

بررسی تاثیر غلظت کراتین حل شده از پر مرغ بر اندازه نانوذرات کراتین

مهرداد شیخ حسینی*^۱، سیده زهرا موسوی نژاد^۲.

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

m.sheikhhosseini@alzahra.ac.ir

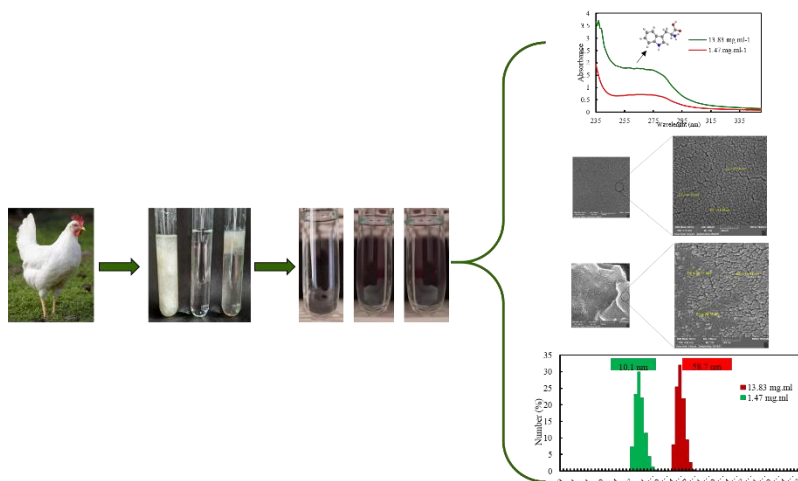
۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

z.moosavinejad@alzahra.ac.ir

خلاصه

کراتین یکی از سخت‌ترین مواد بیولوژیکی موجود در طبیعت است به همین دلیل حل کردن پروتئین کراتین یک کار چالش برانگیز است. نانوذرات کراتینی در روش سنتز پایین به بالا، با خود تجمعی از طریق برهم‌کنش‌های بین مولکولی و مبادلات دی سولفیدی ساختارهایی در ابعاد نانو شکل می‌دهند. سایز، اندازه سطح و ریخت شناسی نانوذرات از پارامترهای مهمی هستند که با تغییر آنها از طریق مکانیسم‌های مختلف، می‌توان بر خواص زیستی آنها تاثیر ایجاد کرد. در این پژوهش نانوذره کراتین در دو غلظت ساخته شد. سپس طیف سنجی مرئی-فرابنفش، تصویر میکروسکوپ الکترونی با FESEM و همچنین اندازه قطر هیدرودینامیک با DLS این دو نمونه بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد افزایش غلظت کراتین حل شده منجر به افزایش خودتجمعی ذرات کراتین و در نتیجه سایز بزرگتر ذرات کراتین شده است. به نحوی که در غلظت ۱.۴۷ mg.ml^{-1} ذرات کراتین واجد قطر حقیقی ۱۵-۱۲ نانومتر و بیشترین فراوانی در قطر هیدرودینامیک ۱۰.۱ نانومتر بودند. در حالی که در غلظت ۱۳.۸۳ mg.ml^{-1} ذرات کراتین واجد قطر حقیقی ۲۹-۱۳ نانومتر و بیشترین فراوانی در قطر هیدرودینامیک ۵۸.۷ نانومتر بودند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد با وجود اینکه غلظت کراتین حل شده به میزان ده برابر افزایش یافت، بیشترین فراوانی در اندازه ذرات به میزان پنج برابر و در قطر هیدرودینامیکی ۵۸.۷ نانومتر مشاهده شد. پس می‌توان اظهار داشت در مواردی از جمله سیستم دارو رسانی هوشمند که نیاز به سایز ذرات زیر ۱۰۰ نانومتر می‌باشد، می‌توان از این تکنیک به منظور افزایش دارورسانی و کاهش دوز مصرفی دارو استفاده کرد و این تکنیک روشی کاربردی و مقرون به صرفه جهت استفاده از نانوذرات کراتین در مصارف پزشکی، دارویی و صنعتی است.

کلمات کلیدی: کراتین، نانوذره، پروتئین، خاصیت خودتجمعی، قطر هیدرودینامیک.



۱. مقدمه

کراتین فراوان ترین پروتئین ساختاری در سلول‌های اپیتلیال است [1]. ساختار کراتین‌ها اغلب در مقالات به عنوان آلفاکراتین‌ها (پشم، مو، سم، ناخن، شاخ و لایه شاخی) [2] و بتا کراتین‌ها (پر، پنجه و منقار پرندگان، چنگال خزنده و فلس) [3] مورد بحث قرار می‌گیرند. در طول دهه‌های گذشته، مطالعه بر روی استخراج، تعیین خصوصیت و کاربرد پروتئین کراتین از فیبرهای پشم، مو و ناخن‌ها اهمیت پیدا کرده است [4], [5]. کراتین که از پره‌های مرغ استخراج می‌شوند، بصورت سازگار با محیط زیست، غیر ساینده، زیست تخریب پذیر، نامحلول در حلال‌های آلی و دارای خواص مکانیکی خوبی، رفتار آبگریز، چگالی کم و در نهایت ارزان هستند [6].

نانوذرات طبقه گسترده ای از مواد هستند که شامل ذرات موادی هستند، که حداقل یک بعد از آنها حداقل ۱۰۰ نانومتر دارد [7]. اخیراً، نانوذرات مبتنی بر بیوپلیمرها شامل نانوذرات پروتئین به دلیل سمیت و زیست تجزیه پذیری کم به طور موثری در داروها و مواد مغذی مورد استفاده قرار می‌گیرند [8]. نانوذرات پروتئینی دارای خواصی نظیر تجزیه پذیری، غیرآنتی ژنیک، قابل سوخت و ساز، اصلاح سطح، پایداری بیشتر در داخل بدن در حین ذخیره سازی هستند و تهیه و نظارت بر اندازه آن بسیار آسان است. این ذرات توانایی اتصال کووالانسی با دارو و لیگاندها را دارند [9]–[11]. هدف اصلی در طراحی نانوذرات به عنوان یک سیستم تحویل دارو، کنترل اندازه ذرات، سطح و خصوصیات سطح آن است به گونه ای که نانوذرات حامل مقدار مورد نیاز دارو فعالیت دارویی مورد نظر را با آزاد سازی مواد فعال برای دستیابی به یک عمل خاص در جایگاه نشان می‌دهند [12], [13]. پروتئین‌ها به عنوان ماده ایده آل برای تهیه نانوذرات به دلیل دوگانه دوستی آنها که باعث می‌شود نانوذرات با دارو و حلال ارتباط برقرار کنند توصیه می‌شود. نانوذرات حاصل از پروتئین‌های طبیعی تخریب پذیر، قابل سوخت و ساز هستند و به راحتی با تغییرات سطح سازگار هستند تا امکان اتصال دارو و لیگاندهای هدفمند فراهم شود [14]. نانوذرات پروتئین دارای مزایای بسیاری هستند از جمله: در کاهش سمیت کمک می‌کنند، رهاسازی دارو را بهبود می‌بخشند، دسترسی زیستی را بهبود می‌بخشند و فرمولاسیون بهتری را ارائه می‌دهند. نانوذرات پروتئینی قادر هستند با حداقل دوز عمل بهتری نشان دهند و همچنین مقاومت دارویی را در بدن کاهش دهند. علاوه بر این، میزان انحلال و سطحی که دارو می‌تواند در نانوذرات محاط شود افزایش یابد [15].

یکی از روش‌های سنتز نانوذرات، سنتز از پایین به بالا است. در این حالت، از خصوصیات خود تجمعی مولکولهای منفرد برای ایجاد ترکیبات پیچیده در مقیاس نانو استفاده می‌شود [16]. در نانوذرات پروتئینی با خود تجمعی از طریق برهم‌کنش‌های بین مولکولی و مبادلات دی سولفیدی ساختارهایی در ابعاد نانو شکل می‌گیرند.

سایز، اندازه سطح و ریخت شناسی نانوذرات از پارامترهای مهمی هستند که با تغییر آنها از طریق مکانیسم‌های مختلف، می‌تواند بر خواص زیستی آن‌ها موثر باشد [17], [18]. بنابراین با کنترل اندازه ذرات در مقیاس نانو می‌توان بر فعالیت زیستی آن‌ها تاثیر گذاشت. تا کنون مطالعه ای جهت بررسی تاثیر غلظت کراتیم اولیه بر سایز نانوذرات کراتینی صورت نگرفته است. در این پژوهش با بررسی این نکته که آیا افزایش غلظت در کراتین حل شده می‌تواند بر سایز ذرات کراتینی حاصل تغییر ایجاد کند یا خیر، تلاش شده است که نانوذرات کراتین با اندازه کوچک و غلظت بالا ساخته شود. پس از نیل به این هدف با بررسی‌های دقیق تر می‌توان از این یافته‌ها در سیستم دارو رسانی هوشمند استفاده کرد.



۲. مواد و روش ها

۱.۲. ساخت نانوذره کراتین

استخراج کراتین با حل کردن پر آغاز شد. به این منظور بافر تریس واجد اوره و سیستئین تهیه شد. در دو لوله آزمایش جداگانه ۱۰ میلی لیتر بافر تریس اضافه شد. برای بررسی تاثیر غلظت کراتین حل شده بر اندازه نانوذرات کراتین ساخته شده، از مقادیر متفاوت پر استفاده شد. به این صورت که در لوله شماره یک، ۰/۱۶ گرم پر و در لوله شماره دو، ۱/۶ گرم پر اضافه شد. لوله های آزمایش به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد در بن ماری گرماگذاری شد. محلول به دست آمده که شامل کراتین حل شده است، از فیلتر سرسرنگی $0.22 \mu\text{m}$ عبور داده و به مدت ۷۲ ساعت در برابر آب مقطر و در دمای ۴ درجه سانتی گراد دیالیز شد. آب مقطری که کیسه دیالیز در آن قرار داشت سه بار در روز تعویض شد. پس از اتمام مرحله دیالیز، نانوذرات کراتین حاصل جهت آزمایش های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۲.۲. اندازه گیری غلظت

برای اندازه گیری کراتین حل شده، از معادله ۱ استفاده شد:

$$\text{وزن پر ثانویه (mg)} - \text{وزن پر اولیه (mg)} = \text{وزن کراتین حل شده (mg)} \quad (1)$$

سپس از معادله ۲ برای تعیین غلظت کراتین در محلول استفاده شد:

$$\text{بافر (ml)} / \text{کراتین حل شده (mg)} = \text{غلظت کراتین (mg/ml)} \quad (2)$$

۳.۲. طیف سنجی مرئی-فراابنفش

نانوذره کراتین ساخته شده با استفاده از اسپکتروفتومتر Shimadzo در طول موج ۲۳۰ تا ۸۰۰ نانومتر مورد خوانش قرار گرفت.

۴.۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی

ریخت شناسی نانوذره ها به منظور بررسی شکل، پراکندگی و اندازه نانوذره ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی FESEM بررسی شد.



۵.۲. تعیین قطر هیدرودینامیک

برای تعیین اندازه نانوذره‌ها از روش تفرق نور پویا یا DLS^* استفاده شد. ابتدا نانوذره‌ها با آب مقطر ۸ برابر رقیق شدند و اندازه قطر هیدرودینامیک آن‌ها با دستگاه Malvern 1013393 به دست آمد.

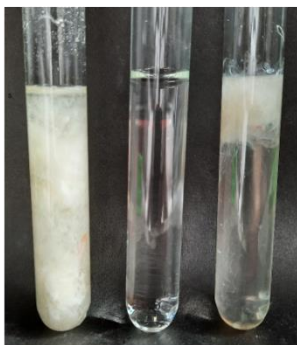
۳. نتایج و بحث

۱.۳. اندازه گیری غلظت

ابتدا نانوذرات ساخته شده از نظر شکل ظاهری بررسی شدند (شکل ۱). نانوذرات ساخته شده در هر دو غلظت کراتین، از نظر ظاهری بی‌رنگ و کاملاً شفاف بودند. غلظت کراتین حل شده برای نمونه شماره یک ۱.۴۷ میلی گرم بر میلی لیتر و غلظت کراتین حل شده برای نمونه شماره دو، ۱۳.۸۳ میلی گرم بر میلی لیتر است.

ب

الف



۱ آب مقطر ۲



۲



آب مقطر



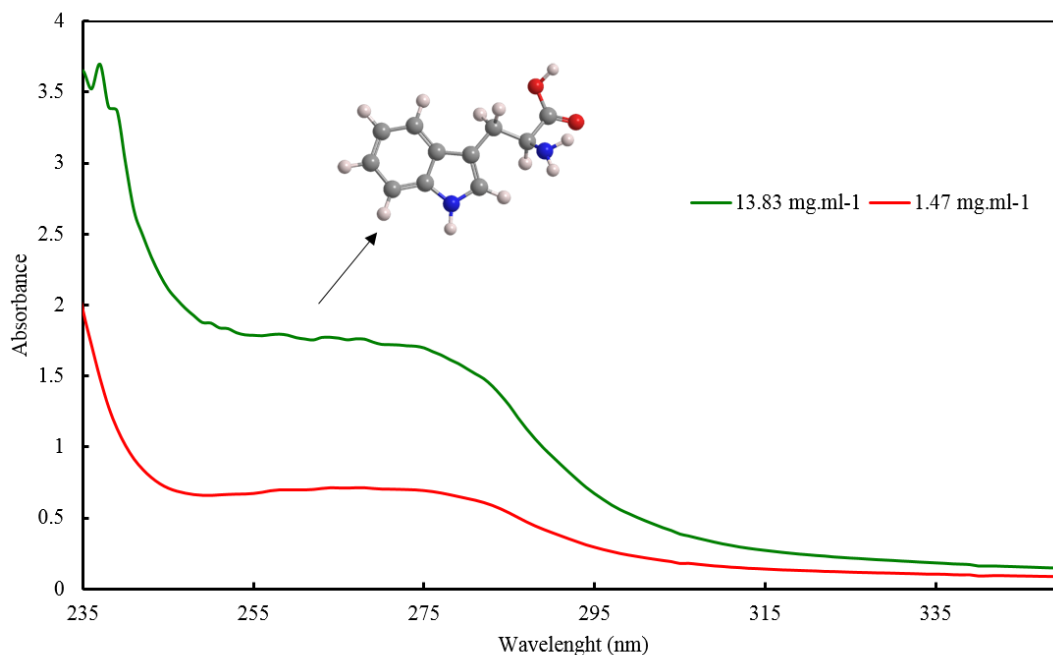
۱

شکل ۱. استخراج کراتین از پر. الف) نانوذرات کراتین ب) استخراج کراتین از پر.

لوله شماره ۱ غلظت 1.47 mg.ml^{-1} . لوله شماره ۲ غلظت 13.83 mg.ml^{-1} .

۲.۳. طیف سنجی مرئی - فرابنفش

طیف های جذبی نانوذرات کراتین در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج طیف سنجی، رد شیفت یا بلوشیفیت محسوسی در هیچ کدام از طول موج های بین ۲۳۰-۸۰۰ نانومتر را نشان نمی دهد. تنها مورد قابل ذکر، جذب بیشتر در نمونه شماره ۲ است که واجد غلظت بیشتر نانوذرات کراتین (13.83 mg.ml^{-1}) و به دنبال آن، غلظت بیشتر کروموفورهای است که در طول موج های ۲۳۰-۸۰۰ نانومتر شدت جذب بالاتری توسط دستگاه طیف سنجی از خود نشان می دهند. این در حالی است که نمونه شماره ۱ که از غلظت پایین تر نانوذرات کراتین (1.47 mg.ml^{-1}) برخوردار است، جذب کمتری از خود نشان می دهد. قابل ذکر است که جذب در طول موج ۲۳۰-۳۰۰ نانومتر مربوط به حضور آمینو اسید های واجد حلقه آروماتیک مانند تریپتوفان، لیزین و فنیل آلانین در کراتین است. در پژوهش حاضر، در طول موج ۲۷۰ نانومتر یک پله مشاهده می شود اما در مطالعه پاکدل و همکاران، در طیف سنجی نانوذره کراتین در طول موج ۲۷۶ نانومتر، یک قله مشخص مشاهده شد [۱۹].



شکل ۲. طیف سنجی نانوذره کراتین

۳.۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی

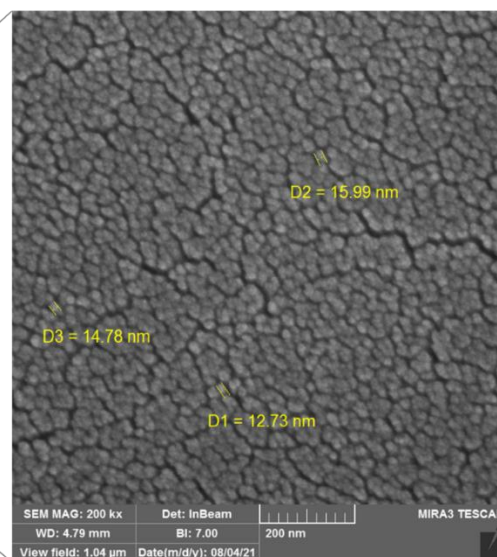
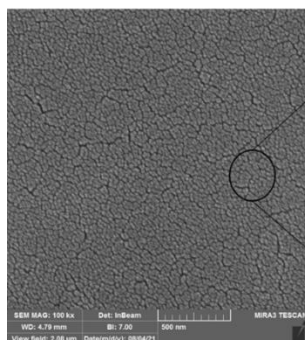
تصاویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی نانوذرات کراتین در شکل ۳ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود، در نمونه شماره یک که غلظت 1.47 mg.ml^{-1} نانوذرات کراتین وجود دارد (شکل ۳.الف)، ذرات مشاهده شده تقریباً کروی

* Dynamic Light Scattering

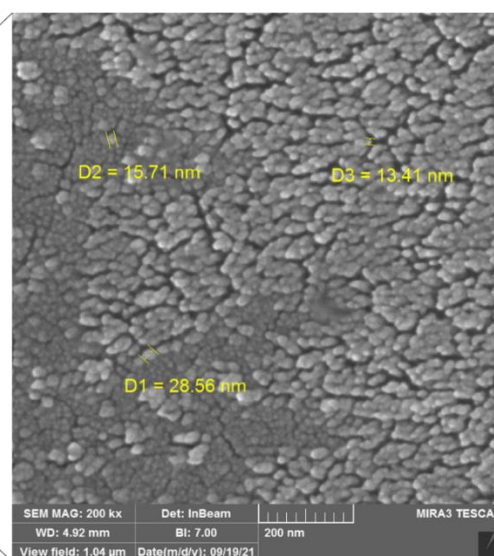


شکل، واضح تر و در سطح مشخص هستند. این نتایج با تصاویر میکروسکوپ الکترونی در مطالعه پاکدل و همکاران مطابقت داشت [۱۹]. اما در نمونه شماره دو که غلظت 13.83 mg.ml^{-1} نانوذرات کراتین وجود دارد (شکل ۳.ب)، تراکم ذرات بسیار بالا بوده تا حدی که ذرات به روی یکدیگر انباشته شده اند و علاوه بر آرایش سطحی، گلوله های روی هم انباشته شده را به وجود آورده اند. در بزرگ نمایی 200 نانومتر، آنالیز تصاویر FESEM نشان می دهد که در نمونه شماره یک، ذراتی با قطر حقیقی $12-15$ نانومتر مشاهده می شود اما در نمونه شماره دو ذراتی با قطر حقیقی $13-29$ نانومتر مشاهده می شود.

الف



ب

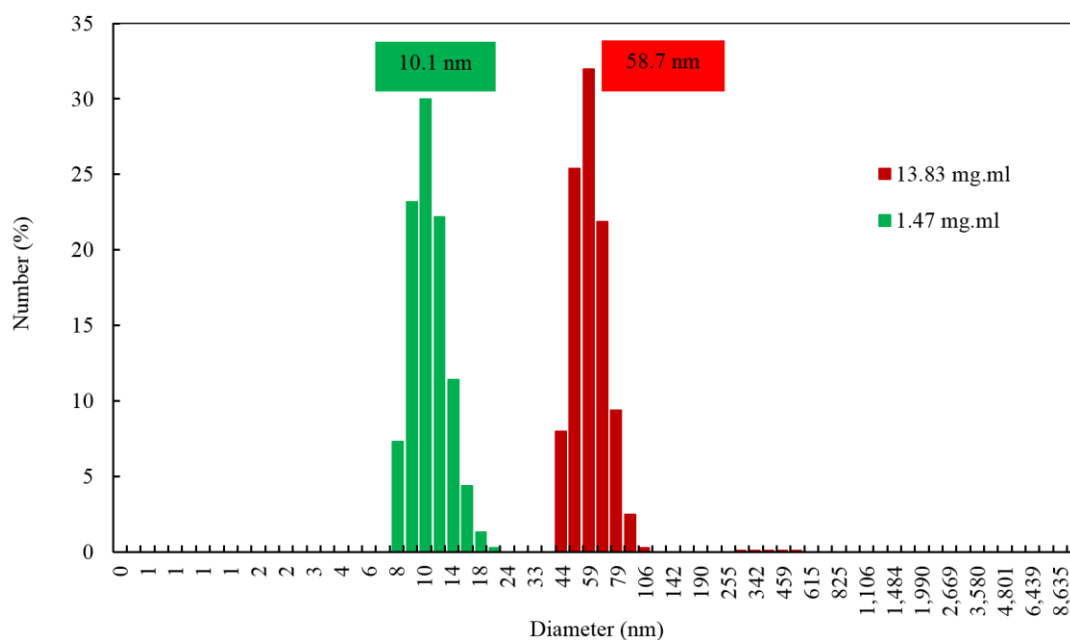


شکل ۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی FESEM. الف) نانوذره کراتین با غلظت 1.47 mg.ml^{-1} (ب) نانوذره کراتین با غلظت 13.83 mg.ml^{-1} .



۴.۳. قطر هیدرودینامیک

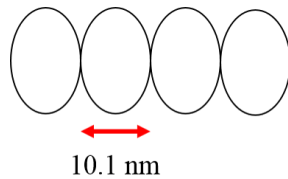
با توجه به ظاهر تقریباً شفاف محلول واجد نانوذره کراتین در دو غلظت (شکل ۱. الف)، انتظار می‌رود که سایز ذرات تشکیل شده بسیار کوچک باشد. نتایج حاصل از DLS این پیش فرض ذهنی را تایید کرد. به این صورت که ذرات پروتئینی کراتین هنگامی که غلظت آن کم است (1.47 mg.ml^{-1}) بیشترین فراوانی را در قطر 10.1 نانومتر دارند اما با افزایش غلظت نانوذره کراتین (13.83 mg.ml^{-1}) بیشترین فراوانی در اندازه ذرات در قطر 58.7 نانومتر مشاهده شد.



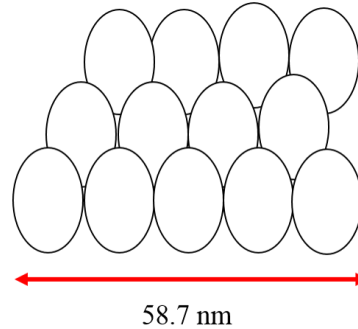
شکل ۴. تعیین قطر هیدرودینامیک نانوذرات کراتین

در واقع با توجه به شکل شماتیک نشان داده شده در شکل ۵، مشاهده می‌شود ذراتی که توسط دستگاه تفرق نور پویا تشخیص داده می‌شود، حاصل اجتماع چند ذره کوچکتر است که به علت افزایش غلظت نانوذره کراتین و در نتیجه تاثیر خاصیت خودتجمعی مولکول‌های کراتین به علت وجود پیوند‌های بین مولکولی از جمله پیوند دی سولفیدی است.

الف



ب

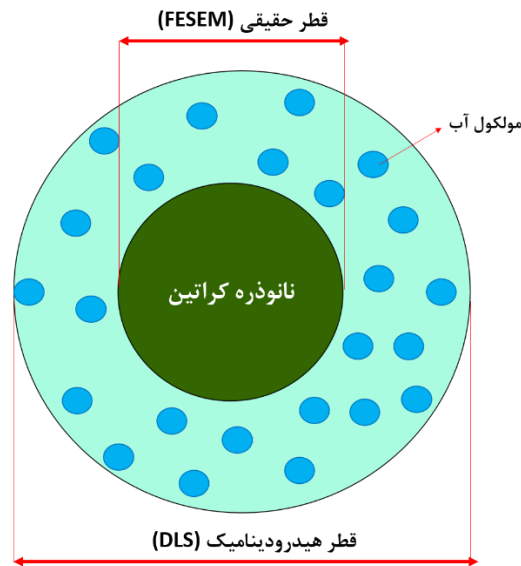


شکل ۵. تصویر شماتیک ذرات تشخیص داده شده توسط DLS.

الف) نانوذره کراتین با غلظت 1.47 mg.ml^{-1} (ب) نانوذره کراتین با غلظت 13.83 mg.ml^{-1}

پدرام راد و همکاران در سال ۲۰۱۲ با استفاده از الکترواسپری، پودر کراتین با میانگین اندازه ذرات ۵۳ نانومتر از پر مرغ استخراج کردند [20]. در مطالعه وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۶ هنگامی که غلظت کراتین از ۵ میلی گرم بر میلی لیتر به ۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر رسید، سایز نانوذرات کراتین از ۱۸۰ نانومتر به ۲۱۶ نانومتر تغییر کرد [21]. در سال ۲۰۲۰ خامس با استفاده از گلوٹارالدهید، نانوذرات کراتینی با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر ساخت و با استفاده از روش میکروسکوپ TEM، سایز ذرات کراتین را بین ۹ تا ۱۰ نانومتر تخمین زد [22]. در سال ۲۰۲۲ پاکدل و همکاران با استفاده از بنامر کاپتواتانول نانوذرات کراتین (11 mg.ml^{-1}) با قطر هیدرودینامیک ۲۲.۸۳ نانومتر ساخت [19].

لازم به ذکر است تفاوت قطرهای گزارش شده در مقالات مختلف مربوط به تفاوت اندازه در قطر حقیقی و قطر هیدرودینامیک است. همانطور که در شکل شماره ۶ توضیح داده شده است قطر حقیقی مربوط به تعیین اندازه ذرات در حالت بدون آب است که توسط نرم افزار بر روی تصاویر میکروسکوپ الکترونی شامل SEM، TEM و FESEM صورت می گیرد. اما قطر هیدرودینامیک مربوط به قطر ذرات در حالت محلول است که به دلیل اینکه ذرات توسط مولکول‌های آب احاطه شده اند، قطر بیشتری نسبت به حالت بدون آب گزارش می شود.



شکل ۶. تفاوت قطر حقیقی و قطر هیدرودینامیک نانوذرات.

۵. نتیجه‌گیری

در این پژوهش نانوذرات کراتین در دو غلظت (1.47 mg.ml^{-1}) با بیشترین فراوانی در قطر 10.1 نانومتر و 13.83 (mg.ml^{-1}) بیشترین فراوانی در قطر 58.7 نانومتر ساخته شد که ظاهر شفافی داشتند. این شفافیت در مطالعات پیشین مشاهده نشده بود و نانوذرات کراتینی که در مقالات ذکر شده است به صورت ذرات سفید رنگ رسوب پیدا کردند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد با وجود اینکه غلظت کراتین حل شده به میزان ده برابر افزایش یافت، بیشترین فراوانی در اندازه ذرات به میزان پنج برابر و در قطر هیدرودینامیکی 58.7 نانومتر مشاهده شد. پس می‌توان اظهار داشت در مواردی از جمله سیستم دارو رسانی هوشمند که نیاز به سایز ذرات زیر 100 نانومتر می‌باشد، می‌توان از این تکنیک به منظور افزایش دارورسانی و کاهش دوز مصرفی دارو استفاده کرد و این تکنیک روشی کاربردی و مقرون به صرفه جهت استفاده از نانوذرات کراتین در پزشکی، دارویی و صنعتی است.

۶. قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه الزهرا به جهت تامین هزینه های این پژوهش تقدیر می‌شود.



۷. مراجع

- [1] P. A. Coulombe and M. B. Omary, “‘Hard’ and ‘soft’ principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 14, no. 1, pp. 110–122, 2002.
- [2] J. M. Gillespie, “The proteins of hair and other hard α -keratins,” in *Cellular and molecular biology of intermediate filaments*, Springer, 1990, pp. 95–128.
- [3] B. R. George, A. Evazynajad, A. Bockarie, H. McBride, T. Bunik, and A. Scutti, “Keratin fiber nonwovens for erosion control,” in *Natural Fibers, Plastics and Composites*, Springer, 2004, pp. 67–81.
- [4] J. M. Ruso and P. V. Messina, *Biopolymers for Medical Applications*. CRC Press, 2017.
- [5] C. C. Reddy *et al.*, “Valorization of keratin waste biomass and its potential applications,” *J. Water Process Eng.*, vol. 40, p. 101707, 2021.
- [6] P. Kumaran, A. Gupta, and S. Sharma, “Synthesis of wound-healing keratin hydrogels using chicken feathers proteins and its properties,” *Int J Pharm Pharm Sci*, vol. 9, no. 2, pp. 171–178, 2017.
- [7] V. J. Mohanraj and Y. Chen, “Nanoparticles—a review,” *Trop. J. Pharm. Res.*, vol. 5, no. 1, pp. 561–573, 2006.
- [8] W. D. C. Chacon, S. Verruck, A. R. Monteiro, and G. A. Valencia, “The mechanism, biopolymers and active compounds for the production of nanoparticles by anti-solvent precipitation: a review,” *Food Res. Int.*, vol. 168, p. 112728, 2023.
- [9] W. Lohcharoenkal, L. Wang, Y. C. Chen, and Y. Rojanasakul, “Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014.
- [10] E. Kianfar, “Protein nanoparticles in drug delivery: animal protein, plant proteins and protein cages, albumin nanoparticles,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 19, no. 1, p. 159, 2021.
- [11] F. Eweje *et al.*, “Protein-based nanoparticles for therapeutic nucleic acid delivery,” *Biomaterials*, p. 122464, 2024.



- [12] J. P. Rao and K. E. Geckeler, "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, no. 7, pp. 887–913, 2011.
- [13] T. Sugimoto, "Underlying mechanisms in size control of uniform nanoparticles," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 309, no. 1, pp. 106–118, 2007.
- [14] J. Kaltbeitzel and P. R. Wich, "Protein-based Nanoparticles: from Drug Delivery to Imaging, Nanocatalysis and Protein Therapy," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 62, no. 44, p. e202216097, 2023.
- [15] Y. Miao, T. Yang, S. Yang, M. Yang, and C. Mao, "Protein nanoparticles directed cancer imaging and therapy," *Nano Converg.*, vol. 9, no. 1, p. 2, 2022.
- [16] D. Nath and P. Banerjee, "Green nanotechnology—a new hope for medical biology," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 36, no. 3, pp. 997–1014, 2013.
- [17] P. M. Mehrnaz Sheikh Hosseini, Zahra Moosavi-Nejad, "A new nanobiotic: synthesis and characterization of an albumin nanoparticle with intrinsic 1 antibiotic activity," *Iran. joyrnal Microbiol.*, 2023.
- [18] P. V Baptista *et al.*, "Nano-strategies to fight multidrug resistant bacteria—'A Battle of the Titans,'" *Front. Microbiol.*, vol. 9, p. 1441, 2018.
- [19] M. Pakdel, Z. Moosavi-Nejad, R. K. Kermanshahi, and H. Hosano, "Self-assembled uniform keratin nanoparticles as building blocks for nanofibrils and nanolayers derived from industrial feather waste," *J. Clean. Prod.*, vol. 335, p. 130331, 2022.
- [20] Z. P. Rad, H. Tavanai, and A. R. Moradi, "Production of feather keratin nanopowder through electrospraying," *J. Aerosol Sci.*, vol. 51, pp. 49–56, 2012.
- [21] J. Wang, S. Hao, T. Luo, Q. Yang, and B. Wang, "Development of feather keratin nanoparticles and investigation of their hemostatic efficacy," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 68, pp. 768–773, 2016.
- [22] E. J. Khamees, "Physical and biological synthesis of GNPs and keratin nanoparticles from chicken's feather and applications," in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2020, vol. 928, no. 7, p. 72013.