفلاوین تی به منظور آشکارسازی پروتئین آمیلوئیدتا در طیف‌سنج فلورئورسانس استفاده شده است.

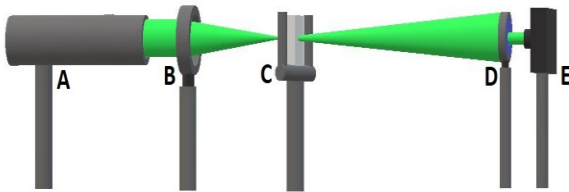
### ۲-۱- آماده سازی نمونه‌ها

ابتدا مقادیر ۰,۰۰۱۵، ۰,۰۰۳، ۰,۰۰۶ و ۰,۰۱۲ میلی گرم از پودر نانو ذرات نقره با ترازو وزن شده و هر کدام از آن‌ها به ۵۰ سی-سی آب مقطر اضافه شده است. محلول‌های حاصل تحت حمام فراصوت پروبی به مدت ۳۰ دقیقه با توان ۸۰ وات قرار گرفته و با آشکار ساز ثبت می‌شود. اندازه گیری توان نمونه را ابتدا بدون حضور نمونه در چیدمان و بار دیگر در حضور آن انجام می‌دهیم. نمودار حاصل از این دو توان به صورت یک نمودار خطی با شیب صعودی به دست می‌آید. شیب نمودار جذب خطی برای هر نمونه را مشخص می‌کنیم و با استفاده از  $\log \frac{I_0}{I} = \alpha L$  که به قانون بیر-لامبرت معروف است، اندازه ضریب جذب خطی ترکیب نانوذرات نقره و آمیلوئیدتا را در غلظت‌های متفاوت به دست می‌آوریم [۳۲ و ۳۳].

در شکل ۲، نمودار  $\alpha$  ضریب جذب نقره در غلظت‌های متفاوت را نشان می‌دهد. همچنین، در نمودار  $\beta$ ، به آمیلوئیدتا نانو ذرات نقره افزوده شده است و نمودار ضریب جذب خطی این ترکیب در غلظت‌های متفاوت مشخص است.

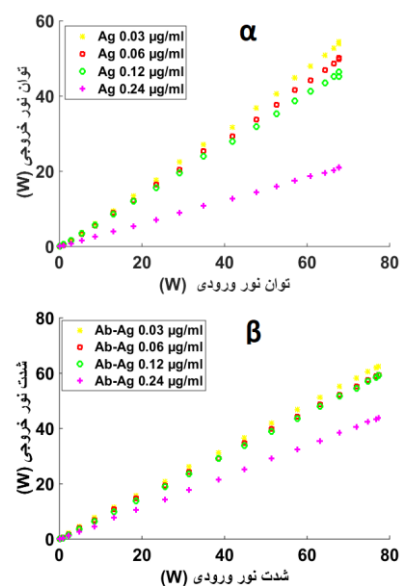
### ۲-۴- ضریب شکست غیرخطی

روش جاروب Z به دو صورت دریاچه بسته و دریاچه باز استفاده می‌شود که در این پژوهش با استفاده از حالت دریاچه بسته مطابق شکل ۳، ضریب شکست غیرخطی مواد اندازه‌گیری می‌شود. در این چیدمان از یک لیزر طول موج پیوسته با طول موج ۵۳۲ نانومتر و توان ۵۰ میلی وات با نور خروجی متقارن، عدسی با ابیروی کم و توان همگرایی مناسب با فاصله کانونی ۸ سانتی‌متر، روزنه با قطر ۵ میلی‌متر و آشکارساز نوری استفاده شده است. دسته پرتوهای موازی لیزر با عدسی کانونی شده و در راستای محور نوری عبور کرده و به آشکارساز می‌رسد.



شکل ۳-چیدمان جاروب Z در حالت دریاچه بسته.

برای به دست آوردن اندازه ضریب شکست غیرخطی مواد از معادله  $n_2 = \frac{\lambda \Delta\phi}{(2 \pi I_0 L_{eff} (0.406) (1-s)^{0.25}}$  استفاده شده است. در این معادله  $\lambda$  طول موج لیزر و  $\Delta\phi$  اندازه فاصله قله تا دره در نمودار جاروب Z در حالت دریاچه بسته را نشان می‌دهد. مطابق معادله  $s = 1 - \exp\left(\frac{-2r^2}{w^2}\right)$ ، نسبت شدت نور ورودی به روزنه به شدت کل نور رسیده به صفحه روزنه را با  $s$  نمایش داده شده است. در چیدمان دریاچه بسته با استفاده از روزنه‌ای به قطر  $r$  بخش مرکزی جبهه موج را از کل جبهه موج جدا شده است. قطر پرتو ثابت است و با حرکت دادن نمونه در راستای محور Z، شدت ورودی به آشکارساز تغییر کرده و ثبت می‌شود. شدت ثبت شده بر تابع نظری برازش شده و ضریب شکست غیرخطی به دست می‌آید.



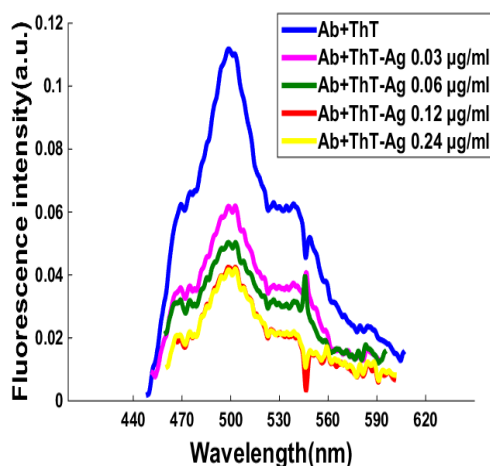
شکل ۲-نمودار جذب خطی.  $\alpha$  جذب خطی برای نقره -  $\beta$  جذب خطی برای ترکیب آمیلوئیدتا-نقره.

اندازه ضریب شکست غیرخطی حاصل از آمیلوئیدیتا خالص  $3.94 \times 10^{-10}$  است. در ادامه تست جاروب Z در حالت دریچه بسته بر نانوذره نقره و ترکیب آمیلوئیدیتا-نقره انجام شده است که مطابق نمودار شکل ۵، رفتار غیرخطی ماده مشخص شده و مقادیر حاصل از این رفتار در جدول ۱ گزارش شده است.

## ۵-۲- فوتولومینسانس

فوتولومینسانس از انواع لومینسانس است که فرایند نشر نور از ترازهای برانگیخته اتمی را نشان می‌دهد. این برانگیختگی ارتباط مستقیم با منبع و نوع ماده دارد.

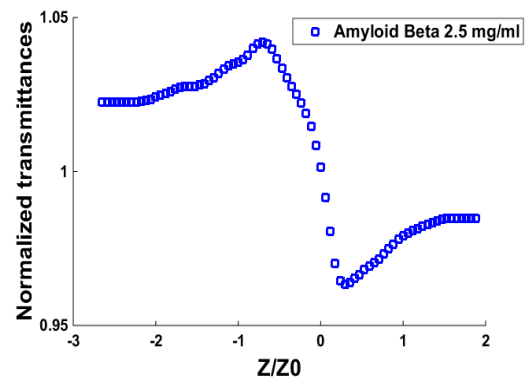
برای تشخیص مقدار بازشدگی تجمعات آمیلوئیدی، از طیف سنجی فلوئورسانس استفاده می‌شود. در این چیدمان از لیزر آبی با طول موج ۴۱۰ نانومتر و توان ۱۰۰ میلی‌وات، به عنوان منبع برانگیختگی استفاده شده است. در مقابل نور لیزر از یک عدسی همگرا کننده با فاصله کانونی ۱۵ سانتی‌متر به منظور متمرکز کردن نور بر نمونه استفاده شده است. پس از برخورد نور به نمونه طیف سبز رنگ از نمونه ساطع می‌شود که به عدسی با فاصله کانونی حدودی ۴،۵ سانتی‌متر وارد شده و پس از عبور از روزنه با قطر ۶۰ میکرومتر وارد آشکارساز فیبرنوری می‌شود. با استفاده از پیک حاصل از ترکیبات نقره و آمیلوئیدیتا در طیف‌سنجی فلوئورسانس می‌توان مقدار بازشدگی تجمعات در حضور نانوذرات نقره را بررسی کرد.



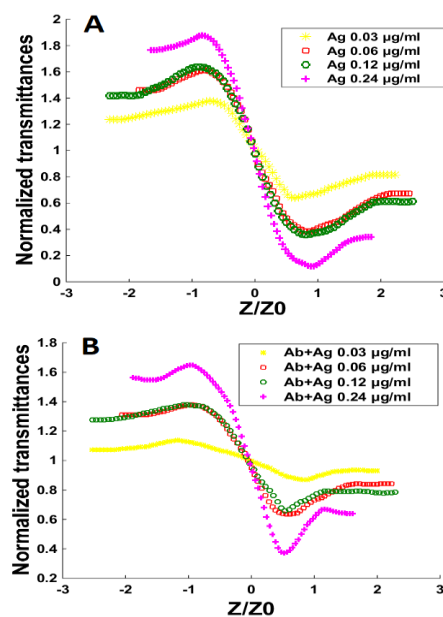
شکل ۶- طیف سنجی فلوئورسانس آمیلوئیدیتا و غلظت‌های آمیلوئیدیتا-نقره Ab : آمیلوئیدیتا - ThT : مارکر تیوفلاوین تی.

با توجه به شکل ۶، ابتدا تست نشر فلوئورسانس آمیلوئیدیتا با استفاده از مارکر تیوفلاوین تی بررسی شده است. بیشترین شدت

$L_{eff}$  طول موثری از ماده را نشان می‌دهد که در معرض نور لیزر قرار گرفته و با معادله  $L_{eff} = \frac{(1-e^{-\alpha L})}{\alpha}$  مشخص شده است. تغییرات در فاز نور خروجی از نمونه که در اثر برهمکنش نور و ماده ایجاد می‌شود و به دنبال آن، تولید هارمونیک سوم را به همراه دارد را با معادله  $\Delta\phi = \frac{\Delta T_{P-V}}{0.406(1-s)^{0.25}}$  توصیف می‌کنیم. اندازه فاصله قله تا دره در نمودار جاروب Z در حالت دریچه بسته را با  $\Delta T_{P_1}$  نشان می‌دهیم. با استفاده از این مقادیر، اندازه  $n_2$  که معرف ضریب شکست غیر خطی مواد در هارمونیک سوم است به دست می‌آید [۳۴]. مطابق شکل ۳، نمودار ضریب شکست غیرخطی آمیلوئیدیتا خالص نمایش داده شده است.



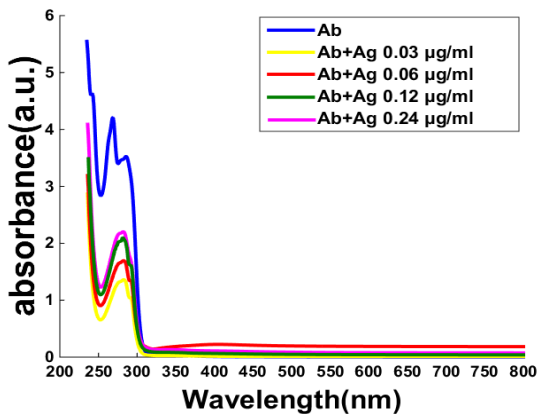
شکل ۴- نمودار ضریب شکست غیرخطی آمیلوئیدیتا خالص.



شکل ۵- نمودار جاروب Z در حالت دریچه بسته A. نمودار ضریب شکست غیرخطی غلظت‌های متفاوت نقره. B- نمودار ضریب شکست غیرخطی غلظت‌های متفاوت آمیلوئیدیتا-نقره. Ab-Ag: ترکیب نقره و آمیلوئیدیتا - Ag: نقره.

## ۲-۷- طیف‌سنجی مرئی - فرابنفش

با استفاده از نور ناهمدوس، ناحیه جذب پلاسمونیک سطحی برای مواد مشخص شده است. با توجه به شکل ۸، پیک جذب پلاسمونیک سطحی آمیلوئیدتا-نقره، در مقایسه با آمیلوئیدتا خالص به دلیل برهم‌کنش نقره و آمیلوئیدتا دچار جابه‌جایی شده است که این تغییر در تمامی غلظت‌های آمیلوئیدتا-نقره در یک گستره طول موجی مشخص اتفاق افتاده است.



شکل ۸. طیف سنجی مرئی-فرابنفش آمیلوئیدتا و غلظت‌های آمیلوئیدتا-نقره.

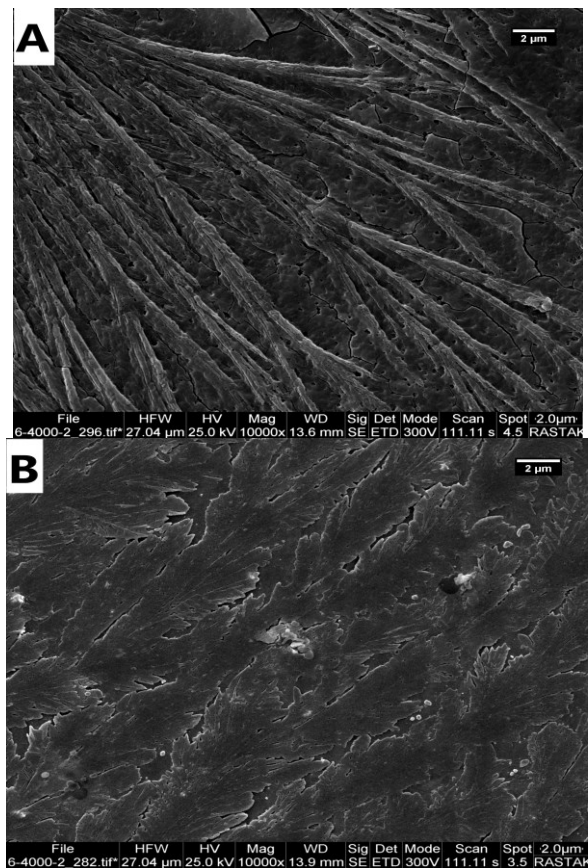
## ۳- نتایج و بحث

تجمعات آمیلوئیدتا از عوامل اصلی ایجاد بیماری آلزایمر بشمار می‌آید. تنها روش تشخیص مقدار اثر بخشی مواد بمنظور کاهش تجمعات آمیلوئیدی، استفاده از طیف‌سنجی فلوروسانس است که یک روش مقایسه‌ای بین شدت فلوروسانس محلول آمیلوئیدتا خالص با شدت فلوروسانس آمیلوئیدتا در حضور ماده موثر است. به این صورت که هرچقدر شدت فلوروسانس آمیلوئیدتا در حضور ماده موثر نسبت به آمیلوئیدتا خالص کاهش یابد، مقدار بازشدگی تجمعات آمیلوئیدی هم بیشتر است. در این پژوهش، با استفاده از روش جاروب Z و مقایسه نتایج به دست آمده از آن با طیف‌سنجی فلوروسانس، تاثیر نانوذرات نقره بر تجمعات آمیلوئیدی در مغز به روش نوری بررسی شده و مقادیر حاصل از طیف سنجی فلوروسانس با تکنیک جاروب Z مقایسه شده است. مطابق شکل ۶، پیک شدت فلوروسانس آمیلوئیدتا خالص بیشترین مقدار شدت را دارد. با افزودن نانوذرات نقره به آمیلوئیدتا، به دلیل ویژگی آنتی اکسیدانی و ضد رادیکال آزاد که در نانوذرات نقره وجود دارد، تجمعات آمیلوئیدی با افزایش غلظت

پیک نشر فلوروسانس مربوط به آمیلوئیدتا است که نشان دهنده تجمعات آمیلوئیدی در ماده است. با اضافه کردن نانو ذرات نقره به محلول آمیلوئیدتا، پیک نشر فلوروسانس مواد با افزایش غلظت نقره، کاهش پیدا می‌کند.

## ۲-۶- تصویر برداری میکروسکوپ الکترون روبشی

نتایج حاصل از مقایسه تست نشر فلوروسانس آمیلوئیدتا خالص با آمیلوئیدتا-نقره در غلظت‌های متفاوت نشان دهنده این است که تاثیر نانو ذرات نقره در کاهش مقدار تجمعات آمیلوئیدی مثبت بوده است. با استفاده از تصویر برداری میکروسکوپ روبشی الکترونی این نتیجه را می‌توان تایید کرد.

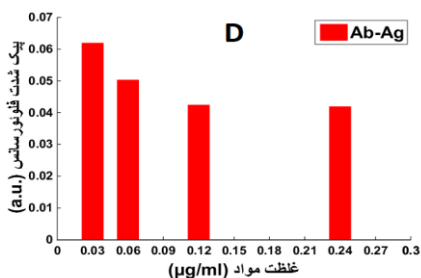
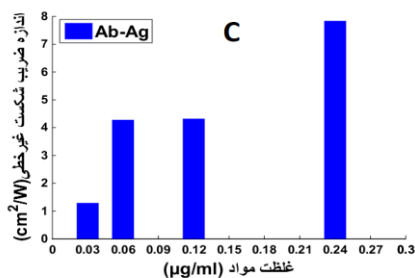


شکل ۷. تصویر برداری میکروسکوپ الکترون روبشی. A. ساختار آمیلوئیدتا خالص- B. ساختار آمیلوئیدتا در حضور نقره.

مطابق شکل ۷، در قسمت A ساختار سوزنی شکل آمیلوئیدتا به طور کامل مشخص است. در قسمت B، با افزودن نانوذرات نقره به آمیلوئیدتا ساختارش دچار تغییر می‌شود.

جدول ۱- ضریب شکست غیرخطی نمونه‌های نانوذرات نقره در حضور و عدم حضور تجمعات آمیلوئیدی در غلظت‌های متفاوت.

نمونه‌ها	غلظت‌ها ( $\mu\text{g/ml}$ )	ضریب شکست غیرخطی ( $10 \times \frac{\text{cm}^2}{W}$ )
Ag NPs	۰.۰۳	$۴.۲۷ \pm 0.5\epsilon$
Ag NPs	۰.۰۶	$۷.۵۵ \pm 0.7\epsilon$
Ag NPs	۰.۱۲	$۸.۲۶ \pm 0.9\epsilon$
Ag NPs	۰.۲۴	$۱۶.۱۵ \pm 2.1\epsilon$
Ag NPs-A $\beta$	۰.۰۳	$۱.۲2 \pm 0.2\zeta$
Ag NPs-A $\beta$	۰.۰۶	$۴.۲۷ \pm 0.4\epsilon$
Ag NPs-A $\beta$	۰.۱۲	$۴.۳۱ \pm 0.5\epsilon$
Ag NPs-A $\beta$	۰.۲۴	$۷.۸۳ \pm 0.8\zeta$



شکل ۹. نمودار میله‌ای مقایسه ضریب شکست غیرخطی و نشر فلوتورسانس ترکیب آمیلوئید-نقره. C-نمودار ضریب شکست غیرخطی. D-نمودار بیک نشر فلوتورسانس

## ۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، از روش جاروب Z برای اندازه‌گیری ضریب شکست غیرخطی پروتئین آمیلوئیدتا در حضور نانوذرات نقره در

کاهش بیشتری پیدا کرده است. با توجه به تصویربرداری الکترونی روبشی، در شکل ۷ قسمت A، ساختار سوزنی تجمعات آمیلوئیدی تشکیل شده که به صورت فشرده در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. با افزودن نانوذرات نقره به تجمعات آمیلوئیدتا مطابق شکل ۷ قسمت B، این ساختار دچار تغییر شده و همانطوری که در تست نشر فلوتورسانس نشان داده شد، نتیجه این تغییر در ساختار سوزنی آمیلوئیدتا، تاثیر مثبت نانوذرات نقره بر روی بازشدگی تجمعات آمیلوئیدی است. همچنین، با توجه به شکل ۵ مشاهده می‌شود که طیف جذبی آمیلوئیدتا خالص با افزودن غلظت‌های متفاوت نانوذرات نقره تغییر می‌کند و قله پلاسمونیک آن به اندازه ۱۴ نانومتر جابه جا می‌شود که این مسئله به دلیل تغییر در ساختار آمیلوئیدتا در اثر افزودن نانوذرات نقره و بازشدگی تجمعات آن است. در تکنیک جاروب Z با اندازه‌گیری ضریب شکست غیرخطی ترکیب نانوذرات نقره-آمیلوئیدتا و مقایسه آن با مقادیر حاصل از شدت فلوتورسانس مواد، مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت، افزون بر کاهش پیک شدت فلوتورسانس که نشان دهنده کاهش تجمعات آمیلوئیدتا است، اندازه ضریب شکست غیرخطی در هر ترکیب هم افزایش یافته است. همانطور که در شکل ۹ نشان داده شده است، با افزایش غلظت، شدت پیک فلوتورسانس در قسمت D روند کاهشی داشته است. مطابق قسمت C، در همان غلظت‌ها ضریب شکست غیرخطی روند افزایشی را طی می‌کند.

با توجه به جدول ۱ و مقادیر به دست آمده در تکنیک جاروب Z می‌توان گفت که با افزایش اندازه ضریب شکست غیرخطی، تجمعات آمیلوئیدتا کاهش یافته است. به این ترتیب می‌توان از روش جاروب Z به عنوان یک روش تکمیلی در کنار طیف سنجی فلوتورسانس، بمنظور تشخیص اثر بخشی نانوذرات نقره در کاهش مقدار تجمعات آمیلوئیدتا استفاده کرد. از مزیت‌های تکنیک جاروب Z نسبت به نشر فلوتورسانس می‌توان به سرعت پاسخ دهی سریع‌تر، عدم نیاز به استفاده از مارکرهای مخصوص که در برخی از تست‌های فلوتورسانس استفاده می‌شود، عدم حساسیت بالا به تاثیرات محیطی و مقرون به صرفه بودن سیستم جاروب Z نسبت به طیف سنجی فلوتورسانس اشاره کرد.

- [5] P. H. Nguyen *et al.*, “Amyloid oligomers: A joint experimental/computational perspective on Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease, Type II diabetes, and amyotrophic lateral sclerosis,” *Chem. Rev.*, 121, 2545–2647, 2021.
- [6] A. Ashok *et al.*, “Retinal degeneration and Alzheimer’s disease: an evolving link,” *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 7290, 2020.
- [7] L. Deng *et al.*, “Amyloid  $\beta$  induces early changes in the ribosomal machinery, cytoskeletal organization and oxidative phosphorylation in retinal photoreceptor cells,” *Front. Mol. Neurosci.*, 12, 24, 2019.
- [8] T. Prasad *et al.*, “Amyloid  $\beta$  peptides overexpression in retinal pigment epithelial cells via AAV-mediated gene transfer mimics AMD-like pathology in mice,” *Sci. Rep.*, 7, 1–15, 2017.
- [9] K. Araki *et al.*, “Parkinson’s disease is a type of amyloidosis featuring accumulation of amyloid fibrils of  $\alpha$ -synuclein,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 116, 17963–17969, 2019.
- [10] D. Yedlapudi, L. Xu, D. Luo, G. B. Marsh, S. V Todi, and A. K. Dutta, “Targeting alpha synuclein and amyloid beta by a multifunctional, brain-penetrant dopamine D2/D3 agonist D-520: Potential therapeutic application in Parkinson’s disease with dementia,” *Sci. Rep.*, 9, 1–12, 2019.
- [11] G. Gagno *et al.*, “From Brain to Heart: Possible Role of Amyloid- $\beta$  in Ischemic Heart Disease and Ischemia-Reperfusion Injury,” *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 9655, 2020.
- [12] J. Leszek *et al.*, “The Links between Cardiovascular Diseases and Alzheimer’s Disease,” *Curr. Neuropharmacol.*, 19, 152–169, 2021.
- [13] D. A. Stakos *et al.*, “The Alzheimer’s disease amyloid-beta hypothesis in cardiovascular aging and disease: JACC focus seminar,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, 75, 952–967, 2020.
- [14] P. Bharadwaj *et al.*, “The link between type Z جاروب با تست تیوفلاوین تی که بر پایه نشر فلورسانس مواد است، مقایسه شدند. مطابق نتایج، نانوذرات نقره اندازه ضریب شکست غیرخطی آمیلوئید بتا را از مرتبه  $10^{-10}$  به  $10^{-9}$  تغییر داده‌اند و با افزایش غلظت نانو ذرات نقره، اندازه ضریب شکست غیرخطی مواد بیشتر شده است. در هر دو تست، موثرترین غلظت  $0.24 \mu\text{g}/\text{ml}$  بود که بیشترین کاهش نشر فلورسانس و بزرگترین اندازه ضریب شکست غیر خطی را نتیجه داشته است. بنابراین، با توجه به مقادیر بدست آمده می‌توان گفت که نتایج تست نشر فلورسانس با روش جاروب Z بمنظور تشخیص کاهش مقدار تجمعات آمیلوئیدی مطابقت داشته است به صورتی که هرچه اندازه ضریب شکست غیرخطی مواد با زیاد شدن غلظت نانوذرات نقره افزایش پیدا کرده است، شدت نشر فلورسانس در آن غلظت‌ها کاهش می‌یابد. در نتیجه حضور نانوذرات نقره باعث کاهش تجمعات آمیلوئیدی شده است و با استفاده از تکنیک جاروب Z می‌توان مقدار تاثیر گذاری نانوذرات نقره بر کاهش تجمعات آمیلوئیدی را تشخیص داد.

## مراجع

- [1] N. Cremades and C. M. Dobson, “The contribution of biophysical and structural studies of protein self-assembly to the design of therapeutic strategies for amyloid diseases,” *Neurobiol. Dis.*, 109, 178–190, 2018.
- [2] S. F. Lichtenthaler, “Alpha-secretase cleavage of the amyloid precursor protein: proteolysis regulated by signaling pathways and protein trafficking,” *Curr. Alzheimer Res.*, 9, 2, 165–177, 2012.
- [3] G. Brinkmalm *et al.*, “Identification of neurotoxic cross-linked amyloid- $\beta$  dimers in the Alzheimer’s brain,” *Brain*, 142, 1441–1457, 2019.
- [4] T. Guo, D. Zhang, Y. Zeng, T. Y. Huang, H. Xu, and Y. Zhao, “Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer’s disease,” *Mol. Neurodegener.*, 15, 1–37, 2020.

- [23] D. J. Lindberg, A. Wenger, E. Sundin, E. Wesén, F. Westerlund, and E. K. Esbjörner, "Binding of thioflavin-T to amyloid fibrils leads to fluorescence self-quenching and fibril compaction," *Biochemistry*, 56, 2170–2174, 2017.
- [24] N. R. Rovnyagina *et al.*, "Fluorescence Lifetime and Intensity of Thioflavin T as Reporters of Different Fibrillation Stages: Insights Obtained from Fluorescence Up-Conversion and Particle Size Distribution Measurements," *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 6169, 2020.
- [25] M. Sebastiao, N. Quittot, and S. Bourgault, "Thioflavin T fluorescence to analyse amyloid formation kinetics: Measurement frequency as a factor explaining irreproducibility," *Anal. Biochem.*, 532, 83–86, 2017.
- [26] A. I. Sulatskaya, M. I. Sulatsky, I. A. Antifeeva, I. M. Kuznetsova, and K. K. Turoverov, "Structural analogue of thioflavin T, DMASEBT, as a tool for amyloid fibrils study," *Anal. Chem.*, 91, 3131–3140, 2019.
- [27] M. M. Wördehoff and W. Hoyer, " $\alpha$ -Synuclein aggregation monitored by thioflavin T fluorescence assay," *Bio-protocol*, 8, 12-18, 2018.
- [28] M. Yousaf, H. Huang, P. Li, C. Wang, and Y. Yang, "Fluorine functionalized graphene quantum dots as inhibitor against hIAPP amyloid aggregation," *ACS Chem. Neurosci.*, 8, 1368–1377, 2017.
- [29] E. W. Van Stryland and M. Sheik-Bahae, "Z-scan technique for nonlinear materials characterization," in *Materials Characterization and Optical Probe Techniques: A Critical Review*, 10291, 102910Q, 1997.
- [30] H. M. El-Rafie and M. A.-A. Hamed, "Antioxidant and anti-inflammatory activities of silver nanoparticles biosynthesized from aqueous leaves extracts of four Terminalia species," *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, 5, 35008, 2014.
- 2 diabetes and neurodegeneration: roles for amyloid- $\beta$ , amylin, and tau proteins," *J. Alzheimer's Dis.*, 59, 421–432, 2017.
- [15] M. G. Morgese, S. Schiavone, and L. Trabace, "Emerging role of amyloid beta in stress response: Implication for depression and diabetes," *Eur. J. Pharmacol.*, 817, 22–29, 2017.
- [16] J. B. Bryson *et al.*, "Amyloid precursor protein (APP) contributes to pathology in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis," *Hum. Mol. Genet.*, 21, 3871–3882, 2012.
- [17] N. Y. Calingasan, J. Chen, M. Kiaei, and M. F. Beal, " $\beta$ -amyloid 42 accumulation in the lumbar spinal cord motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis patients," *Neurobiol. Dis.*, 19, 340–347, 2005.
- [18] J. Ezpeleta *et al.*, "Production of seedable Amyloid- $\beta$  peptides in model of prion diseases upon PrP Sc-induced PDK1 overactivation," *Nat. Commun.*, 10, 1–13, 2019.
- [19] A. Cornejo, J. M. Jiménez, L. Caballero, F. Melo, and R. B. Maccioni, "Fulvic acid inhibits aggregation and promotes disassembly of tau fibrils associated with Alzheimer's disease," *J. Alzheimer's Dis.*, 27, 143–153, 2011.
- [20] K. Gade Malmos *et al.*, "ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation," *Amyloid*, 24, 1–16, 2017.
- [21] S. A. Hudson, H. Ecroyd, T. W. Kee, and J. A. Carver, "The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds," *FEBS J.*, 276, 5960–5972, 2009.
- [22] L. P. Jameson, N. W. Smith, and S. V. Dzyuba, "Dye-binding assays for evaluation of the effects of small molecule inhibitors on amyloid (A $\beta$ ) self-assembly," *ACS Chem. Neurosci.*, 3, 807–819, 2012.



- [31] R. Rajeswari, H. G. Prabu, and D. M. Amutha, "One Pot Hydrothermal synthesis characterizations of silver nanoparticles on reduced graphene oxide for its enhanced antibacterial and antioxidant properties," *IOSR J. Appl. Chem*, 10, 64–69, 2017.
- [32] J. H. Hardesty and B. Attili, "Spectrophotometry and the Beer-Lambert Law: An Important Analytical Technique in Chemistry," *Collin Coll. Dep. Chem.*, 2010.
- [33] E. A. Mamonov *et al.*, "Anisotropy versus circular dichroism in second harmonic generation from fourfold symmetric arrays of G-shaped nanostructures," *Phys. Rev. B*, 89, 121113, 2014.
- [34] K. Itoh, W. Watanabe, and Y. Ozeki, "Nonlinear ultrafast focal-point optics for microscopic imaging, manipulation, and machining," *Proc. IEEE*, 97, 1011–1030, 2009.



## Optical measurement of the amount of decrement in amyloid beta aggregations in the presence of silver nano particles

### Abstract:

Chronic diseases various of biomarkers major are aggregations Amyloid Currently, one of the most common tests for in-vitro quantification of amyloid fibrillation kinetics is Thioflavin T assay Thioflavin of emission fluorescence the on based T. drawbacks some has still helpfulness, its of In spite to method scan-Z used we Herein, indispensable is results its introduction to tests thero introducing, hence and concentrations various at particles nano silvers of indices refractive nonlinear the find According to the results, silver nano particles altered the order of the aggregations from  $10^{-10}$  to  $10^{-9}$  such way that the magnitude of the nonlinear refractive indices and the fluorescence intensities increased and decreased, respectively with increment in the concentrations. Having the maximum diminution in the fluorescence intensity and the and the largest magnitude of nonlinear refractive index,  $0.24 \text{ g}\mu/\text{ml}$  was recorded as the optimal concentration. Therefore, the results of Thioflavin T and Z-scan, aligned perfectly with each other in a way that the more the concentrations of the silver nano particles were, the more the magnitude of the nonlinear refractive indices, and the more decrement in the fluorescence intensities, and thus, silver nano particles can wipe out the aggregations, which is quantitatively measurable.

**Keywords:** Silver nanoparticles, Amyloid beta protein, Fluorescence emission, Nonlinear refractive index.