

نانومواد و پروتئین کرونا: مروری بر سرنوشت نانومواد در محیط فیزیولوژیکی عاطفه پورحسین^۱، فرزانه امیری^۲، حسن فرهادنژاد^۳، بهروز فروغی نیا^۴، حمید رضا متصدی زاده^۵

۱- گروه نانو تکنولوژی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

۲- پژوهشکده علوم، پژوهشگاه علوم و پتروشیمی ایران، تهران، ایران

۳- گروه فارماسیوتیکس و نانو تکنولوژی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دزفول، ایران

۵- گروه نانو تکنولوژی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

نانوذرات و سایر مواد نانو به طور چشمگیری برای استفاده در کاربردهای زیست پزشکی مانند تصویربرداری، دارورسانی و درمان هایپرترمیا مورد توجه قرار گرفته اند. بنابراین، شناخت برهمکنش نانومواد با سیستم های زیستی نقشی کلیدی در استفاده ایمن و کارآمد آنها ایفا می کند. ثابت شده است که به محض ورود نانومواد به محیط زیستی، سطح آنها توسط پروتئین کرونا پوشیده می شود. محیط های بیولوژیکی سطح نانومواد را تغییر می دهند و بنابراین پاسخ های بافتی/سلولی به ترکیب کرونا بستگی دارند. در این مقاله، ابتدا تغییرات کرونا با توجه به خواص فیزیکوشیمیایی نانومواد (به عنوان مثال اندازه، شکل، بار سطحی، گروه های عاملی سطح و آبدوستی/آبگریزی) مورد بررسی قرار گرفته است. در بخش دوم کار اثر پروتئین کرونا روی جذب سلولی غیر ویژه، سمیت، توزیع زیستی و کارایی هدفمندی مورد بحث قرار گرفته است. علاوه بر این، تکنیک های لازم برای مطالعه ساختار و ترکیب پروتئین کرونا و رابطه بین ماهیت سنتزی، ماهیت بیولوژیکی و پاسخ فیزیولوژیکی این نانوذرات بررسی شده است.

واژه های کلیدی: نانوذرات پلیمری، نانومواد، پروتئین کرونا، محیط فیزیولوژیکی

Farhadnejad123@gmail.com

۱- مقدمه

پس از تزریق داخل وریدی، خون اولین محیط فیزیولوژیکی است که نانوذرات با آن روبرو می شوند. پلاسمای خون شامل هزاران نوع پروتئین با غلظت های متفاوت می باشد [۱]. علاوه بر پروتئین ها، چربی ها نیز در پلاسما موجود هستند. بنابراین، پس از تزریق نانوذرات به داخل خون، یک رقابت بین مولکول های زیستی مختلف برای جذب بر روی سطح نانوذرات وجود دارد (اثر ورم). در مرحله اول، فراوان ترین و کوچک ترین پروتئین ها روی سطح نانوذرات جذب سطحی می شوند؛ با این حال، به مرور زمان توسط پروتئین هایی با میل ترکیبی بالاتر جایگزین می شوند (شکل ۱) [۲-۴].

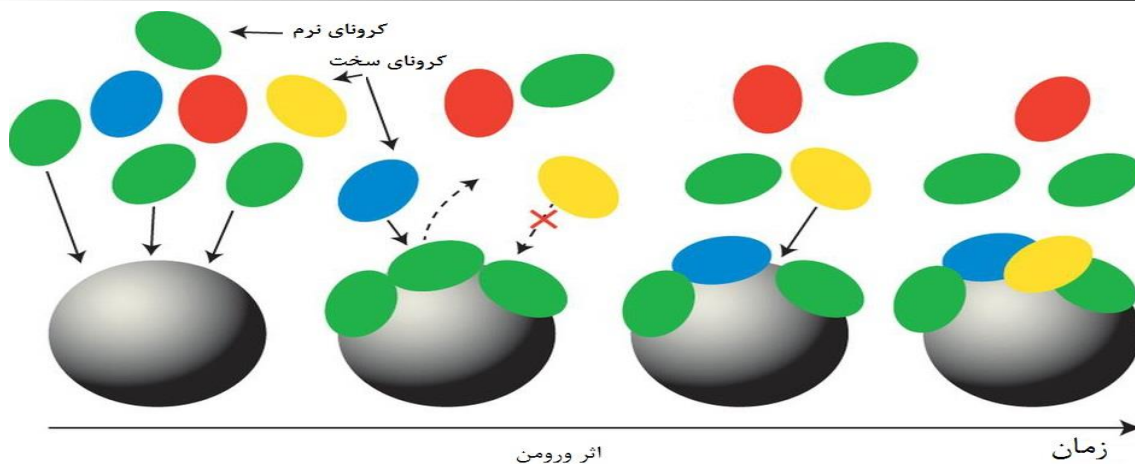
ساختار و ترکیب پروتئین کرونا به خواص فیزیکوشیمیایی نانومواد (اندازه، شکل، ترکیب، گروه های عاملی سطح و بار سطحی)، ماهیت محیط های فیزیولوژیکی (خون، مایع میان بافتی، سیتوپلاسم سلول و غیره) و مدت زمان قرار گرفتن در محیط فیزیولوژیکی بستگی دارد. پروتئین کرونا باعث تغییر اندازه و ترکیب سطحی نانومواد شده و به آنها هویت بیولوژیکی جدیدی می دهد که همان چیزی است که توسط سلول ها دیده می شود. ماهیت بیولوژیکی، پاسخ های فیزیولوژیکی از جمله تجمع، جذب سلولی، طول مدت زمان نانوذرات در خون، سیگنالینگ، سینتیک، انتقال، انباشتگی و سمیت را تعیین می کند.

بررسی های انجام شده روی ترکیب پروتئین کرونا نشان می دهد که پروتئین کرونی تشکیل شده روی نانوذرات پیچیده است و

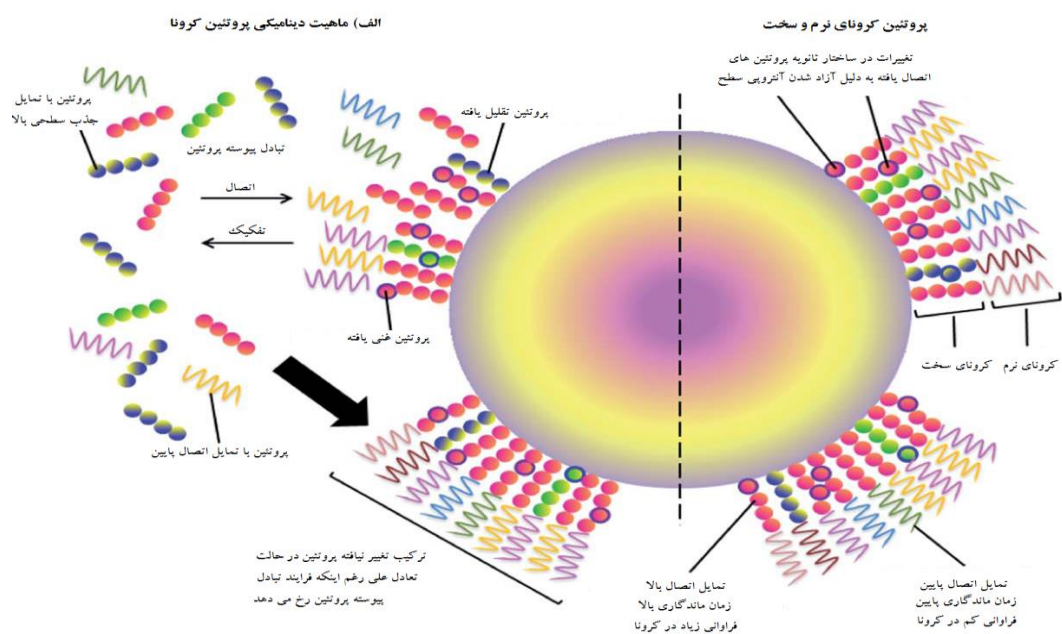
یک پروتئین کرونی پلاسمای "عمومی" برای همه ی نانومواد وجود ندارد و تراکم نسبی پروتئین جذب شده به فراوانی نسبی آنها در پلاسما بستگی ندارد. آنالیز پروتئین های کرونا روی انواع مختلفی از نانوذرات نشان داد که تقریباً ۱۲۵ پروتئین مختلف با نقش های فیزیولوژیکی مختلف می توانند روی سطح نانوذرات مختلف جذب سطحی شوند و بخشی از یک پروتئین کرونی منحصر به فرد را تشکیل دهند [۵]. بنابراین، ترکیب پروتئین کرونا برای هر نانومواد منحصر به فرد بوده و به پارامترهای زیادی بستگی دارد.

۲- ساختار و ترکیب کرونا

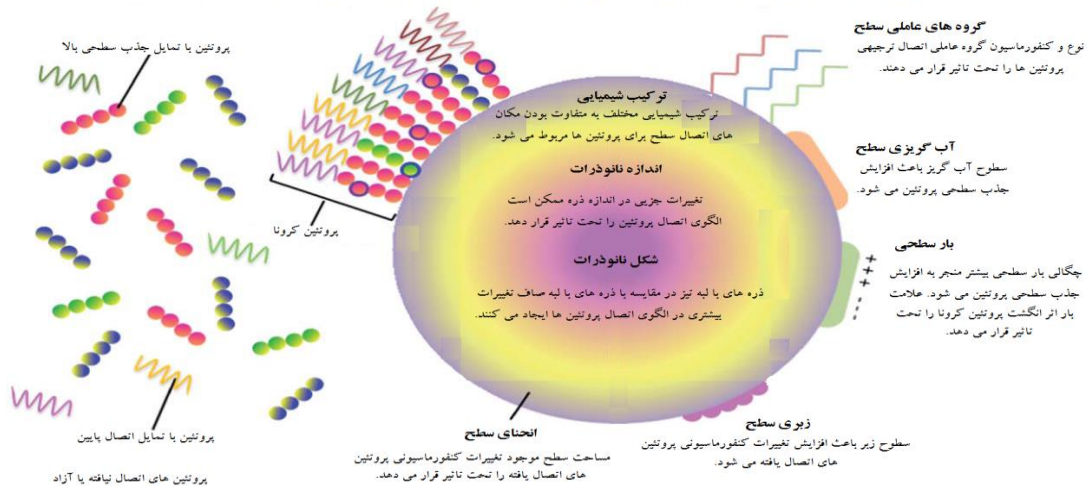
اکثر مولکول های زیستی جذب شده روی سطح نانوذرات در پلاسما خون، پروتئین ها هستند و اخیراً آثار جزئی برخی از چربی ها نیز گزارش شده است. جذب پروتئین ها روی سطح نانوذرات توسط پیوندهای درونی پروتئین-نانوذرات و همچنین برهمکنش های پروتئین-پروتئین کنترل می شود. پروتئین هایی که با میل ترکیبی بالا جذب سطحی می شوند، تحت عنوان کرونی "سخت" شناخته شده اند و شامل پروتئین هایی با اتصال محکم می باشند که به آسانی واجذب نمی شوند، در حالی که پروتئین هایی که با میل ترکیبی پایین جذب سطحی می شوند کرونی "نرم" نامیده شده و متشکل از پروتئین هایی با اتصال ضعیف می باشند (شکل ۲). همچنین کرونی نرم و سخت می توانند بر اساس زمان تبادلشان تعریف شوند. کرونی سخت معمولاً زمان های تبادل بسیار طولانی در حدود چند ساعت نشان می دهد [۶، ۷].



شکل ۱: اثر ورمین نشان دهنده رقابت بین مولکولهای زیستی مختلف برای جذب بر روی سطح نانوذرات.



ب) خواص فیزیکی شیمیایی نانوذره و ترکیب پروتئین در سیال بیولوژیکی، ماهیت و فراوانی نسبی انواع پروتئین های موجود در کرونا را تعیین می کنند.



شکل ۲: کمپلکس های پروتئین کرونا-نانوذره

یک فرضیه این است که پروتئین‌های کروناي سخت، به طور مستقیم با سطح نانومواد برهمکنش دارند؛ درحالی‌که پروتئین‌های کروناي نرم از طریق برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین ضعیف با پروتئین کروناي سخت برهمکنش ایجاد می‌کنند [۵].

ترکیب فیزیکوشیمیایی و شیمی سطح نانوذرات فاکتورهای اصلی تعیین کننده در تشکیل یک پروتئین کروناي منحصر به فرد و در نتیجه تعیین کننده سرنوشت نانوذرات در هر دو محیط برون تن و درون تن می باشند [۸-۱۰]. سایر ویژگی‌های نانوذرات که باعث تغییر برهمکنش آنها با مواد بیولوژیکی می‌شوند شامل شکل، آب‌گریزی یا آبدوستی، کریستالی بودن یا یکنواختی سطح، کلوخه شدن و پتانسیل زتا هستند [۱۲، ۱۱]. یک مدل برای پروتئین کرونا توسط زیمرگ و همکارانش ارائه شده است [۱۳]؛ در این مدل دو نوع بایندر وجود دارد. بایندهای اولیه با سطح نانومواد به طور مستقیم تشکیل پیوند می‌دهند و بایندهای ثانویه از طریق برهمکنش پروتئین-پروتئین به بایندهای اولیه اتصال می‌یابند. چنین ساختار چند لایه‌ای برای پاسخ‌های فیزیولوژیکی قابل توجه است؛ چون بایندهای ثانویه ممکن است فعالیت بایندهای اولیه را تغییر دهند و مانع از برهمکنش آنها با محیط اطراف شوند.

۱-۲- کروناي سخت

بررسی تحقیقات نشان می‌دهد که نانوذرات گوناگون با اصلاحات سطحی مختلف توسط روش‌های متفاوت برای پیدا کردن ترکیب پروتئین کرونا مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. خلاصه‌ای از این مطالعات توسط آگاروال و همکارانش ارائه شده است [۱۴] که نشان می‌دهد که آلبومین، ایمونوگلوبولین G (IgG)، فیبرینوژن و آپولیپوپروتئین‌ها در کروناي تمام نانوذرات مورد مطالعه قرار گرفته وجود دارند. این پروتئین‌ها فراوانی بالایی در پلاسماي خون دارند و در نتیجه در زمان‌های بعد، ممکن است با پروتئین‌هایی با غلظت پایین‌تر اما میل ترکیبی بیشتر روی سطح نانوذرات جایگزین شوند. لاندکویست و همکارانش [۱۵] کروناي "سخت" تشکیل شده در اطراف نانو ذرات متشکل از مواد مختلف، شامل نانوذرات کولیمر و پلی استایرن، با اندازه‌های مختلف و با خواص سطح متفاوت را مورد مطالعه قرار داده‌اند. به اثبات رسیده است که برهمکنش اولیه بین اکثر محیط‌های بیولوژیکی و نانوذرات به شدت توسط پروتئین کروناي سختی که نانوذرات را احاطه کرده‌اند و روی آنها جذب سطحی شده‌اند، تحت تاثیر قرار می‌گیرند. مقدار و ترکیب پروتئین‌های موجود در کروناي جذب سطحی شده روی سطح نانوذرات به چندین فاکتور مهم مانند خواص فیزیکوشیمیایی و ترکیب محلول پروتئین بستگی دارد. محمودی و همکارانش نشان دادند که تحریک حرارتی پلاسمونیک از طریق فعالسازی لیزری منجر به تغییرات قابل توجهی در ترکیب پروتئین کروناي سخت تشکیل شده روی سطح نانوذرات طلا با نسبت ابعادی کم می‌شود. با استفاده از اسپکتروسکوپی جرمی نشان دادند که تعداد پروتئین‌ها در کرونا از طریق حرارت‌دهی پلاسمونیک در مقایسه با حرارت دهی ساده بیشترین تغییر را دارند [۱۶].

کارمالي و زیمرگ [۱۷] پروتئین‌های پلاسماي متصل شده به نانوذرات مختلف شناسایی شده را جمع‌آوری کرده‌اند که در زیر خلاصه‌ای از آنها آورده شده است. به خوبی شناخته شده است که شیمی سطح نقش غالبی در شناسایی بازی می‌کند.

- آپولیپوپروتئین‌ها نوع اصلی پروتئین‌هایی هستند که روی لیپوزوم‌ها و نانوذرات پلیمری جذب سطحی می‌شوند، اما در مورد نانوذرات معدنی اینگونه نیست. تبادل آپولیپوپروتئین بین لیپوپروتئین‌ها و نانوذراتی که حوزه‌های آگریز دارند، به عنوان مکانیسم اصلی جذب سطحی پیشنهاد شده است. با استفاده از مدل ذرات پلیمری با کاهش خاصیت آب‌گریزی، گستر و همکارانش [۱۸] نشان دادند که آپو A-I، آپو A-IV، آپو C-III و آپو به تدریج با کاهش خاصیت آب‌گریزی نانوذرات ناپدید می‌شوند.

- فراوانترین پروتئین‌ها، آلبومین و فیبرینوژن، در انواع مختلفی از نانوذرات یافت شدند.

- پلی‌پلکس‌ها و لیپو پلکس‌های کاتیونی، پیوند آلبومینی قوی نشان دادند که احتمالاً به علت این است که آلبومین پروتئینی با بار منفی است. همچنین آلبومین تمایل ترکیبی به سطوح آب‌گریز و پلی‌آنیون‌ها نشان می‌دهد.

- ترانسفرین، هاپتوگلوبین، فتونین A (آلفا ۲-HS-گلیکوپروتئین)، کینینوژن، گلیکوپروتئین غنی از هیستیدین و فاکتورهای مسیر انعقاد (ذاتی) می‌توانند توسط نانوذرات پلیمری و نانو ذرات با اجزای سطح آگریز یا نانوذرات معدنی آبدوست جذب شوند. بسیاری از این پروتئین‌ها قادر به اتصال به سطوح آنیونی و فلزی می‌باشند.

- حضور گروه‌های هیدروکسیل (به عنوان مثال، دکستران و قند) اتصال مکمل C3 را از طریق گروه تیواستر بالا می‌برد. نشان داده شده است که لکتین‌های متصل به مانوز (MBLs) به قسمت‌های قندی نانوذرات پوشش داده شده با دکستران متصل می‌شوند.

- اتصال اختصاصی پروتئین سرم متصل شده به مانوز (MBP) به فسفاتیدیل اینوزیتول (PI) لیپوزوم‌ها نشان داده شده است.

- به نظر می‌رسد که ذرات پوشش داده شده با دکستران توسط آنتی بادی‌ها شناخته شده‌اند.

۲-۲- کروناي نرم

مولکول‌هایی که به طور ضعیف با سطح نانوذرات پیوند می‌دهند و یا برهم‌کنش ضعیف با کروناي سخت دارند، کروناي نرم را تشکیل می‌دهند. در مورد برخی از نانوذرات، به ویژه نانوذرات با گروه عاملی از پیش تشکیل شده مانند نانوذرات پگیله شده، تنها یک کروناي ضعیف پوشاننده‌ی سطح وجود دارد و هیچ کروناي سختی مشاهده نمی‌شود [۱۹].

چالش تئوری درک اینکه چرا پروتئین‌های خاص به شیوه‌ای رقابتی جذب سطحی می‌شوند، نامشخص است. مسلماً نکات زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد این پدیده، مجموعه‌ای از فرآیندهاست و در نتیجه توجیه کردن بر اساس مطالعات اتصالات-پروتئین منفرد دشوار خواهد بود. بنابراین، اگرچه به

مطالعه‌ی پروتئین‌های پلاسما پیوند شده با نانو لوله‌های کربنی تک دیواره (SWCNT) و نانوذرات سیلیکا مشاهده کردند که این نانوذرات الگوهای متفاوتی از جذب سطحی را نشان دادند که آلومین سرم فراوان‌ترین پروتئین پوشش دهنده‌ی SWCNT می‌باشد، اما این پروتئین تمایلی برای جذب سطحی روی سطح نانو ذرات سیلیکا ندارد. نانوذرات ZnO ، TiO_2 و SiO_2 دارای بار سطحی مشابه با پروتئین‌های پلاسمایی متفاوت پیوند برقرار می‌کنند [۲۴].

۳-۳- اثر پوشش‌ها و عامل‌دار کردن سطح روی ترکیب کرونا

پوشش اولیه و عامل‌دار کردن سطح می‌تواند برای کاهش جذب سطحی پروتئین‌ها یا مهندسی کردن ترکیب پروتئین کرونا به کار برده شود. مطالعات انجام شده روی نانوکره‌های پلی استایرنی پوشش داده شده با پلوکسامین ۹۰۸، یک کاهش قابل توجه از جذب سطحی فیرون اکتین را نشان داده است. در دیگر مطالعات انجام شده روی عامل‌دار کردن نانو ذرات CNT و SiO_2 با پلورونیک‌های F۱۲۷، کاهش قابل توجه در جذب سطحی پروتئین سرم نمایان شد. خلاصه‌ای از نقش انواع پوشش‌ها از قبیل PEG، پلوگرامر، پلوگرامین، دکستران، پلورونیک F۱۲۷، پلی سوربات، پلی (اکسی اتیلن) روی مقدار پروتئین پلاسما جذب شده، جذب فاگوسیتوزی و توزیع زیستی توسط آگاروال و همکارانش گزارش شده است [۱۴]. عامل‌دار کردن سطح با PEG‌های دارای طول زنجیر متفاوت منجر به تغییرات مهمی در توزیع زیستی بافت/ارگان انتخابی و کلیرانس از بدن شد، اگرچه ژل الکتروفورز دوبعدی نشان داد که صرف نظر از طول زنجیر PEG، پروتئین‌های ایمنی (فیبرینوژن، IgG) بیشتر از آلومین‌ها با این نانوذرات پیوند برقرار می‌کنند.

۴-۳- اثر آب‌گریزی و آب دوستی سطح نانوذرات روی ترکیب پروتئین کرونا

آب‌گریزی سطح نیز برهمکنش‌های نانوذره-پروتئین را تحت تأثیر قرار می‌دهد و به طور کلی بایستی در نظر گرفت که جذب سطحی پروتئین روی سطوح آب گریز بیشتر از آب دوست است [۲۷،۲۸]. مونوپولی و همکارانش با استفاده از آنالیزهای LC-MS/MS و 1D PAGE نانوذرات پلی استایرن سولفونه شده (۲۰۰ نانومتر) آب‌گریز را با نانوذرات سیلیکا (SiO_2) آب دوست (۲۰۰ نانومتر) مقایسه کردند. با افزایش غلظت پلاسما انسانی (یک ساعت انکوباسیون در ۸۰-۳ درصد پلاسما)، مقدار کل پروتئین‌های جذب سطحی شده برای نانوذرات پلی استایرن آب‌گریز افزایش یافت، در حالی که مقدار پروتئین‌های جذب سطحی شده برای نانوذرات سیلیکا به‌طور جزیی کاهش یافت [۱]. به طور کلی، موقع قرار گرفتن در معرض سیالات حاوی پروتئین ذرات آب‌گریز در مقایسه با ذرات آب دوست سریعتر اپسونیزاسیون می‌شوند و هرگونه تغییر در خاصیت آب‌گریزی سطح منجر به تغییر الگوی اتصال پروتئین می‌شود. خاصیت آب‌گریزی سطح می‌تواند به عنوان یک پارامتر برای پیش‌بینی برهمکنش‌های پروتئین-نانوذرات با ترکیب شیمیایی مشابه به کار برده شود [۲۱]. همچنین گزارش شده است که آب‌گریزی به اندازه

طور قطعی کرومایی که توسط سلول "دیده می‌شود" در حال رشد است، هنوز پیشرفت نسبتاً کمی در مورد اینکه چرا هر نانوذره دسته‌ای از پروتئین‌های خاص را انتخاب می‌کند، وجود دارد.

۳-۳- فاکتورهای موثر روی ترکیب پروتئین کرونا

۱-۳- اثر بار سطحی نانو ذرات روی ترکیب پروتئین کرونا

بار سطحی نانو ذرات یکی دیگر از عوامل مهم و کلیدی است که برهمکنش پروتئین-نانوذرات را تحت تأثیر قرار می‌دهد. گزارش شده است که با افزایش بار سطحی نانو ذرات، جذب سطحی پروتئین افزایش می‌یابد. نانو ذرات دارای بار مثبت ترجیح می‌دهند پروتئین‌هایی با نقطه‌ی ایزو الکتریک (pI) کمتر از ۵/۵ مانند آلومین را جذب کنند، در حالیکه نانوذرات با بار سطحی منفی، جذب سطحی پروتئین‌های با نقطه‌ی ایزو الکتریک (pI) بیشتر از ۵/۵ مانند IgG را بیشتر ترجیح می‌دهند [۱۴].

همچنین اثر بار سطحی روی جذب سطحی پروتئین روی لیپوزوم‌های دارای بار منفی و بدون بار اصلاح شده با پلی اتیلن گلیکول و اصلاح نشده انکوبه شده در محلول فیبرینوژن به مدت ۳ ساعت توسط پرایس و همکارانش مورد مطالعه قرار گرفت. این گروه تحقیقاتی مشاهده کردند که جذب سطحی فیبرینوژن روی لیپوزوم‌های دارای بار منفی بیشتر از لیپوزوم‌های بدون بار است. اصلاح لیپوزوم‌ها با پلی اتیلن گلیکول تنها روی لیپوزوم‌های دارای بار منفی اثر داشت. در یک وزن مولکولی ثابت پلی اتیلن گلیکول، افزایش میزان پگیلاسیون باعث کاهش جذب سطحی فیبرینوژن می‌شود، در حالی که در حالت پگیلاسیون ثابت، جذب سطحی فیبرینوژن برای همه وزن مولکولی پلی اتیلن گلیکول تست شده (۵۵۰، ۲۰۰، ۵۰۰) در مقایسه با لیپوزوم‌های دارای بار منفی اصلاح نشده کاهش یافته است [۲۰]. همچنین بار سطحی می‌تواند پروتئین‌های جذب سطحی شده را دناتوره کند. در یک بررسی اخیر روی نانو ذرات طلا با لیگاندهای مثبت، منفی و خنثی، این نتیجه حاصل شد که پروتئین‌ها در حضور لیگاندهای باردار (مثبت، منفی) دناتوره می‌شوند اما لیگاندهای خنثی ساختار طبیعی پروتئین‌ها را حفظ می‌کنند [۲۱].

۲-۳- اثر ترکیب شیمیایی نانوذرات روی ترکیب پروتئین کرونا

مطالعات زیادی روی اثر ترکیب شیمیایی نانوذرات بر ویژگی‌های کرومایی تشکیل شده انجام شده است. یک مثال بسیار مهم و متداول از اثرات ترکیب شیمیایی روی خواص پروتئین کرونا به صورت الگوهای جذب سطحی متفاوت پروتئین‌های پلاسما ظاهر شده با نانوذرات اکسید آهن (IONPs) در مقایسه با نانومولسیون‌های روغن در آب (۲۰ درصد روغن که دارای ۵۰ درصد تری گلیسیرید با زنجیر متوسط و ۵۰ درصد تری گلیسیرید با زنجیر بلند است) توسط محققان ارائه شده است [۲۳،۲۲]. بعد از انکوباسیون در پلاسما انسانی و شناسایی کرونا توسط 2D PAGE، ایمونوگلوبولین‌ها و فیبرینوژن در مقایسه با آپولیوپروتئین‌ها، بیشتر روی سطح IONPs جذب سطحی شده اند. از طرف دیگر، آپولیوپروتئین‌ها بیشتر روی نانومولسیون‌های روغن در آب جذب سطحی شده‌اند. همچنین محققان با

ترکیب پروتئین کرونا روی مقدار پروتئین جذب سطحی شده تأثیر می‌گذارد. جذب سطحی افزایش یافته‌ی پروتئین‌ها روی سطح آب گریز در مقایسه با سطح آب‌دوست، سرعت اپسونیزاسیون نانو ذرات آب گریز را افزایش می‌دهد [۱۴].

سطوح باردارنده یا آب‌گریز تمایل بیشتری نسبت به سطوح آب‌دوست و خنثی به جذب سطحی شدن روی پروتئین‌ها و دناتوره کردن آنها دارند. برای مثال، افزایش چگالی بار منفی و آب‌گریزی نانو ذرات پلی استایرن، جذب سطحی پروتئین پلاسما را افزایش می‌دهد، و نانوذرات کوپلیمری آب‌گریزتر نسبت به هماتهای آب‌دوستشان، پروتئین بیشتری را جذب سطحی می‌کنند [۲۷].

۳-۵- اثر زبری و انحناى سطح نانوذرات روی ترکیب پروتئین کرونا

به دلیل انحناى سطح، تمایلات اتصال دهنده-پروتئین برای نانوذرات و سطوح تخت متفاوت است. بنابراین، اطلاعات جذب سطحی پروتئین روی سطح تخت نایبستى برای نانوذرات برون‌یابی شود. علاوه بر تمایل اتصال دهنده-پروتئین، ترکیب پروتئین کرونا برای نانوذرات یکسان اما با اندازه‌های مختلف، متفاوت است [۱]. زمانیکه اندازه‌ی نانوذره به اندازه‌ی پروتئین‌ها نزدیک می‌گردد، تغییر ترکیب و سازماندهی پروتئین‌ها در کرونا بسیار مهم است [۲۱]. سطوح با انحناى زیاد نانومواد، برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین را کاهش می‌دهد. پروتئین‌هایی که روی نانوذرات دارای سطوح با انحناى زیاد جذب سطحی می‌شوند، نسبت به آن‌هایی که روی سطوح با انحناى کمتر جذب می‌شوند، تمایل کمتری به ایجاد تغییر در پیکربندی یا کنفورماسیون دارند.

همچنین انحنا و اندازه‌ی نانوذرات قدرت اتصالى پروتئین را تحت تأثیر قرار می‌دهند. برای مثال، دوبروولسکایا و همکارانش [۲۸] گزارش کردند که پروتئین‌های بیشتری بر روی سطح نانوذرات طلا با سایز ۳۰ نانومتر نسبت به نانوذرات با سایز ۵۰ نانومتر جذب می‌شوند. لینچ و همکارانش [۲۱] نقش اندازه و مساحت سطح نانوذرات روی جذب سطحی پروتئین بر نانو ذرات کوپلیمری NIPAM/BAM (۵۰:۵۰) را مورد مطالعه قرار دادند. با استفاده از نانوذرات با سایز متفاوت بین ۷۰ تا ۷۰۰ نانومتر، نشان دادند که با افزایش مساحت سطح موجود در یک وزن ثابت ذره، مقدار پروتئین‌های پلاسمای پیوند شده افزایش می‌یابد. در یک کسر وزنی ثابت از نانوذرات، مساحت سطح قابل دسترس برای اتصال پروتئین با کاهش اندازه‌ی ذرات زیاد می‌شود. مطالعه‌ی دیگری شامل برهمکنش نانو ذرات طلا با پروتئین‌های معمولی پلاسما پیشنهاد می‌کند که ضخامت لایه‌ی پروتئین جذب سطحی شده بطور قابل توجهی با اندازه‌ی نانوذرات افزایش می‌یابد. نانوذرات طلا می‌توانند انباشته شدن پروتئین در pH فیزیولوژیکی را آغاز کنند، که این منجر به تشکیل کمپلکس‌های نانو ذره-پروتئین آمورف، همراه با کلوخه‌های پروتئینی بزرگ بدون نانوذرات جاسازی شده درون آنها می‌شود. پروتئین‌هایی که روی سطح نانوذرات طلا مشاهده شده‌اند، اندکی به صورت واپیچ شده می‌باشند. این پروتئین‌های بد پیچ خورده القا شده توسط نانوذرات، احتمالاً تشکیل و رشد کلوخه‌های مشاهده شده را کاتالیز می‌کنند.

هر گونه تغییر جزئی در خواص سطحی مانند زبری و انحناى سطحی ذره باعث تغییر قابل توجهی در الگوی اتصال پروتئین کرونا می‌شود. مشاهده شده است که توپوگرافی یا زبری سطح نانوذرات ترکیب پروتئین کرونا را تحت تأثیر قرار می‌دهد. محمودی و سرپوشان مشاهده کردند که پروتئین‌هایی با محدوده‌ی سایز خاص ترجیح می‌دهند که به نانوذرات با سطح صاف نسبت به سطوح زبر اتصال یابند. بعد از یک ساعت انکوباسیون در آلبومین انسانی، ترکیب پروتئین کرونا در سطوح مختلف (صاف و زبر) نانوذرات اکسید آهن سوپرمغناطیس هسته-پوسته (SPIONs) متفاوت است. آنالیزهای LC-MS/MS و 1D PAGE نشان دادند که پروتئین‌هایی با محدوده‌ی سایز ۷۰-۳۰ و ۳۱۰-۱۲۰ کیلو دالتون روی سطوح صاف نانوذرات جذب سطحی می‌شوند درحالی‌که، پروتئین‌هایی با محدوده‌ی سایز ۱۰-۳۰ و ۷۰-۱۲۰ کیلو دالتون روی سطوح زبر جذب سطحی می‌شوند [۲۹].

تغییرات کنفورماسیونی پروتئین‌های اتصالى نیز می‌توانند ناشی از اتصال پروتئین‌ها به سطوح ذرات با انحناى مختلف باشد. برای مثال، گوی-لوپز و همکارانش اثر انحناى سطح روی پروتئین کروی کوچک با استفاده از بیوکونژوگه‌های نانوذرات Au-HSA (۱۰۰-۵ نانومتر) مورد بررسی قرار دادند. اتصال HSA به نانوذرات طلا با اندازه‌ی بزرگتر (که باعث کاهش انحناى سطح می‌شود) یک افت قابل توجهی در کنفورماسیون مارپیچی همراه با تشکیل کنفورماسیون ورقه‌ای و زنجیرهای تصادفی نشان می‌دهد در حالی‌که HSA هنگام اتصال به نانوذرات طلا با سایز کوچکتر دارای ساختار اصلی خود می‌باشد [۳۰].

۳-۶- محیط بیولوژیکی

مایورانو و همکارانش [۳۱] نانوبرهمکنش‌های زیستی رخ داده بین محیط کشت سلولی رایج مورد استفاده و نانوذرات طلای پوشیده شده با سیترات با اندازه‌های متفاوت را به وسیله‌ی تکنیک‌های طیف‌سنجی مختلف (فرابنفش-مرئی، DLS، PRLS) مورد مطالعه قرار دادند. آنها تعیین نمودند که چگونه ترکیب محیط روی تشکیل کمپلکس‌های پروتئین‌ها-نانو ذره موثر است که این ممکن است پاسخ سلولی را تحت تأثیر قرار دهد. آنها ثابت نمودند که برهمکنش‌های پروتئین-نانوذره بطور متفاوت بوسیله‌ی دو محیط سلولی (محیط DMEM و RPMI مکمل شده با FBS) که به طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرند، سازماندهی می‌شوند. از این محیط‌ها برای اکثر کشت‌های سلولی بهره می‌برند و به شدت از لحاظ ترکیب نمک، گلوکز و اسید آمینه تغییر می‌کنند. مجموعه‌ی گسترده‌ای از تکنیک‌های طیف سنجی، الکتروفوریتیک و میکروسکوپی به منظور توصیف ماهیت‌های زیست مولکولی تشکیل شده به وسیله‌ی پراکنده کردن نانوذرات با اندازه‌های متفاوت در محیط کشت سلولی به کار برده شده است. آنها ترکیب پروتئین کرونا، کینتیک‌های تبادل طبقات پروتئین متفاوت، همراه با حالت فیزیکی نانوذرات طلا بر حسب انباشتگی/تجمع را مشخص می‌کنند. همچنین مشاهده کردند که DMEM تشکیل یک پروتئین کرونای وابسته به زمان بزرگ را

جدول ۱: تکنیک‌های لازم برای بررسی ترکیب و ساختار پروتئین کرونا

پارامتر کرونا	تکنیک‌های استفاده شده	منابع
ضخامت	پراکندگی نوری دینامیکی (DLS)، رسوب‌گذاری سانتریفیوژی دیفرانسیلی (DCS)، کروماتوگرافی اندازه طردی (SEC)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)	۳۲، ۲۷
چگالی	ابزارهای پروتئینی رنگ سنجی	۳۳
ماهیت و کمیت	الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (PAGE)، اسپکتروسکوپی جرمی-کروماتوگرافی مایع (LC-MS)	۳۶ - ۳۸
کنفورماسیون	CD، فلوروسانس، مدل‌سازی حسابی	۴۰، ۳۹
قدرت تمایل	کروماتوگرافی اندازه طردی (SEC)، رزونانس پلاسمون سطحی (SPR)، کالریمتری تیتراسیون ایزوترمال (ITC)	۴۱، ۳۲، ۲۷

۵- رابطه‌ی بین ماهیت سنتزی، ماهیت بیولوژیکی و پاسخ فیزیولوژیکی

کنترل برهمکنش نانومواد با سیستم‌های بیولوژیکی یک چالش بنیادی در علم پزشکی است. زمانیکه یک نانوذره به یک محیط فیزیولوژیکی وارد می‌شود، سطح آن به سرعت با یک لایه‌ای از پروتئین پوشیده می‌شود. پروتئین کرونا اندازه، حالت تجمع‌شدگی و خواص بین سطحی را تغییر می‌دهد و یک ماهیت بیولوژیکی به نانوذره می‌دهد که متفاوت از ماهیت سنتزی آن است. این ماهیت بیولوژیکی است که پاسخ فیزیولوژیکی را از طریق تعدیل کردن برهمکنش نانوذره با بیومولکول‌ها، غشاهای و موانع فیزیکی تعیین می‌کند (شکل ۳). برهمکنش‌های پروتئین-نانوذره کنترل نشده می‌تواند نانوذره را به سمت سلول‌های غیر هدف سوق دهد و مجموعه‌ای از آنزیم‌ها را فعال کند و مانع از حذف مؤثر آن از بدن شود. تنها زمانی یک نانوذره ایمن و مؤثر است که پاسخ فیزیولوژیکی آن کنترل شده و مشخص باشد.

برهمکنش پروتئین‌ها با نانوذرات به گستردگی برهمکنش پروتئین‌ها با بیومولکول‌ها است. بسیاری از اصول استفاده شده برای بررسی برهمکنش پروتئین‌ها با بیومواد با در نظر گرفتن دو موضوع، برای نانوذرات نیز قابل استفاده است. اول، سطح نانوذره نسبت به سطح پروتئین دارای انحنای بیشتری است. دوم، بیومواد معمولاً در محل هدف باقی می‌ماند در حالیکه نانومواد در سراسر بدن توزیع می‌شود. علاوه بر این، نانومواد ممکن است از طریق فرایند آندوسیتوز وارد سلول شود و به محیط درون سلولی دسترسی پیدا کند.

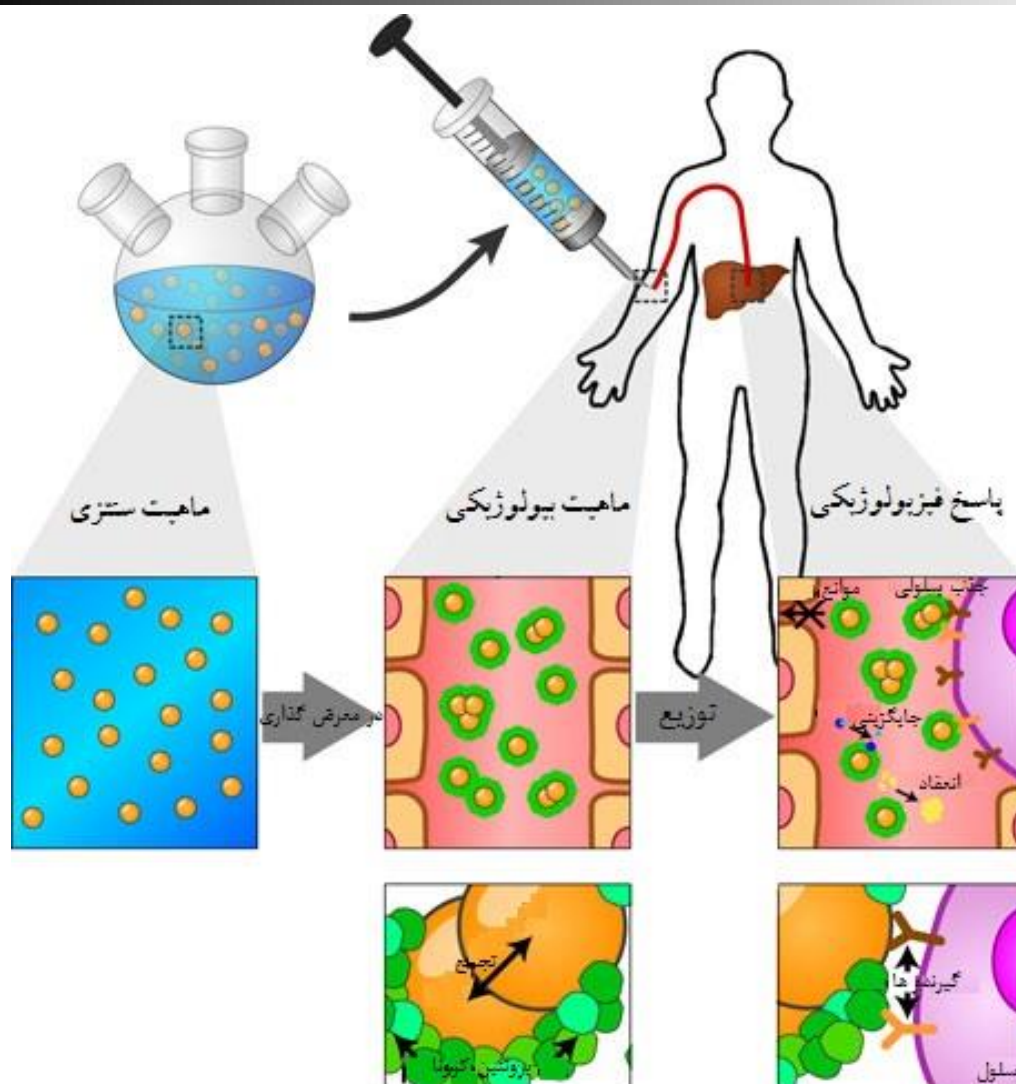
محیط بیولوژیکی یک نانوذره تابعی از ماهیت سنتزی آن (اندازه، شکل، شیمی سطح)، محیط فیزیولوژیکی و مدت زمان قرار گرفتن در معرض محیط بیولوژیکی است. هر بخش فیزیولوژیکی دارای پروتئین‌های خاصی است که به صورت خاصی با نانوذره برهمکنش ایجاد می‌کنند [۴۳، ۴۲].

باعث می‌شود و RPMI نشان دهنده‌ی دینامیک‌های متفاوتی با پوشش پروتئین کاهش داده شده می‌باشد. الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید و طیف سنجی جرمی نشان دادند که ترکیب متوسط پروتئین کرونا فراوانی نسبی پروتئین‌های سرم را بازتاب می‌کند. برای ارزیابی اثر بیولوژیکی نانو ساختارهای زیستی جدید، چندین آزمایش زیستی نسبی بر روی دو خط سلولی (Hela) (خط سلول سرطان گردنی اپی تلیال انسانی) و U937 (خط سلول غدد لنفاوی مونوسیت سرطان خونی انسان) در محیط‌های RPMI و DMEM و در حضور نانوذرات طلای ۱۵ نانومتری انجام شده بود. جذب نانوذرات طلا و توزیع سلولی آن با بکار بردن روش ردیابی بر اساس میکروسکوپی هم‌کانونی دو فوتون نشانه‌گذاری شد. آنها مشاهده کردند که دینامیک برهمکنش‌های نانو ذره-پروتئین بطور متفاوت بوسیله‌ی ترکیب متفاوت محیط سلولی تغییر داده می‌شود. اطلاعات حاصل از DLS، جذب فرابنفش-مرئی و RPLS اثرات حالت فیزیکی نانوذرات اصلاح شده بوسیله‌ی RPMI و DMEM را نشان داد. در حالت خاص، DMEM در مقایسه با RPMI یک پروتئین کرونای کاملاً پایدار و فراوان‌تر روی اندازه‌های متفاوت از نانو ذرات طلا را ایجاد می‌کند. همچنین این مشاهدات از طریق آنالیز پروتئین‌های جذب سطحی شده روی سطوح فلزی انجام شده بوسیله‌ی طیف سنجی جرمی و SDS-PAGE به اثبات رسید. تشکیل کمپلکس‌های مختلف نانو ذره-پروتئین‌های اصلاح شده به وسیله‌ی محیط مایع می‌تواند بر روی پاسخ سلولی اثر کند.

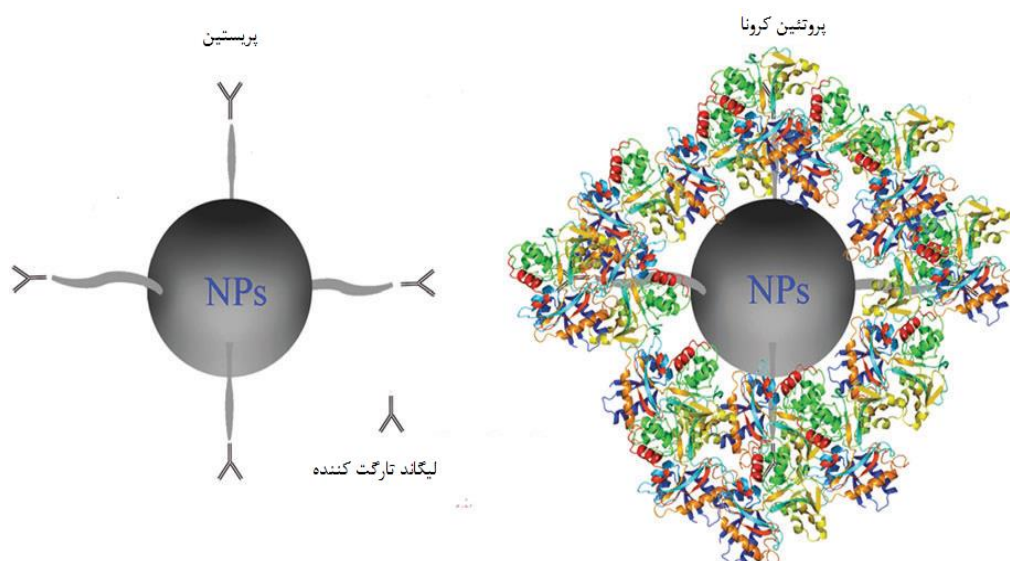
۴- تکنیک‌های لازم برای مطالعه‌ی ساختار و ترکیب پروتئین کرونا ساختار و ترکیب پروتئین کرونا از طریق پنج پارامتر ذیل مشخص می‌شود:

- ضخامت و چگالی
- ماهیت و کمیت
- آرایش و جهت‌گیری
- پیکربندی
- تمایل نانوذره به بیومولکول

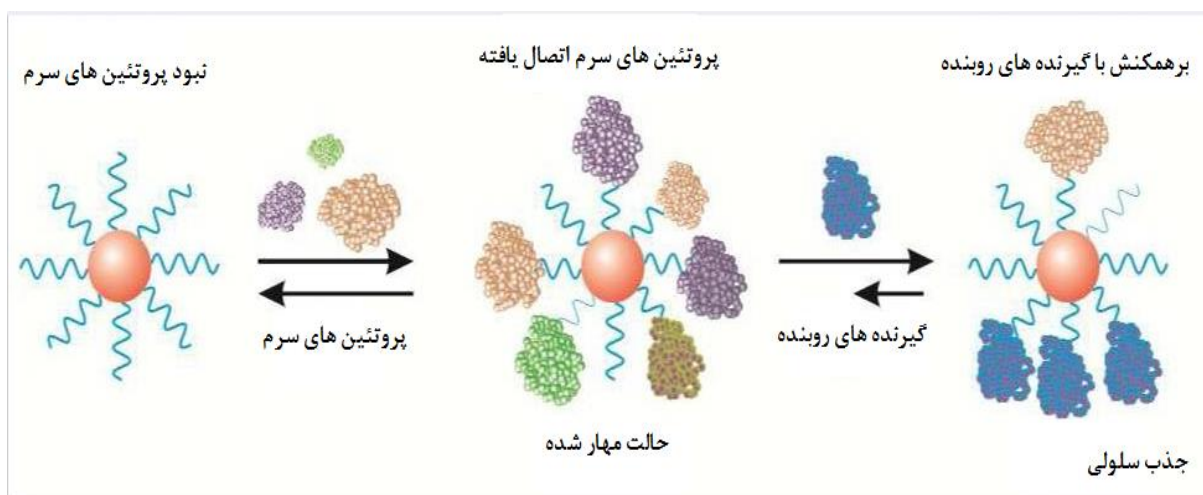
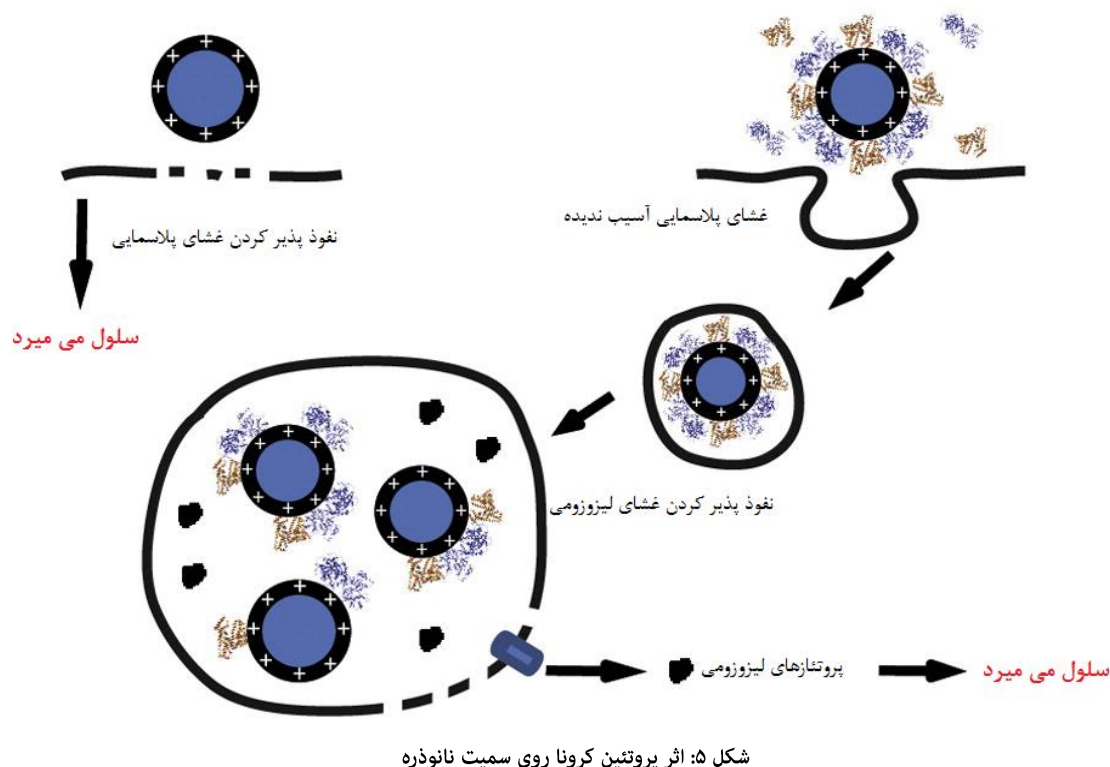
به طور کلی، این پارامترها درکنار یکدیگر برهمکنش یک نانوذره با یک محیط فیزیولوژیکی را تعیین می‌کنند. ضخامت و چگالی پروتئین کرونا اندازه‌ی کلی نانوذره و مساحت در معرض قرار گرفته آنرا تعیین می‌کند. ماهیت و کمیت پروتئین‌های جذب سطحی شده آرایش برهمکنش‌های بیولوژیکی احتمالی همراه با میزان استحکام آنها را تعیین می‌کنند. آرایش و جهت‌گیری دسترس‌پذیری نواحی کاتالیتیکی و اتصال بالقوه را تعیین می‌کند. کنفورماسیون فعالیت یک پروتئین و برهمکنش آن با بیومولکول‌های دیگر را تحت تأثیر قرار می‌دهد. میزان تمایل نانوذره به بیومولکول نشان می‌دهد که آیا آن پروتئین در طول برهمکنش‌های بیولوژیکی یا ترجمه به یک بخش فیزیولوژیکی جدید تفکیک می‌شود یا جذب سطحی می‌شود. تکنیک‌های استفاده شده جهت بررسی و مطالعه‌ی این پنج پارامتر در جدول ذیل لیست شده‌اند.



شکل ۳: رابطه‌ی بین ماهیت سنتزی، ماهیت بیولوژیکی و پاسخ فیزیولوژیکی. ماهیت سنتزی همان اندازه، شکل و شیمی سطح یک نانوذره سنتز شده است. ماهیت بیولوژیکی همان اندازه و حالت تجمع شوندگی نانوذره در یک محیط فیزیولوژیکی



شکل ۴: نمای شماتیک کمپلکس ایجاد شده بین نانوذره‌ی نشاندار شده با پروتئین کرونا [۴۴].



شکل ۶: مکانیسم پیشنهادی جذب سلولی نانوذرات DNA-Au. در محیط حاوی سرم، نانوذرات DNA-Au با پروتئین های سرم پوشیده می شوند که باعث کاهش برهمکنش نانوذرات با گیرنده های روبنده می شوند و به نوبه خود باعث کاهش جذب سلولی این نانوذرات می شوند. در غیاب پروتئین های سرم، این برهمکنشها به سهولت انجام می شوند و منجر به افزایش جذب سلولی این نانوذرات می شوند [۵۱].

لیگندهای تارگت کننده برای دارورسانی هدفمند به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافته است. با این حال مطالعات درون تنی نشان داد که کارایی نانوذرات اصلاح شده به دلیل جذب پروتئین ها روی سطح این نانوذرات در محیط بیولوژیکی به شدت کاهش یافته است. بنابراین، وقتی نانوذرات در محیط بیولوژیکی قرار می گیرند، پروتئین کرونا لیگاند هدفمندکننده موجود روی سطح نانوذرات را می پوشاند و مانع از اتصال لیگاند هدفمندکننده به سطح سلول می شوند و در نتیجه جذب سلولی نانوذرات را به طور قابل ملاحظه ای کاهش می دهند (شکل ۴) [۴۴].

۶- اثر پروتئین کرونا روی سرنوشت نانوذرات در بدن
۶-۱- اثر پروتئین کرونا روی کارایی هدفمند کنندگی لیگاندهای اتصال یافته روی سطح نانوذرات
نانوذرات موادی هستند که برای دارورسانی هدفمند به بافت یا سلول هدف در بدن انسان مورد استفاده قرار می گیرند. یکی از مهمترین اهداف محققان این است که کارایی دارورسانی هدفمند را از طریق اتصال لیگاندهای هدفمندکننده مانند آنتامرها یا آنتی بادی ها روی سطح نانوذرات، به میزان زیادی افزایش دهند. مطالعات برون تنی نشان داد که کارایی نانوذرات اصلاح شده با

۲-۶ اثر پروتئین کرونا روی سمیت نانوذرات

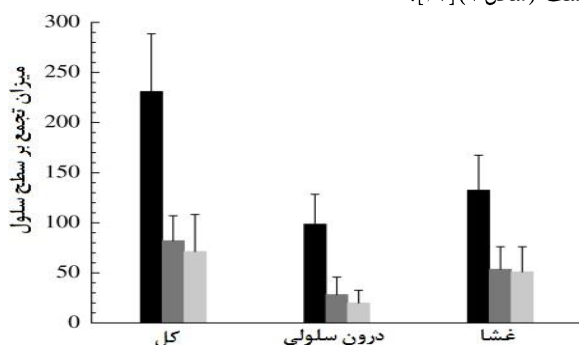
پروتئین کرونا از طریق کاهش جذب سلولی نانوذرات باعث کاهش سمیت نانوذرات می‌شود. به عبارت دیگر نانوذرات دارای پروتئین کرونای کمتر جذب سلولی بیشتر و در نتیجه سمیت سلولی بیشتری دارند. این پدیده برای نانولوله های کربنی [۴۵]، نانورقه های اکسید گرافن [۴۶] و نانوذرات بیوپلیمری در چندین محیط سلولی گزارش شده اند [۴۷]. در مورد نانومواد سمی متداول مانند نانوذرات پلی استایرنی دارای بار مثبت، پروتئین کرونا نقش محافظت کنندگی در برابر آسیب غشایی دارد (شکل ۵) [۴۹،۴۸].

۳-۶ اثر پروتئین کرونا روی جذب سلولی غیر ویژه

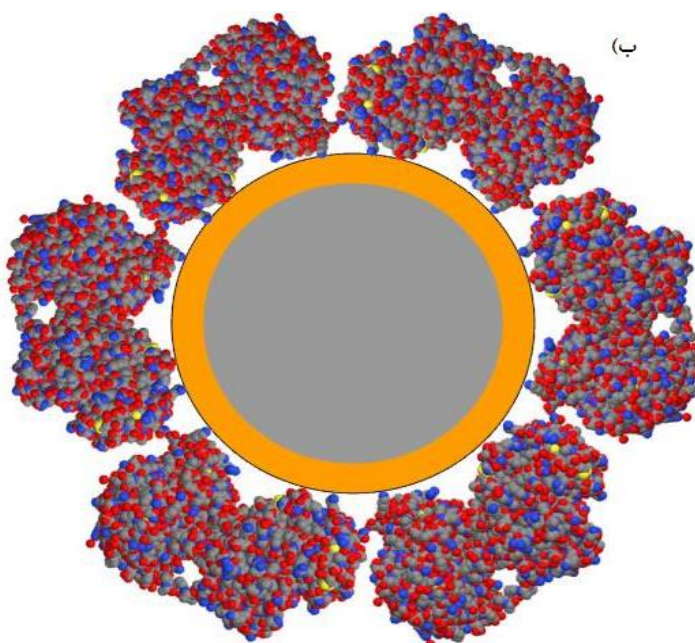
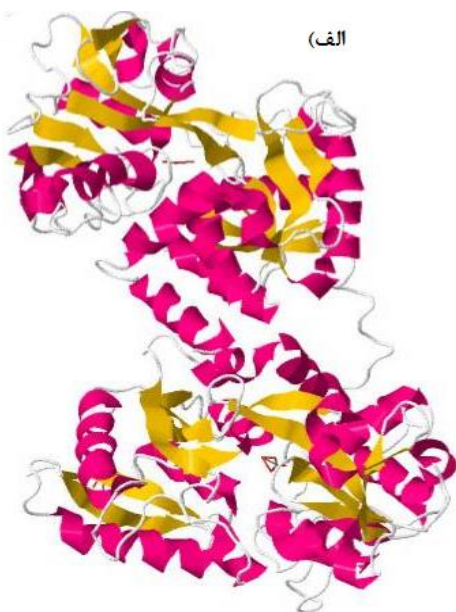
یک سوال جالب که به نظر محققان مهم و اساسی است: آیا کرونای بیومولکولی جذب نانوذرات را از طریق سلول ها افزایش می‌دهد؟ برای این کار بایستی بین جذب سلولی ویژه و جذب سلولی غیر ویژه تفاوت قائل شد. ورود ویژه نانوذرات به داخل سلول از طریق لیگاندهای خاص پذیرنده انجام می‌شود. جذب سلولی غیر ویژه یک فرایند تصادفی است که بدون کنترل بیومولکولی از طریق سلول انجام می‌گیرد. هنگام مطالعه اثر پروتئین های سرم روی جذب سلولی، کاملاً مشخص است که میزان نانوذرات وارد شده به داخل سلول به شدت به حضور پروتئین کرونا بستگی دارد. پاتل و همکارانش [۴۹] جذب سلولی غیر ویژه نانوذرات طلای عامل دار شده با الیگونوکلیوتید را بررسی کردند و مشاهده کردند که جذب آنها در محیط عاری از پروتئین های سرم به میزان زیادی افزایش یافته است (شکل ۶). به طور مشابه، جذب سلولی نانوذرات FePt یا نقاط کوانتومی (QDs) توسط سلول های هلا از طریق تشکیل پروتئین کرونا به شدت کاهش یافت (شکل های ۷، ۸) [۵۱،۵۲].

۴-۶ اثر پروتئین کرونا روی توزیع زیستی نانوذرات

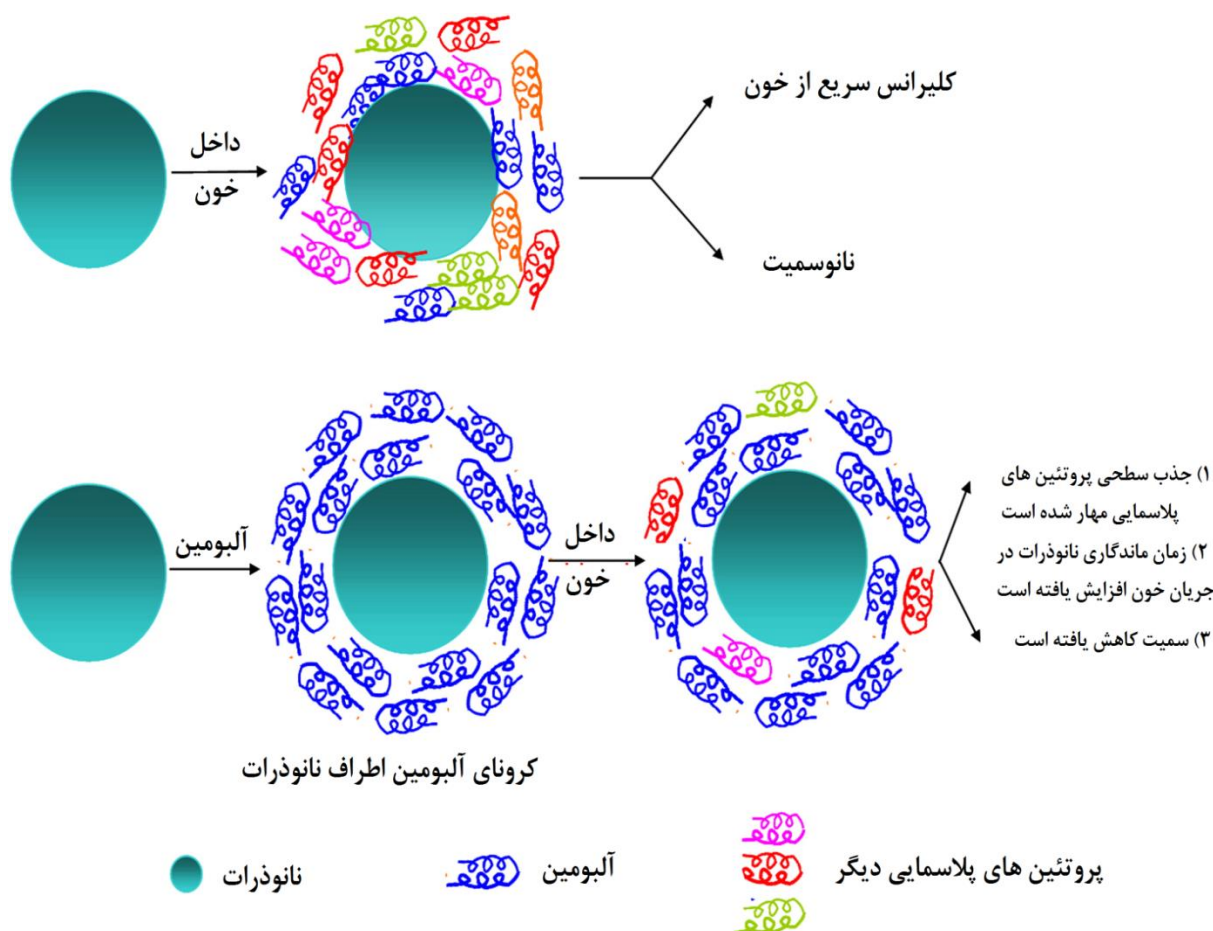
اگرچه اثر پگیله کردن نانوذرات روی توزیع زیستی برای چند سالی مشخص شده است [۵۳-۵۶]، ولی هنوز اثر پروتئین کرونای تشکیل شده در محیط بیولوژیکی روی توزیع زیستی نانوذرات مورد بررسی قرار نگرفته است. با این حال، مطالعات در رابطه با پیش پوشش دار کردن نانوذرات با پروتئین هایی مانند آلبومین سرم و آپولیپوپروتئین E جالب هستند [۴۷،۵۷،۵۸]. ماهیت هسته ی نانوذره چه پلیمری باشد چه فلزی، به نظر می‌رسد که فرایند پیش پوشش دار کردن باعث افزایش زمان ماندگاری نانوذره در خون و کاهش سرعت کلی رانس می‌شود. برای مثال، یک افزایش ۶ مرتبه ای نیمه عمر برای نانوذرات پوشش داده شده با BSA در مقایسه با نانوذره ی پوشش داده نشده توسط پنگ گزارش شده است (شکل ۹) [۴۷].



شکل ۷: آنالیز کمی جذب نانوذرات FePt از طریق سلول های هلا به مدت یک ساعت. میزان تجمع نانوذرات بر سطح سلول بعد از انکوباسیون با ۱ نانومول نانوذرات FePt (میله تیره) و به اضافه ۱۰۰ میکرومول TF (سبز تیره) و ۱۰۰ میکرومول HSA (سبز روشن) [۵۲].



شکل ۸: زنجیر پلی پپتید ترانسفرین و پروتئین کرونا (الف) نمای شماتیک زنجیر پلی پپتید ترانسفرین TF (ب) نمای شماتیک نانوذره FePt اصلاح شده با پلیمر که توسط یک مونولایه از مولکول های TF پوشش داده شده است



شکل ۹: های شماتیک پاسخهای بیولوژیکی به نانوذرات در حضور یا غیاب کروناي آلبومين. الف) انواع مختلفی از پروتئين های پلاسمایی روی نانوذرات بلافاصله بعد از ورود به جریان خون جذب سطحی می شوند و منجر به کلیرانس سریع و سمیت می شوند. ب) کروناي آلبومين از پیش تشکیل شده اطراف نانوذرات قادر است جذب سطحی پروتئين های پلاسمایی را به تأخیر بیندازد و در نتیجه باعث افزایش ماندگاری نانوذرات در جریان خون و کاهش سمیت نانوذرات شود

۷- منابع

- [1] MP. Monopoli, D. Walczyk, A. Campbell, G. Elia, I. Lynch, FB. Bombelli, KA. Dawson (2011), Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles, J. Am. Chem. Soc., Vol. 133, PP. 2525-2534.
- [2] L. Vroman, AL. Adams, GC. Fischer, PC. Munoz (1980), Interaction of high molecular-weight kininogen, factor-Xii, and fibrinogen in plasma at interfaces, Blood, Vol. 55, PP. 156-159.
- [3] L. Vroman (1962), Effect of Adsorbed Proteins on the Wettability of Hydrophilic and Hydrophobic Solids, Nature, Vol. 196, PP. 476 - 477.
- [4] L. Vroman and A. L. Adams (1969), Identification of rapid changes at plasma-solid interfaces, J. Biomed. Mater. Res., Vol. 3, PP. 43-67.
- [5] C. D. Walkey and W.C.W. Chan (2012), Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment, Chem. Soc. Rev., Vol. 41, PP. 2780-2799.
- [6] M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall, K. A. Dawson (2008), Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts, PNAS, Vol. 105, PP. 14265-14270.
- [7] C. Gunawan, M. Lim, Ch. P. Marquis, R. Amal (2014), Nanoparticle-protein corona complexes govern the biological fates and functions of nanoparticle, J. Mater. Chem. B, Vol. 2, PP. 2060-2083.
- [8] A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson (2009), Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface, Nature Materials, Vol. 8, PP. 543-557.



- [9] C. D. Walkey, J. B. Olsen, H. Guo, A. Emili, W. C. W. Chan, Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 134, PP. 2139–2147.
- [10] E. Sanfins, J. Dairou, F. Rodrigues-Lima, J. M. Dupret (2011), Nanoparticle-protein interactions: from crucial plasma proteins to key enzymes, *J. Phys.: Conf. Ser.*, Vol. 304, 012-039.
- [11] A. Verma, and F. Stellacci (2010), Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions, *Small*, Vol. 6, PP. 12-21.
- [12] S. Patil, A. Sandberg, E. Heckert, W. Self, S. Seal (2007), Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential, *Biomaterials*, Vol. 28, PP. 4600-4607.
- [13] D. Simberg, JH. Park, PP. Karmali, WM. Zhang, S. Merkulov, K. McCrae, SN. Bhatia, M. Sailor, E. Ruoslahti (2009), Differential proteomics analysis of the surface heterogeneity of dextran iron oxide nanoparticles and the implications for their in vivo clearance, *Biomaterials*, Vol. 30, PP. 3926–3933.
- [14] P. Aggarwal, JB. Hall, CB. McLeland, MA. Dobrovolskaia, SE. McNeil (2009), Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy, *Adv Drug Deliv Rev*, Vol. 61, PP. 428–437.
- [15] M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall, KA. Dawson (2008), Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 105, PP. 14265–14270.
- [16] M. Mahmoudi, S. E. Lohse, C. J. Murphy, A. Fathizadeh, A. Montazeri, K. S. Suslick (2014), Variation of Protein Corona Composition of Gold Nanoparticles Following Plasmonic Heating, *Nano Lett.*, Vol. 14, PP. 6–12.
- [17] PP. Karmali, D. Simberg (2011), Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems, *Expert Opin Drug Deliv*, Vol. 8, PP. 343–357.
- [18] A. Gessner, R. Waicz, A. Lieske, BR. Paulke, K. Mader, RH. Muller (2000), Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *Int J Pharm*, Vol. 196, PP. 245–249.
- [19] M. Lundqvist, J. Stigler, T. Cedervall, T. Berggard, MB. Flanagan, I. Lynch, G. Elia, K. Dawson (2011), The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study, *ACS Nano*, Vol. 5, PP. 7503–7509.
- [20] M.E. Price, R.M. Cornelius, J.L. Brash (2001), Protein adsorption to polyethylene glycol modified liposomes from fibrinogen solution and from plasma, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1512, PP. 191-205.
- [21] I. Lynch, KA. Dawson (2008), Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today*, Vol. 3, PP. 40–47.
- [22] M. Jansch, P. Stumpf, C. Graß, E. Rühl, R.H. Müller (2012), Adsorption kinetics of plasma proteins on ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, Vol. 428, PP. 125– 133.
- [23] S. Harnisch, R. H. Muëller (2000), Adsorption kinetics of plasma proteins on oil-in-water emulsions for parenteral nutrition, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Vol. 49, PP. 41–46.
- [24] ZJ. Deng, G. Mortimer, T. Schiller, A. Musumeci, D. Martin, RF. Minchin (2009), Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles, *Nanotechnology*, Vol. 20, PP. 455101.
- [25] D. E. Owens and N. A. Peppas (2006), Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, Vol. 307, PP. 93–102.
- [26] J. Kreuter, D. Shamenkov, V. Petrov, P. Ränge, K. Cychutek, C. Koch-Brandt, R. Alyautdin (2002), Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier, *J. Drug Targeting*, Vol. 10, PP. 317–325.
- [27] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggard, E. Thulin, H. Nilsson, KA. Dawson, S. Linse (2007), Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 104, PP. 2050–2055.
- [28] MA. Dobrovolskaia, AK. Patri, J. Zheng, JD. Clogston, N. Ayub, P. Aggarwal, BW. Neun, JB. Hall, SE, McNeil (2007), Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles, *Nanomedicine*, Vol. 5, PP. 106–117.
- [29] M. Mahmoudi and V. Serpooshan (2011), Large protein absorptions from small changes on the surface of nanoparticles, *J. Phys. Chem. C*, Vol. 115, PP. 18275–18283.
- [30] S. Goy-López, J. Juárez, M. Alatorre-Meda, E. Casals, V. F. Puentes, P. Taboada, V (2012). Mosquera,



- Physicochemical characteristics of protein-NP bioconjugates: the role of particle curvature and solution conditions on human serum albumin conformation and fibrillogenesis inhibition, *Langmuir*, Vol. 28, PP. 9113-9126.
- [31] G. Maiorano, S. Sabella, B. Sorce, V. Brunetti, MA. Malvindi, R. Cingolani, PP. Pompa (2010), Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response, *ACS Nano*, Vol. 4, PP. 7481-7491.
- [32] D. Walczyk, F. B. Bombelli, M. P. Monopoli, I. Lynch and K. A. Dawson (2010), What the cell "sees" in bionanoscience, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 132, PP. 5761-5768.
- [33] S. K. Sohaebuddin, P. T. Thevenot, D. Baker, J. W. Eaton, L. Tang (2010), Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent, *Part. Fibre Toxicol.*, Vol. 7, PP. 22.
- [34] T. Cedervall, I. Lynch, M. Foy, T. Berggad, S. C. Donnelly, G. Cagney, S. Linse, K. A. Dawson (2007), Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles, *Angew. Chem., Int. Ed.*, Vol. 46, PP. 5754-5756.
- [35] M. Luck, W. Schroder, S. Harnisch, K. Thode, T. Blunk, B. R. Paulke, M. Kresse, R. H. Muller (1997), Identification of plasma proteins facilitated by enrichment on particulate surfaces: analysis by two-dimensional electrophoresis and N-terminal micro sequencing, *Electrophoresis*, Vol. 18, PP. 2961-2967.
- [36] T. M. Goppert and R. H. Muller (2005), Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: comparison of plasma protein adsorption patterns, *J. Drug Targeting*, Vol. 13, PP. 179-187.
- [37] T. M. Goppert and R. H. Muller (2005), Adsorption kinetics of plasma proteins on solid lipid nanoparticles for drug targeting, *Int. J. Pharm.*, Vol. 302, PP. 172-186.
- [38] A. L. Capriotti, G. Caracciolo, G. Caruso, C. Cavaliere, D. Pozzi, R. Samperi, A. Lagana (2005), Analysis of plasma protein adsorption onto DC-Chol-DOPE cationic liposomes by HPLC-CHIP coupled to a Q-TOF mass spectrometer, *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 398, PP. 2895-2903.
- [39] Z. J. Deng, M. T. Liang, M. Monteiro, I. Toth, R. F. Minchin (2011), Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation, *Nat. Nanotechnol.*, Vol. 6, PP. 39-44.
- [40] S. H. D. Lacerda, J. J. Park, C. Meuse, D. Pristinski, M. L. Becker, A. Karim, J. F. Douglas (2010), Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins, *ACS Nano*, Vol. 4, PP. 365-379.
- [41] S. Lindman, I. Lynch, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson, S. Linse (2007), Systematic investigation of the thermodynamics of HSA adsorption to N-isopropylacrylamide/N-tert-butylacrylamide copolymer nanoparticles. Effects of particle size and hydrophobicity, *Nano Lett.*, Vol. 7, PP. 914-920.
- [42] I. Lynch and K. A. Dawson (2008), Protein-nanoparticle interactions, *Nano Today*, Vol. 3, PP. 40-47.
- [43] A. E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson (2009), Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface, *Nat. Mater.*, Vol. 8, PP. 543-557.
- [44] V. Mirshafiee, M. Mahmoudi, K. Lou, J. Cheng, M. L. Kraft (2013), Protein corona significantly reduces active targeting yield, *Chem. Commun.*, Vol. 49, PP. 2557-2559.
- [45] C. Ge, J. Du, L. Zhao, L. Wang, Y. Liu, D. Li, Y. Yang, R. Zhou, Y. Zhao, Z. Chai, C. Chen (2011), Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 108, PP. 16968-16973.
- [46] W. Hu, C. Peng, M. Lv, X. Li, Y. Zhang, N. Chen, C. Fan, Q. Huang (2011), Protein corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide, *ACS Nano*, Vol. 5, PP. 3693-3700.
- [47] Q. Peng, S. Zhang, Q. Yang, T. Zhang, XQ. Wei, L. Jiang, CL. Zhang, QM. Chen, ZR. Zhang, YF. Lin (2013), Preformed albumin corona, a protective coating for nanoparticles based drug delivery system, *Biomaterials*, Vol. 34, PP. 8521-8530.
- [48] F. Wang, L. Yu, MP. Monopoli, P. Sandin, E. Mahon, A. Salvati, KA. Dawson (2013), The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes, *Nanomedicine*, Vol. 9, PP. 1159-1168.
- [49] L. Wang, J. Li, J. Pan, X. Jiang, Y. Ji, Y. Li, Y. Qu, Y. Zhao, X. Wu, C. Chen (2013), Revealing the binding structure of the protein corona on gold nanorods using

synchrotron radiation-based techniques: understanding the reduced damage in cell membranes, *J Am Chem Soc*, Vol. 135, PP. 17359–17368.

[50] PC. Patel, DA. Giljohann, WL. Daniel, D. Zheng, AE. Prigodich, CA. Mirkin (2010), Scavenger receptors mediate cellular uptake of polyvalent oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles. *Bioconj Chem*, Vol. 21, PP. 2250–2256.

[51] X. Jiang, S. Weise, M. Hafner, C. Rocker, F. Zhang, WJ. Parak, GU. Nienhaus (2010), Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding, *J R Soc Lond Interface*, Vol. 7, PP. S5–S13.

[52] L. Treuel, S. Brandholt, P. Maffre, S. Wiegele, L. Shang, GU. Nienhaus (2014), Impact of protein modification on the protein corona on nanoparticles and nanoparticle-cell interactions, *ACS Nano*, Vol. 8, PP. 503–513.

[53] AC. Faure, S. Dufort, V. Josserand, P. Perriat, JL. Coll, S. Roux, O. Tillement (2009), Control of the in vivo biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings, *Small*, Vol. 5, PP. 2565–2575.

[54] J. Lipka, M. Semmler-Behnke, RA. Sperling, A. Wenk, S. Takenaka, C. Schleh, T. Kissel, WJ. Parak,

WG. Kreyling (2010), Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection, *Biomaterials*, Vol. 31, PP. 6574–6581.

[55] T. Niidome, M. Yamagata, Y. Okamoto, Y. Akiyama, H. Takahashi, T. Kawano, Y. Katayama, Y. Niidome (2006), PEGmodified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications, *J Controlled Release*, Vol. 114, PP. 343–347.

[56] GF. Paciotti, L. Myer, D. Weinreich, D. Goia, N. Pavel, RE. McLaughlin, L. Tamarkin (2004), Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery, *Drug Deliv*, Vol. 11, PP. 169–18.

[57] K. Ogawara, K. Furumoto, S. Nagayama, K. Minato, K. Higaki, T. Kai, T. Kimura (2004), Pre-coating with serum albumin reduces receptor-mediated hepatic disposition of polystyrene nanosphere: implications for rational design of nanoparticles, *J Controlled Release*, Vol. 100, PP. 451–455.

[58] M. Schaffler, F. Sousa, A. Wenk, L. Sitia, S. Hirn, C. Schleh, N. Haberl, M. Violatto, M. Canovi, P. Andreozzi, M. Salmona, P. Bigini, WG. Kreyling, S. Krol (2014), Blood protein coating of gold nanoparticles as potential tool for organ targeting, *Biomaterials*, Vol. 35, PP. 3455–3466.