

سنتز و مشخصه‌یابی نانو کامپوزیت کراتین-سیلیکا مزوپوروس با استفاده از کراتین استخراج شده از پر بلدرچین، ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی و زیست‌سازگاری آن

فاطمه درویش زاده^۱، آزاده حکمت^{۱*} و اقدس بنائی^۲

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه نانو و بیوفیزیک، پژوهشکده علوم کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

با وجود پتانسیل بالای نانوپروتئین‌ها و نانوذرات سیلیکای مزوپوروس (MSNPs)، مطالعات محدودی به ترکیب هم‌زمان این دو ترکیب زیستی و معدنی، به‌ویژه با استفاده از کراتین طبیعی استخراج شده از پر پرندگان پرداخته‌اند. در این پژوهش، کراتین برای اولین بار از پر بلدرچین استخراج و با استفاده از روش اولتراسونیک به نانوکراتین (nK) تبدیل شد. نانوکراتین سپس بر روی MSNPs بارگذاری گردید. طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش حضور پیوندهای پپتیدی و اسیدهای آمینه آروماتیک را در nK و نانو کامپوزیت (nK-MSNPs) تأیید کرد. طیف‌های مادون قرمز وجود گروه‌های عاملی مشخص کراتین مانند پیک امید I، امید II و سیستئین (S-S) در نانوکراتین و باندهای Si-O-Si در محدوده 1100 و 800 cm^{-1} مربوط به ساختار MSNPs در نانو کامپوزیت را تأیید نمود. الگوی پراش پرتو ایکس ساختار آمورف را در nK-MSNPs نشان داد. میانگین اندازه nK- و nK-MSNPs به ترتیب $245/4$ و $211/4$ نانومتر و شاخص پراکندگی آن‌ها به ترتیب $0/594$ و $1/48$ گزارش شد. پتانسیل زتای nK و nK-MSNPs به ترتیب $9/6-$ و $16/9-$ میلی‌ولت اندازه‌گیری گردید که نشان‌دهنده پایداری الکترواستاتیکی کامپوزیت بود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی کاهش تجمع در nK-MSNPs را نسبت به nK تأیید کرد. نانو کامپوزیت در بازه ۹۰ روزه از نظر شیمیایی پایدار باقی ماند. نتایج آزمون سمیت سلولی (MTT) بر روی سلول‌های فیبروبلاست انسانی (hFF) نشان داد که nK-MSNPs حتی در غلظت‌های نسبتاً بالا فاقد اثر منفی معنادار بر بقاء سلولی است. بررسی فعالیت ضدباکتریایی نشان داد nK-MSNPs در باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* به ترتیب نواحی بازدارندگی $22/8 \pm 0/5$ و $20/2 \pm 0/4$ میلی‌متر ایجاد می‌کند که از نظر آماری معنادار ($P < 0.05$) و قابل مقایسه با آنتی‌بیوتیک مرجع بود. بنابراین nK-MSNPs با ساختار متخلخل، پایداری طولانی‌مدت، زیست‌سازگاری و فعالیت ضد میکروبی، به عنوان گزینه‌ای مناسب در مصارف زیست‌پزشکی می‌تواند باشد.

واژه‌های کلیدی: نانوکراتین، نانوذرات سیلیکا مزوپوروس، نانو کامپوزیت، فعالیت ضدباکتریایی، پر بلدرچین، فیبروبلاست

ایمیل نویسنده مسئول: ahekmat@iauo.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۸/۲۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۷/۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۵/۲۱

بیومواد جدید با عملکرد بهینه در محیط‌های فیزیولوژیک از اهمیت بالایی برخوردار است. زیست‌سازگاری به‌عنوان ویژگی بیومواد شناخته می‌شود؛ با این حال، خواص نظیر زیست‌تخریب‌پذیری، استحکام مکانیکی، پایداری شیمیایی و عملکرد هدفمند نیز در کاربردهای پزشکی نقش کلیدی ایفا می‌کنند (۱). پلیمرهای زیستی (بیوپلیمرها) به‌دلیل

۱- مقدمه

امروزه طیف وسیعی از زیست‌مواد (بیومواد)، به‌صورت تجاری و یا در مرحله تحقیق و توسعه، در حوزه‌های مختلف زیست‌پزشکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. طراحی و توسعه

برخورداری از ویژگی‌هایی همچون زیست‌سازگاری بالا، سمیت سلولی پایین و قابلیت زیست‌تخریب‌پذیری، مزیت‌های قابل توجهی نسبت به پلیمرهای سنتزی دارند. در میان آن‌ها، پروتئین‌ها به دلیل توانایی در ایجاد پیوندهای درون‌مولکولی و بین‌مولکولی، قادرند ساختارهایی با پایداری و انعطاف‌پذیری متنوع ایجاد کنند (۲). این ویژگی‌ها امکان ایجاد پلیمرهایی با رفتار ساختاری پیچیده را فراهم می‌سازد. پلی‌پپتیدهایی نظیر کلاژن، کراتین و ژلاتین به‌طور گسترده در حوزه‌های متعددی از علوم زیستی و مهندسی پزشکی به‌کار می‌روند. از جمله کاربردهای مهم آن‌ها می‌توان به دارورسانی هدفمند (۲، ۳)، مهندسی بافت (۴)، ترمیم زخم (۵)، جذب زیستی مود فعال (۶، ۷)، عایق‌های حرارتی زیست‌پایه (۸)، تولید بیوپلاستیک‌ها (۹)، و درمان‌های فوتودینامیک (۱۰) اشاره کرد.

کراتین متعلق به خانواده‌ای از پروتئین‌های ساختاری رشته‌ای موسوم به اسکلوپروتئین‌ها است. این پروتئین، فراوان‌ترین پروتئین ساختاری موجود در مو، ناخن، پر، شاخ و پنجه حیوانات به‌شمار می‌رود و در کنار کلاژن، یکی از مهم‌ترین پلیمرهای طبیعی در بدن جانوران است. ویژگی بارز کراتین، محتوای بالای سیستئین آن در مقایسه با سایر پروتئین‌های رشته‌ای مانند الاستین، کلاژن و پروتئین‌های میوفیبریل است (۱۱). سیستئین با ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی بین مولکولی و درون‌مولکولی، نقش کلیدی در پایداری ساختاری این پروتئین ایفا می‌کند. این پیوندها، ساختار سه‌بعدی کراتین را تثبیت کرده و مقاومت آن را در برابر تجزیه آنزیمی توسط پروتازها افزایش می‌دهند، که این امر موجب پایداری بیشتر آن در محیط‌های بیولوژیکی می‌شود. افزون بر این، گروه‌های عاملی سیستئین، کراتین را به پروتئینی با قابلیت‌های شیمیایی بالا تبدیل کرده‌اند که توانایی انجام واکنش‌های احیاء، اکسایش و هیدرولیز را دارد (۱۲). از نظر فیزیکی شیمیایی، کراتین دارای نقطه ایزوالکتریک پایین‌تر از ۷ است؛ ویژگی‌ای که موجب می‌شود در فرمولاسیون داروهای آهسته‌رهش عملکرد مؤثری از خود نشان دهد (۱۳). این خاصیت، کراتین را به بستر مناسبی برای طراحی نانو سامانه‌های هوشمند با قابلیت ره‌ایش کنترل‌شده در شرایط فیزیولوژیکی مختلف بدل می‌سازد. علاوه بر ویژگی‌های ساختاری و زیست‌سازگاری،

کراتین دارای مزایای عملکردی دیگری همچون بازده بالای بارگذاری دارو و قابلیت بازتولیدپذیری است که آن را برای کاربرد در سامانه‌های دارورسانی، مهندسی بافت و سایر اهداف زیست‌پزشکی بسیار جذاب می‌سازد (۱۴). همچنین، حضور توالی‌های پپتیدی اختصاصی نظیر RGD و LDV در ساختار کراتین، امکان اتصال هدفمند آن به گیرنده‌های سطحی سلول‌های خاص، به‌ویژه سلول‌های سرطانی، را فراهم می‌سازد؛ عاملی که پتانسیل استفاده از کراتین را در توسعه سامانه‌های دارورسان هدفمند به‌شکل قابل توجهی افزایش می‌دهد (۱۵).

مطالعات متعددی در زمینه استخراج، خالص‌سازی، شناسایی و کاربرد پروتئین‌های کراتین انجام شده است. در طول سال‌ها، کراتین از منابع مختلفی نظیر پر و منقار پرندگان (۱۶)، پنجه، ناخن، شاخ و سم حیوانات (۱۷)، و همچنین موی سر و ناخن پای انسان (۱۸، ۱۹) استخراج شده است. یکی دیگر از منابع مهم کراتین، پشم است. پشم با دارا بودن تا ۹۵٪ کراتین وزنی، به‌عنوان منبعی خالص از پروتئین‌های رشته‌ای حد واسط شناخته می‌شود که کاربرد گسترده‌ای در حوزه‌های آرایشی و زیست‌پزشکی یافته‌اند (۲۰).

در راستای بهره‌گیری از نانوپروتئین‌ها در طراحی سامانه‌های نوین دارورسانی، نانوکراتین به‌عنوان یکی از مواد زیستی نویدبخش، توجه بسیاری را به خود جلب کرده است. روش‌های مختلفی جهت سنتز نانوکراتین مطرح شده است. یکی از روش‌های سنتز توسط ژانگ و همکاران در سال ۲۰۲۰ معرفی شد. آنها رویکردی نوین برای استخراج میکرو و نانوکراتین از پشم با استفاده از فرآیند هیدرولیز آنزیمی تقویت‌شده با اولتراسوند ارائه کردند. محصول نهایی شامل میکروکراتین‌های دوکی شکل با ابعاد ۴ تا ۷ میکرومتر قطر و ۷۰ تا ۱۲۰ میکرومتر طول و همچنین نانوکراتین‌های مخروطی شکل با قطری بین ۵۰ تا ۳۰۰ نانومتر و طول کمتر از ۱۵ میکرومتر بود (۲۱). مطالعاتی نیز در مورد سنتز کمپلکس‌های زیست‌سازگار جهت کاربری در دارورسانی و پزشکی انجام شده است. به عنوان نمونه در مطالعه‌ای، دنیای نانو کراتین احیایی ابتدا از طریق روش کاهش استخراج شد و سپس نانوذرات کراتین به‌صورت خودبه‌خود از طریق برهم‌کنش‌های غیرکوالانسی تشکیل شدند و با پیوندهای

ظرفیت بالای MSNPs برای بارگذاری پروتئین و ساختار مزوپوری آن‌ها، محیطی محافظ را برای جلوگیری از دنا توره شدن پروتئین در شرایط مختلف فراهم می‌سازد. به عنوان مثال نایری و همکاران MSNPs عامل‌دار شده با بیوپلیمرهایی نظیر اسید هیالورونیک و کیتوسان را سنتز کرده و به کمک تکنیک‌هایی از جمله پراش پرتو ایکس (XRD)، آنالیز حرارتی و طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) آن را مشخصه‌یابی نمودند. آن‌ها از نانوذرات پوشیده‌شده با این بیوپلیمرها برای بررسی برهم‌کنش با آلبومین سرم گوی (BSA) استفاده کردند تا نقش هر یک از پوشش‌های بیوپلیمری را در این برهم‌کنش‌ها روشن سازند. آن‌ها دریافتند که BSA می‌تواند با هر دو نوع MSNPs عامل‌دار شده، علی‌رغم بارهای الکتریکی متضاد آن‌ها، برهم‌کنش داشته باشد (۲۶). با وجود پتانسیل بالای نانوپروتئین‌ها و MSNPs، تاکنون مطالعات محدودی به بررسی هم‌زمان این دو پلیمر زیستی و معدنی به‌ویژه در زمینه استفاده از کراتین طبیعی استخراج‌شده از منابع ضایعاتی مانند پر پرندگان، پرداخته‌اند. در این راستا، هدف از پژوهش حاضر، استخراج کراتین از پر بلدرچین برای اولین بار و نانوکردن آن با روش اولتراسونیک به منظور افزایش پایداری و کارایی زیستی آن، و در ادامه بارگذاری در ساختار MSNPs به‌منظور بهبود ویژگی‌های ساختاری و سپس ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی و زیست‌سازگاری آن است. برای ارزیابی نانوکامپوزیت حاصل، از مجموعه‌ای از تکنیک‌ها شامل طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش (UV-Vis)، طیف‌سنجی FT-IR، XRD، آنالیز پراکندگی نور پویا (DLS)، اندازه‌گیری پتانسیل زتا و TEM استفاده شده است. همچنین از روش انتشار دیسک جهت ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نانوکامپوزیت استفاده شد و از آزمون MTT جهت بررسی تأثیر نانوکامپوزیت سنتزی بر بقای سلولی و زیست‌سازگاری رده سلولی فیبروبلاست‌های انسانی hFF استفاده شد. طراحی این نانوکامپوزیت، با تکیه بر منابع طبیعی و روش‌های کم‌هزینه، چشم‌اندازهای نوینی در حوزه پزشکی و زیست‌پزشکی خواهد بود.

دی‌سولفیدی بین گروه‌های تیولی، به‌صورت درونی تثبیت شدند. داروی ضدسرطان دوکسوروبیسین نیز به کمک برهم‌کنش‌های آب‌گریز و پیوندهای هیدروژنی روی کمپلکس بارگذاری شد. نتایج نشان داد که نانوذرات دارو بارگذاری‌شده در شرایط شبیه‌سازی‌شده ریزمحیط تومور، رهایش دارو را تسریع می‌کنند و در عین داشتن سمیت بالا برای سلول‌های سرطانی A549، سمیت پائینی برای سلول‌های نرمال از خود نشان می‌دهند. علاوه بر آن، بررسی‌های سلولی نشان داد که نانوذرات دارو بارگذاری‌شده قابلیت ورود به سلول‌های توموری را دارا هستند (۲۲). در مطالعه‌ای دیگر، فعالیت ضدباکتریایی نانوکراتین علیه *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که پس از بارگذاری پنی‌سیلین و ونکومایسین بر روی نانوکراتین خواص ضد باکتریایی این داروها افزایش می‌یابد. همچنین آزمایش‌های سمیت‌سنجی بر روی سلول‌های لنفوم انسانی نشان داد که این نانوسامانه فاقد سمیت سلولی بوده و زیست‌سازگاری بالایی دارند (۲۳).

امروزه طیف گسترده‌ای از نانومواد در حوزه‌های مختلف زیست‌پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. سیلیسیم یکی از فراوان‌ترین عناصر در پوسته زمین است و حدود ۷۰٪ از جرم خاک را تشکیل می‌دهد. معمولاً سه نوع از نانومواد مبتنی بر سیلیکون شامل نانوذرات سیلیکونی پروس (pSiNPs)، نانوذرات سیلیکای مزوپروس (MSNPs) و نانوذرات سیلیکای مزوپروس با نظم تناوبی (PMONPs) در پژوهش‌های زیستی و نانوداروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرند. MSNPs به دلیل مزایایی همچون حجم بالای تخلخل (۰/۶ تا ۱ سانتی‌متر مکعب بر گرم)، سطح ویژه زیاد (قطر منافذ ۲ تا ۱۰ نانومتر)، تنوع در شیمی سطح، و زیست‌سازگاری مناسب، می‌توانند برای بارگذاری عوامل ضدسرطانی مورد استفاده قرار گیرند (۲۴). تلفیق ساختارهای مزوپروس با خواص نوری، الکتریکی و مغناطیسی نانومواد معدنی، این نانوذرات را به سامانه‌هایی چندمنظوره و تطبیق‌پذیر برای کاربردهای زیستی تبدیل کرده است. این نانوذرات در حوزه‌هایی نظیر کاتالیز، جذب، جداسازی و دارورسانی هدفمند در علوم زیستی و پزشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (۲۴، ۲۵). از سوی دیگر،

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

سه عدد بلدرچین ذبح شده از مزرعه بلدرچین واقع در حومه تهران خریداری شد. نانو سیلیکا مزوپروس (SiO_2)، با خلوص ۹۹.۵٪، اندازه ۲۰-۱۵ نانومتر، اندازه منافذ ۶-۲ نانومتر، سفید رنگ، کروی متخلخل) از شرکت US Research Nanomaterials, Inc (آمریکا) خریداری شد. محیط آگار مولر-هیتتون (MHA)، محیط مایع لوریا-برتانی (LBB)، محیط مایع مولر-هیتتون (MHB)، سدیم هیدروکسید (۹۹٪ خلوص، NaOH)، اسید کلریدریک (۳۷٪ خلوص، HCl)، تریس (هیدروکسی متیل) آمینومتان، اتانول (۷۵٪)، گلو تار آلدهید (۲۵٪)، رنگ کوماسی بریلینت بلو R-250 و اسید ارتوفسفریک (۸۵٪) از شرکت مرک (آلمان) تهیه شد. محلول بیوره از شرکت قطران شیمی (ایران) و آلبومین سرم گاوی (پودر لیوفیلیز، بیش از ۹۶ درصد خلوص و بدون چربی)، فیلم‌های کربنی فرم‌وار روی مس، تریپسین (Trypsin-EDTA)، 3-[4, 5-diphenyl dimethylthiazol-2-yl]-2, tetrazolium bromide) MTT، پنی سیلین و استرپتومایسین از شرکت سیگما-آلدریج (آمریکا) تهیه شد. قرص بافر فسفات سالین (PBS) از شرکت زیست مواد فارمد (ایران) تهیه شد. محیط کشت DMEM و سرم جنین گاوی (FCS: Fetal calf Serum) از شرکت Gibco-Invitrogen (آمریکا) خریداری شدند.

۲-۲- استخراج کراتین از پرهای بلدرچین

استخراج کراتین با الهام از مقالات پیشین (۶، ۱۶، ۱۷، ۲۰، ۲۷) و با اعمال تغییراتی متناسب با شرایط این پژوهش انجام شد. به صورت خلاصه، پرهای بلدرچین در آب جوش غوطه‌ور شده و سه بار با یک شوینده ملایم و آب گرم شسته شدند تا خون، آلاینده‌های محیطی و چربی‌های سطحی حذف شوند. سپس پرها به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند (شکل ۱A). برای حذف بیشتر چربی‌های سطحی، پرها به مدت ۱۲ ساعت در محلول اتانول ۷۰٪ و آب مقطر (به نسبت ۱:۲) غوطه‌ور شدند و سپس سه ساعت در آب مقطر نگهداری شدند. پرها

دوباره برای سه روز دیگر در آفتاب خشک شدند (شکل ۱B) و سپس به مدت ۴ ساعت توسط آسیاب صنعتی ریز شدند. پس از آن هیدرولیز قلیایی برای استخراج پروتئین به کار رفت. بدین منظور ۱۰ گرم پر آسیاب‌شده در ۳۰۰ میلی‌لیتر محلول NaOH ۰/۳ نرمال به مدت ۴۸ ساعت در یک شیکر با سرعت ۱۴۰ دور در دقیقه هیدرولیز شد (شکل ۱C). محلول حاصل سه بار با کاغذ صافی درجه یک صاف شد تا باقی‌مانده پرها حذف شوند (شکل ۱D). برای رسوب‌دهی پروتئین، HCl یک نرمال به محلول به‌صورت قطره‌ای اضافه شد تا pH به حدود ۴/۲ برسد که نقطه ایزوالکتریک کراتین پر بلدرچین است (شکل ۱E). محلول زردرنگ حاصل در دمای ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب با آب دیونیزه شسته و دوباره سانتریفیوژ شد. این فرآیند شستشو دو بار تکرار شد. رسوب نهایی به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد فریز خشک شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌صورت پودر پروتئین ذخیره شد.



شکل ۱. (A) پرهای بلدرچین شسته شده، (B) پرهای بلدرچین خشک شده در زیر نور خورشید، (C) محلول حاوی پر و NaOH، (D) محلول حاوی پروتئین کراتین صافی شده و (E) رسوب پروتئین در نقطه ایزوالکتریک

۲-۳- تست بیوره

به منظور تأیید اولیه وجود کراتین ابتدا از تست بیوره دنیای نانو (Biort test) استفاده شد. جهت انجام این تست ۱ میکروگرم پروتئین کراتین در ۱ میلی‌لیتر بافر تریس حل شد و به آن ۱۰ قطره محلول بیوره تجاری اضافه گردید. در لوله

۵	۳۰۰	۷۰۰	۷
۵	۲۰۰	۸۰۰	۸
۵	۱۰۰	۹۰۰	۹
۵	-	۱۰۰۰	۱۰
۵	۱۰۰۰	-	۱۱ (شاهد)

دوم قند گلوکز در ۱ میلی‌لیتر بافر تریس حل کرده و به آن محلول بیوره اضافه شد و در لوله سوم بافر تریس و محلول بیوره با یکدیگر مخلوط شدند. محلول‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شدند. در صورت تغییر رنگ محلول به رنگ بنفش پروتئین در محلول وجود دارد (۲۸).

۲-۴- تست برادفورد

جهت تهیه محلول برادفورد (معرف)، ابتدا ۰/۰۱ گرم پودر کوماسی برلیانت بلو در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ حل شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر اسید ارتوفسفریک ۸۵٪ به محلول اضافه گردید. پس از حل کامل رنگ، محلول با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. جهت حذف ذرات معلق، محلول ۳ بار با کاغذ واتمن شماره یک صافی شد در نتیجه محلولی به رنگ قهوه‌ای روشن بدست آمد. محلول در ظرف تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت تهیه ۱۰ میلی‌لیتر محلول استاندارد، مقدار ۱ میلی‌گرم پروتئین سرم آلبومین گاوی در آب مقطر حل گردید و به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. ۱۱ لوله طبق جدول ۱ تهیه و شماره گذاری گردید. در لوله شماره ۱۲ مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول پروتئین با ۹۰۰ میکرولیتر بافر مخلوط گردید و ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد به محلول ذکر شده اضافه گردید (۲۹). پس از ۵ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش مدل Varian Cary 100 Bio شرکت Agilent Technologies (آمریکا) خوانش شد. سپس نمودار استاندارد ترسیم شد و با کمک این نمودار غلظت نمونه مجهول را بدست آمد.

جدول ۱. میزان محلول‌های تعیین شده برای تست برادفورد

شماره لوله	محلول استاندارد پروتئین (میکرولیتر)	بافر (میکرولیتر)	معرف برادفورد (میکرولیتر)
۱	۱۰۰	۹۰۰	۵
۲	۲۰۰	۸۰۰	۵
۳	۳۰۰	۷۰۰	۵
۴	۴۰۰	۶۰۰	۵
۵	۵۰۰	۵۰۰	۵
۶	۶۰۰	۴۰۰	۵

۲-۵- سنتز نانوکراتین با روش اولتراسونیک

نانوکراتین بر اساس روش‌های گزارش شده در مقالات پیشین (۶، ۱۰، ۲۱) و با استفاده از حمام اولتراسونیک (۲۱) تهیه شد. بدین منظور ابتدا دو محلول ۱ و ۲ به شرح زیر آماده شد.

۱. محلول شماره ۱: مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم پروتئین کراتین در ۲۷/۸ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد.

۲. محلول شماره ۲: مقدار ۳/۶۱ گرم تریس بیس در ۲۷/۸ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید.

دو محلول فوق با یکدیگر مخلوط شدند و سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی با دقت جمع‌آوری شده و رسوب‌ها و ذرات درشت حذف شدند. برای همگن‌سازی و حذف ناخالصی‌های احتمالی، محلول حاوی کراتین به مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک مدل Wisd WiseClean WUC A22H، شرکت Witeg (آلمان) قرار گرفت. پس از این مرحله، جهت نانسازی پروتئین کراتین، محلول همگن و استریل شده به دستگاه اولتراسونیک پروبی مدل UPT 400، شرکت فاپن (ایران) با توان ۳۰۰ وات منتقل شده و به مدت ۱۰ دقیقه تیمار شد. محلول نهایی نانوکراتین به ظروف یک‌بار مصرف با سطح زیاد و عمق کم منتقل شد و در دمای ۵۰- درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت در دستگاه لیوفیلیزاتور خشک گردید. پس از خشک شدن، پودر نانوکراتین حاصل وزن شد و در بسته‌بندی‌های مقاوم به رطوبت، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. میزان محصول نهایی برابر با ۱۰/۳۴ گرم نانوکراتین خشک بود (شکل ۲). به منظور محافظت از ساختار پروتئینی در برابر نور، در تمامی مراحل سنتز، ظرف حاوی محلول پروتئین با فویل آلومینیومی پوشانده شد.

۲-۷- مشخصه‌یابی و بررسی ویژگی‌های کامپوزیت nK/MSNPs

طیف‌های جذب مرئی-فرابنفش محلول‌های حاوی ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکراتین سنتز شده، MSNPs و کامپوزیت nK-MSNPs با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش مدل Varian Cary 100 Bio شرکت Agilent Technologies (آمریکا) در طول موج‌های بین ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر روبش شد. همچنین جهت بررسی میزان پایداری کامپوزیت nK-MSNPs در زمان‌های مختلف از دستگاه طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش استفاده شد. جهت بررسی گروه‌های عاملی موجود در نانوکراتین سنتز شده، MSNPs و نانوکامپوزیت nK-MSNPs (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، طیف‌های عبوری امواج فرسرخ توسط طیف‌سنجی فرسرخ تبدیل فوریه مدل ESP Nexus 870 شرکت ترمو/انیکولت (آمریکا) در محدوده اعداد موج $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ ثبت گردید. جهت تعیین فازهای بلورین (کریستالی) و اندازه‌گیری ثابت‌های کریستالی نانوکراتین و کامپوزیت nK-MSNPs سنتز شده از الگوی پراش اشعه ایکس حاصل از دستگاه پراش سنج پودری اشعه ایکس مدل Seifert 3003 TT (آلمان) با منبع لامپ آند مسی $\text{Cu K}\alpha$ با طول موج 1.5406 \AA آنگستروم استفاده شد. شعاع هیدرودینامیک و پتانسیل زتا نانوکامپوزیت nK-MSNPs با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری پراکندگی نور پویا و زتا پتانسیل آنالایزر شرکت مالورن (انگلیس) در طول موج 657 nm و زاویه ثابت 90° درجه اندازه‌گیری گردید. اعداد حاصل از میانگین‌گیری از ۳ بار آزمایش گزارش شد. جهت تعیین اندازه و توزیع پراکندگی ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر nK-MSNPs، از میکروسکوپ الکترونی عبوری مدل EM-208 شرکت فیلیپس (ساخت هلند) با ولتاژ اعمالی 120 kV کیلوولت برای گسیل اشعه الکترونی استفاده شد.

۲-۸- مطالعات ضد میکروبی

۲-۸-۱- سویه‌های باکتریایی و محیط رشد

سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در این مطالعه شامل *Staphylococcus aureus* گرم مثبت (ATCC



شکل ۲. نانو ذرات کراتین پس از لیوفیلیزه

۲-۶- بیوسنتز نانوکامپوزیت کراتین-سیلیکا مزوپروس (nK-MSNPs)

جهت جلوگیری از کلوخه شدن MSNPs ابتدا ۲۰ میلی‌گرم MSNPs در ۲ میلی‌لیتر بافر تریس ۰/۵ نرمال، با کمک حمام اولتراسونیک به مدت ۱۰ دقیقه حل شد. سپس حجم ۸ میکرولیتر گلو تار آلدئید ۸٪ به محلول اضافه گردید و به مدت ۴۵ دقیقه روی شیکر صفحه‌ای (۶۰ دور در دقیقه) قرار داده شد. سوسپانسیون حاصله، به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد و فاز جامد را سه بار با بافر شستشو داده و مجدد سانتریفیوژ انجام شد. در مرحله آخر نیز قسمت جامد جمع آوری و خشک گردید. با توجه به گزارش‌های پیشین که از رویکردهای مشابه در ترکیب نانوذرات و داروها استفاده کرده‌اند، سنتز نانوکامپوزیت حاضر نیز بر اساس همان اصول انجام شد (۳۰). جهت سنتز نانوکامپوزیت، ۲۰ میلی‌گرم MSNPs تهیه شده در ۲ میلی‌لیتر بافر تریس حل شد و سپس ۵ میلی‌گرم نانوکراتین در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر تریس حل گردید. هر دو محلول با یکدیگر مخلوط شده و محلول حاصله به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر با سرعت (۱۵۹ دور/دقیقه) قرار گرفت. در آخر محلول نانوکامپوزیت تشکیل شده به منظور خشک و جامد شدن در دستگاه خشک‌کن انجمادی به مدت ۷۲ ساعت در دمای -50°C درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نتیجه یک پودر سفید رنگ (حدود ۵ میلی‌گرم) از کامپوزیت سنتزی nK-MSNPs حاصل شد.

اطمینان از دقت اندازه‌گیری و قابلیت بازتولید داده‌ها، با نرم‌افزار Fiji تحلیل گردید.

۲-۹- مطالعات سلولی

۲-۹-۱- رده سلولی و کشت سلول‌ها

رده سلولی فیبروبلاست‌های انسانی hFF (ATCC® No: SCRC-1041) از مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته (تهران، ایران) تهیه شد. فلاسک کشت سلول شامل محیط کشت DMEM، FCS، گرما داده شده (۱۰٪)، استرپتومایسین و آمپی‌سیلین (۵ µg/mL) کشت داده شده و در انکوباتور استریل‌شده با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ نگهداری شدند. سلول‌ها به‌طور منظم از نظر آلودگی میکوپلازما بررسی شدند.

۲-۹-۲- سنجش بقای سلولی با آزمون MTT

سلول‌های hFF در فاز رشد لگاریتمی با استفاده از تریپسین به‌صورت آنزیمی جدا شدند، سپس در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای (با تعداد سلول ۱×۱۰^۴ سلول به ازای هر چاهک) حاوی محیط DMEM، FCS و پنی‌سیلین-استرپتومایسین در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO₂ و رطوبت کافی کشت شدند. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت برای چسبندگی کامل انکوبه شدند. سپس غلظت‌های متفاوت از کامپوزیت nK-MSNPs (۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ µg/mL) به چاهک‌ها افزوده شده و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون به روش رنگ سنجی MTT سنجش شد. بدین منظور ابتدا پودر MTT در بافر PBS حل شد به طوری که غلظت نهایی آن ۵ mg/mL بود. سپس محلول MTT از خلال فیلتر ۰/۵ میکرومولار، فیلتر شد. چهار ساعت قبل از پایان هر انکوباسیون، به هر کدام از چاهک‌های حاوی محیط کشت تازه و کشت داده، ۲۵ میکرولیتر محلول MTT افزوده گردید و سپس برای چهار ساعت دیگر و در شرایط مشابه انکوبه گردیدند. در پایان انکوباسیون به هر کدام از چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر محلولی شامل SDS (۱۰٪) و دی‌متیل فورمامید (DMF) (۵۰٪) اضافه شد و پلیت‌ها برای مدت دو ساعت در شرایطی مشابه با شرایط کشت سلولی نگهداری شدند. آنگاه دانسیته نوری

(25923) و *Escherichia coli* گرم‌منفی (ATCC 25922) بودند که از مرکز رشد فناوری جهاد دانشگاهی (ACECR، کرج، ایران) تهیه شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد در محیط LBB حاوی ۱۵٪ (v/v) گلیسرول به‌عنوان ماده محافظ انجماد نگهداری شدند. برای انجام آزمایش‌ها، سوبیه‌ها با کشت در محیط MHB در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت احیا شدند. سوسپانسیون‌های باکتریایی با تراکم تقریبی ۱۰^۸×۱/۵ CFU/mL تهیه گردید. استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند (OD₆₀₀ ~ ۰/۱) تهیه و بر اساس آن تنظیم شد (۳۱). تلقیح یکنواخت محیط‌های MHA با استفاده از سوآب استریل و سوسپانسیون استاندارد شده برای انجام آزمون‌های ضد میکروبی صورت گرفت.

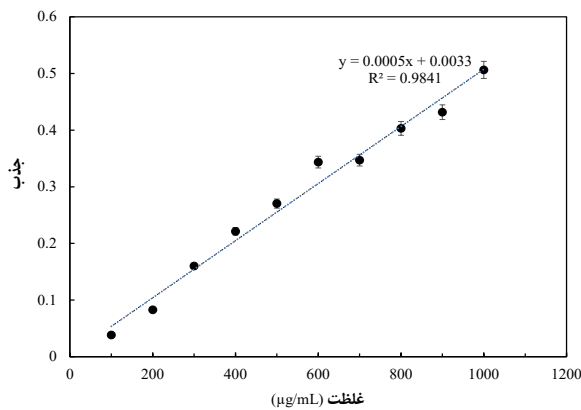
۲-۸-۲- بررسی فعالیت ضدباکتریایی به روش

انتشار دیسک

روش انتشار دیسک یک روش مؤثر و قابل‌اعتماد برای ارزیابی ویژگی‌های ضد میکروبی مواد پلیمری محسوب می‌شود (۳۱). بر این اساس، فعالیت ضد میکروبی کامپوزیت nK-MSNPs از طریق اندازه‌گیری ناحیه بازدارندگی تشکیل‌شده در اطراف دیسک‌های آغشته به نمونه و مطابق با دستورالعمل‌های Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2023) مورد بررسی قرار گرفت (۳۲). به‌طور خلاصه، نمونه‌های آزمون (۱۰ میکروگرم/دیسک) با حل کردن نانوکامپوزیت در محلول PBS استریل و فیلتر شده تهیه شده و سپس بر روی دیسک‌های کاغذی استریل به قطر ۶ میلی‌متر بارگذاری شدند. این دیسک‌های ضد عفونی شده بر روی محیط‌های MHA که قبلاً با سوسپانسیون‌های باکتریایی استاندارد تلقیح شده بودند، قرار داده شدند. PBS استریل به‌عنوان کنترل منفی و جنتامایسین (۱۰ میکروگرم/دیسک) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از پایان دوره انکوباسیون، قطر نواحی بازدارندگی به میلی‌متر با استفاده از کولیس دیجیتال و براساس دستورالعمل‌های CLSI اندازه‌گیری شد و برای

۳-۲- تخمین غلظت پروتئین کراتین استخراج شده از پر بلدرچین با استفاده از روش برادفورد

مکانیسم اصلی روش برادفورد اتصال رنگ کوماسی برلیانت به بلو (Coomassie brilliant blue) در pH اسیدی به باقی مانده (residues) اسید آمینه‌های بازی مانند آرژنین، هیستیدین، فنیل‌آلانین، تریپتوفان و تیروزین در پروتئین‌ها است که این امر منجر به تغییر رنگ معرف برادفورد به رنگ آبی در محلول می‌شود (۳۳). در این روش با استفاده از نمودار استاندارد و میزان جذب نمونه مجهول، غلظت پروتئین مجهول محاسبه می‌گردد. لذا ابتدا غلظت‌های مختلف پروتئین استاندارد تهیه شد و محلول برادفورد به همه غلظت‌ها اضافه گردید سپس مقدار جذب‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانش شد و در نهایت جذب پروتئین مجهول نیز در همین طول موج خوانش گردید (شکل ۴). میزان غلظت پروتئین کراتین استخراج شده ۱۴۸/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد.



شکل ۴. منحنی استاندارد تست برادفورد

۳-۳- نتایج طیف جذبی مرئی-فرا بنفش

طیف جذبی مرئی-فرا بنفش نمونه‌های کراتین استخراج شده از پر بلدرچین، MSNPs nK و نانوکامپوزیت nK-MSNPs در بازه طول موج ۲۰۰-۷۰۰ نانومتر بررسی شد (شکل ۵). میزان جذب اسیدهای آمینه آروماتیک موجود در ساختار پروتئین‌ها نظیر تریپتوفان، تیروزین و فنیل‌آلانین، می‌تواند به‌عنوان شاخصی مناسب برای ارزیابی تغییرات ساختاری پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گیرد. بیشینه جذب در این طول موج‌ها همچنین وابسته به اسکلت ساختاری

محلول درون هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر Multi well Scanning (الایزاید) سنجیده شد. جذب یا دانسیته نوری (OD) تابعی از MTT تبدیل شده به فورمازان است. مقادیر OD گروه‌های مورد مطالعه بر OD گروه‌های کنترل (بدون هیچ گونه تیمار) تقسیم و نتیجه به صورت درصد کنترل بیان گردید.

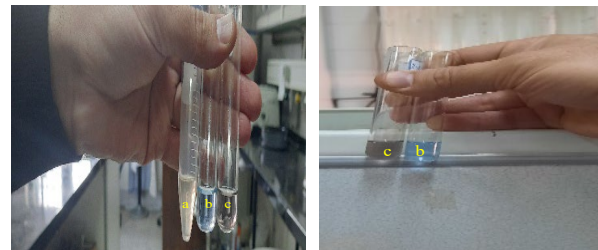
۲-۹- تجزیه و تحلیل آماری

تحلیل آماری با استفاده از آزمون t مستقل در نرم‌افزار GraphPad Prism (نسخه ۸.۴.۳؛ Software Inc, آمریکا) انجام شد. داده‌ها به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) بیان گردیدند. سطح معنی‌دار بودن $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

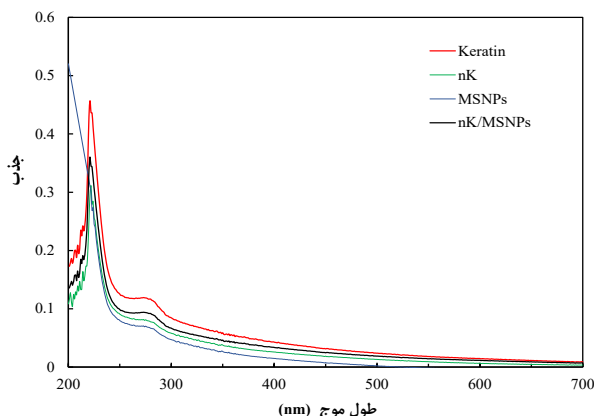
۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی و تفسیر نتایج تست بیوره

براساس گزارش‌ها در تست بیوره، در حضور پروتئین در محلول، رنگ محلول بیوره از آبی به بنفش تغییر می‌یابد که این تغییر رنگ به‌عنوان نشانگر کیفی وجود پروتئین در محلول محسوب می‌شود. شدت رنگ بنفش ایجادشده متناسب با غلظت پروتئین محلول بوده و هرچه مقدار پروتئین بیشتر باشد، رنگ بنفش پررنگ‌تر و واضح‌تر ظاهر می‌شود (۲۸). همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، تغییر رنگ محلول بیوره از آبی به بنفش به‌وضوح رخ داده است، که این امر نشان‌دهنده‌ی استخراج موفق و مؤثر پروتئین کراتین از پر بلدرچین می‌باشد.



شکل ۳. تست بیوره برای تأیید استخراج کراتین از پر بلدرچین. محلول حاوی (a) قند و بیوره، (b) بیوره و (c) پروتئین و بیوره

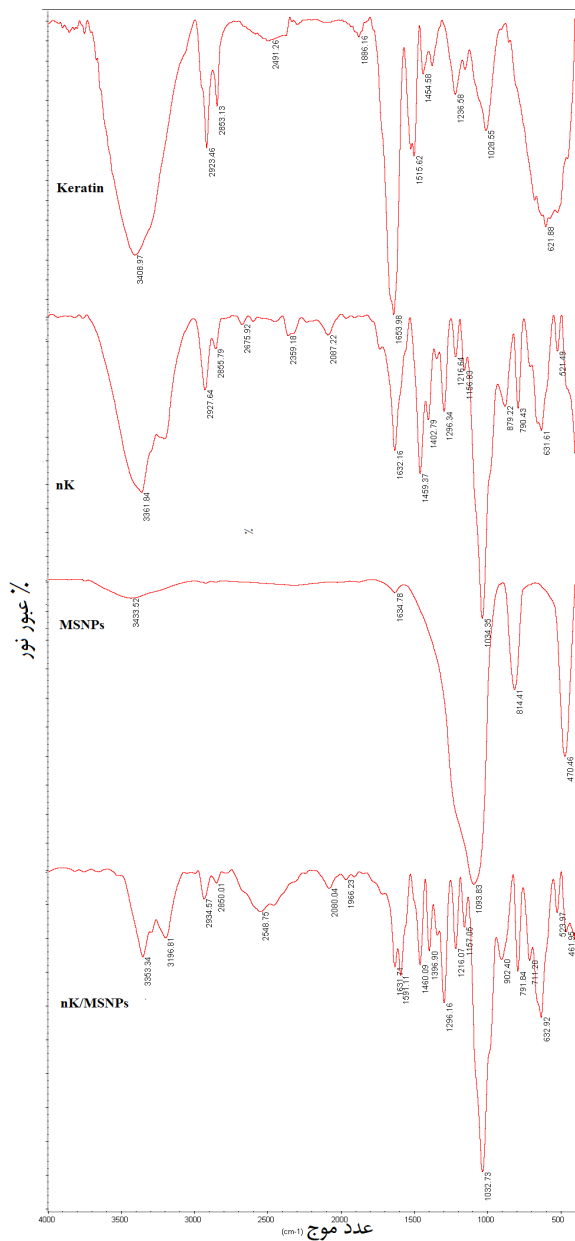


شکل ۵. طیف‌های جذبی مرئی-فرابنفش کراتین استخراج شده از پر بلدرچین، نانوکراتین، MSNPs و نانوکامپوزیت nK/MSNPs

۳-۴- نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

طیف‌سنجی مادون قرمز به منظور بررسی شناسایی گروه‌های عاملی و ساختار شیمیایی کراتین استخراج شده از پر بلدرچین، نانوکراتین، MSNPs، و نانوکامپوزیت nK-MSNPs مورد استفاده قرار گرفت. همانگونه که در شکل ۶ مشاهده می‌شود پیک آمید A مربوط به ارتعاش کششی N-H که مرتبط با پیوندهای هیدروژنی و گروه‌های آمیدی در پروتئین‌ها می‌باشد در نانوکراتین در عدد موج پایین‌تری (3409 cm^{-1}) نسبت به کراتین (3412 cm^{-1}) ظاهر شد. این کاهش در عدد موج حاکی از افزایش برهم‌کنش‌های بین‌مولکولی در ساختار نانوکراتین می‌باشد. پیک آمید B مربوط به ارتعاش کششی C-H معمولاً در محدوده اعداد موج $2853-2928 \text{ cm}^{-1}$ مشاهده می‌شود که در نانوکراتین به عدد موج بالاتر (2928 cm^{-1}) نسبت به کراتین (2923 cm^{-1}) انتقال یافت. این افزایش می‌تواند بیانگر تغییر در زنجیره‌های جانبی و یا آرایش فضایی گروه‌های آلکیلی باشد. باند آمید I مربوط به ارتعاش کششی C=O که مرتبط با ساختارهای ثانویه پروتئین می‌باشد، در نانوکراتین به عدد موج 1637 cm^{-1} انتقال یافت که در مقایسه با کراتین (1654 cm^{-1}) کاهش محسوسی را نشان داد. در پیک آمید II مربوط به ارتعاش خمشی N-H و کششی C-N نیز کاهش عدد موج در نانوکراتین (1459 cm^{-1}) نسبت به کراتین (1516 cm^{-1}) مشاهده گردید (۲۷، ۳۶، ۳۸، ۳۹). این تغییر بازتابی از تغییرات در محیط پیوندی و هندسه مولکولی پروتئین می‌باشد. در پیک آمید III (مربوط به

framework structure) و میکرومحیط (micro-environment) اطراف اسیدهای آمینه آروماتیک پروتئین است (۳۴). طیف جذبی کراتین استخراج‌شده از پر بلدرچین دارای بیشینه جذب در حدود طول موج ۲۲۵ نانومتر است و در محدوده ۲۸۰ نانومتر نیز یک قله ثانویه مشاهده می‌شود که به ترتیب مربوط به جذب پیوندهای پپتیدی ($n \rightarrow \pi^*$) و گروه‌های آروماتیک ($\pi \rightarrow \pi^*$) اسیدهای آمینه است (۳۵). در مطالعه پیشین، بیشینه جذب در طول موج ۲۱۶ نانومتر برای کراتین استخراج‌شده از موی خرگوش گزارش شده است که منطبق بر داده این پژوهش است (۳۵). همچنین گزارش شده است که بیشینه جذب اسیدهای آمینه آروماتیک در کراتین استخراج‌شده از پر جوجه در طول موج ۲۸۰ نانومتر (۳۶) و در کراتین استخراج‌شده از پشم گوسفند در حدود ۲۹۰ نانومتر می‌باشد (۳۷). اختلاف جذبی در نمونه‌های مختلف احتمالاً ناشی از تفاوت در زاویه دوجهی X(C-S-S-C) در باقی‌مانده‌های سیستمی موجود در ساختار کراتین است؛ زیرا این زاویه در پیوندهای دی‌سولفیدی نقش مؤثری در تعیین طول موج و شدت جذب پیوند S-S دارد (۳۷). همانگونه که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، پس از فرآیند سنتز نانو، شدت جذب کاهش یافت اما موقعیت جذب بیشینه حفظ شد. این موضوع نشان می‌دهد که ساختار کروموفورهای حساس به نور (اسیدهای آمینه آروماتیک و پیوندهای پپتیدی) همچنان دست‌نخورده باقی مانده‌اند و فرآیند نانوسازی موجب تخریب ساختار شیمیایی کراتین نشده است. بیشینه جذب قوی MSNPs در طول موج ۲۹۷ نانومتر مشاهده شد که نشان دهنده وجود نانوذرات دی‌اکسید سیلیکون است و با نتایج مطالعات قبلی کاملاً تطابق دارد (۲۴). طیف جذبی نانوکامپوزیت nK-MSNPs نشان‌دهنده ترکیب موفق نانوکراتین با نانوذرات سیلیکا است. وجود قله‌های مشابه با نانوکراتین در محدوده ۲۲۵ و ۲۸۰ نانومتر نشان‌دهنده آن است که کراتین به‌خوبی بر سطح MSNPs بارگذاری شده و ویژگی‌های نوری خود را حفظ کرده است. شدت جذب بالاتر از نانوکراتین و MSNPs به‌تنهایی، نشان‌دهنده هم‌افزایی نوری بین دو فاز آلی و معدنی است.



شکل ۶. طیف‌های مادون قرمز کراتین استخراج شده از پر بلدرچین، نانوکراتین، MSNPs و نانوکامپوزیت nK-MSNPs

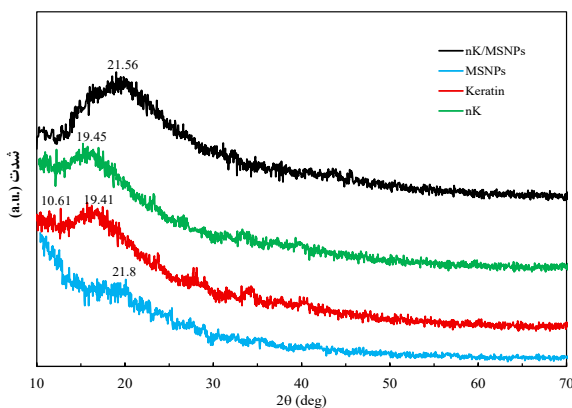
در طیف FT-IR مربوط به MSNPs پیک‌های قابل مشاهده در اعداد موج 470 cm^{-1} و 814 cm^{-1} مربوط به پیوند Si-O و پیک در عدد موج 1039 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی پیوند Si-O-Si می‌باشد. پیک در عدد موج $1634/75$ نیز مربوط به ارتعاشات خمشی H-O-H است

(۴۰). در طیف FT-IR نانوکامپوزیت nK-MSNPs **دنیای نانو**

پیک‌های مربوط به نانوکراتین (مربوط به آمید I, II, A, B) با شدت بیشتری دیده می‌شوند. از طرفی پیک‌های

ارتعاشات C-N و N-H نیز انتقال عدد موج از 1236 cm^{-1} کراتین به 1217 cm^{-1} نانوکراتین مشاهده شد. پیک مربوط به ارتعاشات کششی S=O در نانوکراتین با عدد موج 1034 cm^{-1} و شدت عبور 88.5% مشاهده شد (۲۷)، که نسبت به کراتین با عدد موج 1028 cm^{-1} با 98% شدت عبور تغییر قابل توجهی داشته است. کاهش شدت عبور در نانوکراتین ممکن است ناشی از افزایش تراکم و تعاملات شیمیایی بین گروه‌های سولفونیل در حین فرآیند نانوسازی باشد. عدد موج مرتبط با پیوندهای دی‌سولفیدی (S-S) در نانوکراتین به عدد موج 632 cm^{-1} منتقل شد در حالی که در کراتین در عدد موج 622 cm^{-1} مشاهده گردید. شدت عبور تابش در این باند برای کراتین و نانوکراتین برابر (۹۵٪) بود که نشان‌دهنده پایداری پیوندهای دی‌سولفیدی در طی فرآیند استخراج و نانوسازی است. این نتایج با نتایج مطالعات پیشین کاملاً تطابق داشت (۲۷، ۳۸، ۳۹). به عبارتی نتایج FT-IR حاکی از استخراج کراتین از پر بلدرچین و همچنین نشان‌دهنده حفظ ویژگی‌های ساختاری کراتین پس از فرآیند سنتز نانو است.

مربوط به نانوکراتین سنتز شده حضور دو پیک در 20° - 23° و $9/5^{\circ} \approx 2\theta$ ، با شدت بیشتر و وضوح بالاتر نسبت به کراتین طبیعی نشان‌دهنده بهبود نسبی در بلورینگی و تشکیل ساختارهای نانوبلوری پس از فرایند نانوسازی می‌باشد. این نتایج با مشاهدات پاکدل و همکاران کاملاً تطابق دارد (۴۳). در الگوی پراش نانوکامپوزیت nK-MSNPs پیک نسبتاً مشخص در $21/56^{\circ} \approx 2\theta$ مشاهده می‌شود که مشخصه‌ی مواد آمورف با زمینه سیلیسی یا مقادیر بالای نانوذرات بی‌شکل می‌باشد. این پیک ترکیبی نشان‌دهنده برهم‌کنش موفق نانوکراتین با سطح MSNPs بوده و می‌تواند به دلیل تشکیل پیوندهای هیدروژنی یا الکترواستاتیک بین گروه‌های فعال باشد. شکل گسترده و فاقد نظم نشان‌دهنده حفظ ویژگی آمورف ترکیب نهایی است.



شکل ۷. الگوهای پراش پرتو ایکس X کراتین استخراج شده از پر بلدرچین، نانوکراتین، MSNPs و کامپوزیت nK/MSNPs

۳-۶- نتایج پراکندگی نور پویا و اندازه‌گیری پتانسیل زتا

از تکنیک DLS برای تعیین توزیع اندازه ذرات در محلول‌ها و سوسپانسیون‌ها استفاده می‌شود. در این تکنیک، نور لیزر با ذرات معلق برخورد کرده و تغییرات شدت نور پراکنده‌شده بر اثر حرکت براونی ذرات اندازه‌گیری می‌شود. با استفاده از این داده‌ها، میانگین اندازه هیدرودینامیکی ذرات محاسبه می‌گردد (۴۴). نتایج نشان داد که میانگین اندازه ذرات نانوکراتین سنتز شده $245/4$ نانومتر و شاخص پراکندگی (PDI) برابر با $0/594$ بود. برای نانوکامپوزیت nK-

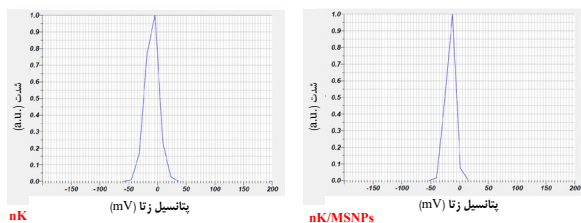
مربوط به MSNPs با شدت کمتری دیده می‌شوند که این امر به احتمال زیاد به دلیل برهم‌کنش آن با نانو پروتئین کراتین می‌باشد. نتایج حاکی از سنتز موفق نانوکامپوزیت nK-MSNPs می‌باشد. ایلدیز و همکاران در پژوهشی بیوفیلمی شامل سیلیس-کلاژن-کراتین پشم-بور را سنتز نمودند و نتایج داده‌های FT-IR آنها شباهت به نتایج پژوهش حاضر داشت (۴۱). ذکر این نکته حائز اهمیت است که در پژوهش ایلدیز و همکاران کراتین از پشم استخراج شده بود و همراه با سیلیس سنتز شده بود حال آنکه در این پژوهش نانوکراتین از کراتین پر بلدرچین سنتز شده و نانوذرات سیلیکا مزوپروس به کار رفته است.

۳-۵- نتایج XRD

به‌منظور بررسی ساختار بلوری و تعیین فازهای موجود در نمونه‌های کراتین، نانوکراتین، MSNPs و نانوکامپوزیت nK-MSNPs بررسی الگوی پراش اشعه X انجام گرفت. نتایج XRD برای نمونه‌ها در محدوده زاویه‌ای 2θ بین 10° تا 70° درجه در شکل ۷ نمایش داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود الگوی پراش در MSNPs دارای یک پیک نسبتاً پهن آمورف در $21/8^{\circ} \approx 2\theta$ است که نشان‌دهنده ساختار آمورف نانوذرات است. این ساختار برای نانو سیلیکا مزوپروس رایج است زیرا فاقد نظم بلوری بلندبرد است. این نتیجه با کارت استاندارد نانو سیلیکا مزوپروس (JCPDS No. 29-0085) منطبق است (۲۴، ۴۰). در الگوی پراش مربوط به کراتین استخراج شده از پر بلدرچین، دو پیک پراش در $19/4^{\circ}$ و $21/56^{\circ} \approx 2\theta$ رویت شد. شدت کم و پهنای پیک نسبتاً زیاد حاکی از بلورینگی پایین یا آمورفی نسبی است. برطبق مطالعات پیشین، پیک اول (ضعیف) مرتبط با ساختارهای هلیکس α و پیک دوم (پهن) مرتبط با ساختارهای β در پروتئین می‌باشد (۲۷، ۳۹، ۴۲). این الگو بیانگر ساختار آمورف و پروتئینی کراتین طبیعی است که به دلیل ماهیت غیرکریستالی آن، فاقد پیک‌های تیز مشخص است. این الگوی پراش مشخصه پروتئین‌ها و ترکیبات زیستی فاقد بلورینگی بالا است. مطالعات پیشین نیز برای کراتین الگوی پراش مشاهده شده را گزارش نموده‌اند (۲۷، ۳۸، ۳۹، ۴۱). در الگوی پراش

کامپوزیت سنتز شده دارای پایداری الکترواستاتیکی نسبی (relatively stable) است (۴۴). در مقایسه با نانوکراتین خالص، کاهش اندازه ذرات و افزایش منفی بودن پتانسیل زتا در کامپوزیت می‌تواند به دلیل جایگیری نانوکراتین در ساختار MSNPs و افزایش برهم‌کنش میان گروه‌های عاملی مرتبط باشد. ساختارهای MSNPs به دلیل دارا بودن منافذ با ابعاد نانومتری، قادر هستند مولکول‌های زیستی را جذب کرده و به صورت منظم درون شبکه سیلیس سازمان‌دهی نمایند. باید توجه داشت که اندازه MSNPs بسیار کوچک (حدود ۶-۲ نانومتر) است و بنابراین افزایش قابل توجهی در اندازه کلی ذرات ایجاد نمی‌شود. در واقع، منافذ MSNPs فضایی برای بارگذاری و نگهداری مواد فراهم می‌کند و سطوح سیلیس نیز باعث جذب و سازماندهی مولکول‌ها می‌گردند.

Calculation Results			
Peak No.	SP Area Ratio	Mean	Electrophoretic Mobility
1	1.00	-16.9 nm	-0.00088 cm ² /Vs
2	---	---	---
3	---	---	---
Zeta Potential (Mean)		-16.9 mV	
Electrophoretic Mobility Mean		-0.00088 cm ² /Vs	

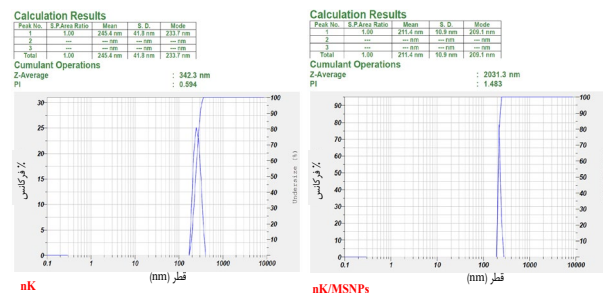


شکل ۹. نتایج اندازه‌گیری پتانسیل زتا برای نانوکراتین و نانوکامپوزیت nK-MSNPs

۳-۷- نتایج میکروسکوپ الکترونی عبوری

به منظور بررسی دقیق‌تر مورفولوژی و اندازه ذرات در نانوکراتین و نانوکامپوزیت nK-MSNPs تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری مورد تحلیل قرار گرفتند (شکل ۱۰). پیش از تصویربرداری، نمونه‌ها با استفاده از محلول ۲٪ استات اورانیوم رنگ‌آمیزی شدند تا کنتراست مناسب برای مشاهده ساختارها ایجاد گردد. در تصاویر مربوط به نانوکراتین خالص، ذرات به صورت واضح به صورت تجمع‌یافته (agglomerated) مشاهده می‌شوند. مورفولوژی ذرات عمدتاً نامنظم، با لبه‌های زاویه‌دار یا دندان‌های است و ساختار کاملاً کروی در آن‌ها دیده نمی‌شود. اگرچه برخی از ذرات دارای اندازه کوچکتر هستند،

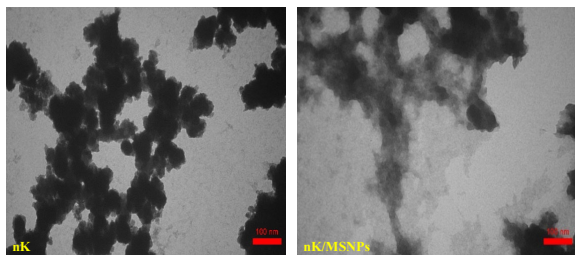
MSNPs میانگین اندازه ذرات ۲۱۱/۴ نانومتر و PDI برابر با ۱/۴۸ بدست آمد (شکل ۸). شاخص پراکندگی ذرات معیاری برای ارزیابی یکنواختی نمونه بر اساس اندازه آن است. از آنجا که مقدار PDI در هر دو نمونه بیش از ۰/۴ است، می‌توان نتیجه گرفت که هر دو سیستم نانوذره‌ای از نظر اندازه، پراکندگی نسبتاً بالایی دارند که می‌تواند نشانگر وجود طیفی از ذرات با اندازه‌های مختلف باشد (۴۴). پتانسیل در صفحه لغزشی/برشی (slipping/shear plane) یک ذره کلئیدی که تحت میدان الکتریکی حرکت می‌کند، پتانسیل زتا نام دارد. پتانسیل زتا یکی از شاخص‌های کلیدی در بررسی پایداری الکترواستاتیکی سوسپانسیون‌های نانوذره‌ای به‌شمار می‌رود. به طور کلی، هر میزان مقدار پتانسیل زتا از نظر عددی (مثبت یا منفی) بالاتر باشد، نیروی دافعه بین ذرات بیشتر شده و احتمال تجمع یا آگلومراسیون کاهش می‌یابد، که این موضوع بیانگر پایداری بیشتر نانو سامانه است (Bhattacharjee, 2016).



شکل ۸. نمودار توزیع اندازه ذرات برای نانوکراتین و نانوکامپوزیت nK-MSNPs

در این مطالعه، مقدار پتانسیل زتا نانوکراتین حدود $-9/6 \text{ mV}$ و میانگین تحرک الکتروفورتیک $0/00005 \text{ cm}^2/\text{Vs}$ به دست آمد (شکل ۹). این مقدار نشان‌دهنده پایداری نسبتاً ضعیف نانوکراتین است، زیرا به طور معمول مقادیر پتانسیل زتا کمتر از $\pm 10 \text{ mV}$ نشانگر ناپایداری سیستم (highly unstable) می‌باشد (Bhattacharjee, 2016). در مقابل، پتانسیل زتای کامپوزیت nK-MSNPs برابر با $-16/9 \text{ mV}$ و میانگین تحرک الکتروفورتیک $0/000088 \text{ cm}^2/\text{Vs}$ بدست آمد. با توجه به اینکه پتانسیل زتا در این کامپوزیت به محدوده $\pm 20 \text{ mV}$ تا $\pm 10 \text{ mV}$ نزدیک است، می‌توان نتیجه گرفت که

در DLS، میانگین شدت نوری کل جمعیت ذرات در حالت محلول اندازه‌گیری می‌شود و حتی مقدار اندکی تجمع می‌تواند اندازه متوسط را به‌طور چشمگیر افزایش دهد، در حالی که در TEM تنها ذرات خشک‌شده مشاهده می‌شوند و احتمالاً تجمع‌های بزرگ‌تر در فرآیند آماده‌سازی حذف یا نادیده گرفته می‌شوند. همچنین، DLS ذرات را در محیط آبی و همراه با لایه هیدراته و بار سطحی بررسی می‌کند، در حالی که TEM در شرایط خلأ و پس از خشک‌کردن نمونه انجام می‌شود که می‌تواند باعث جمع‌شدگی یا تغییر شکل ذرات گردد. علاوه بر این، DLS پوشش‌های سطحی و گروه‌های نرم (مانند لایه‌های پروتئینی) را در محاسبه قطر لحاظ می‌کند، اما TEM تنها هسته با دانسیته الکترونی بالا را نشان می‌دهد. نهایتاً، چون DLS بر اساس مدل کروی و توزیع شدت محاسبه می‌شود، در حضور ذرات ناهمگن یا غیرکروی اختلاف بیشتری نسبت به اندازه‌گیری‌های مستقیم TEM مشاهده خواهد شد (۴۴، ۴۵).



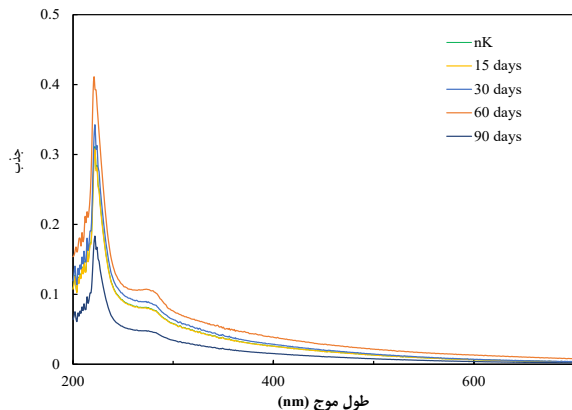
شکل ۱۰. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوکراتین و کامپوزیت nK/MSNPs

۳-۸- نتایج بررسی پایداری نانو کامپوزیت

جهت بررسی پایداری نانو کامپوزیت nK-MSNPs، طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش در بازه‌ی زمانی ۱۵ تا ۹۰ روز پس از سنتز و نگهداری در یخچال انجام شد (شکل ۱۱). نتایج نشان داد که در بازه ۱۵ تا ۳۰ روز تغییر محسوسی در شدت جذب مشاهده نشد و نمونه پایدار باقی ماند. در روز ۶۰ شدت جذب افزایش داشت که احتمالاً به دلیل بازآرایی سطحی یا تجمعات موقت ذرات بوده است. اما در روز ۹۰ شدت جذب کاهش یافت و حتی کمتر از مقادیر ۱۵ و ۳۰ روز شد. این رفتار نشان می‌دهد که پس از یک نوسان گذرا در میانه دوره نگهداری، بخش قابل توجهی از ذرات ته‌نشین

اما به‌صورت کیفی می‌توان گفت ابعاد اکثر ذرات منفرد در بازه‌ی بین ۲۰ تا ۵۰ نانومتر قرار دارد. با این حال، کلوخه‌ها یا خوشه‌های تجمع‌یافته به‌مراتب ابعاد بزرگ‌تری داشته و نشان‌دهنده تمایل زیاد به آگلومراسیون می‌باشند. زمینه تصویر نسبتاً یکنواخت است اما وجود توده‌های تیره‌رنگ با چگالی بالا در آن قابل مشاهده است، که ناشی از تجمع شدید ذرات و پراکندگی ضعیف آن‌ها است. در مقابل، در تصاویر TEM مربوط به کامپوزیت nK-MSNPs، ذرات به‌صورت پراکنده‌تر و منسجم‌تر در زمینه تصویر توزیع شده‌اند و میزان تجمع به‌طور محسوسی کاهش یافته است. ساختار کامپوزیت بازتر، شاخه‌ای‌تر و یکنواخت‌تر از نمونه خالص نانوکراتین بوده و زمینه روشن‌تر تصویر نیز نشان‌دهنده کاهش چگالی موضعی ذرات و بهبود توزیع آن‌ها می‌باشد. این تفاوت‌ها بیانگر آن است که افزودن نانوذرات سیلیکا منجر به بهبود چشمگیر در پراکندگی ذرات کراتین شده است. احتمالاً، نانو سیلیکا با ایفای نقش به‌عنوان عامل پایدارکننده ساختاری (reinforcing agent) و از طریق برهم‌کنش‌های سطحی، ممانعت فضایی و ایجاد بستر مناسب برای بارگذاری کراتین در ساختار مزوپوری خود، از تجمع مجدد ذرات جلوگیری کرده و در نتیجه موجب افزایش پایداری مورفولوژیکی کامپوزیت گردیده است. همچنین، وجود نواحی متخلخل و سطح فعال بالا در ساختار MSNPs می‌تواند به تنظیم بهتر توزیع فضایی ذرات کراتین در سامانه منجر شود. همانگونه که مشاهده می‌گردد میانگین قطر کامپوزیت nK-MSNPs در نتایج DLS و TEM یکسان به‌دست نیامد. این اختلاف به دلیل تفاوت ماهیت دو روش اندازه‌گیری است. در تکنیک DLS، ذرات در محیط کلوئیدی و حالت تعلیق بررسی می‌شوند و آنچه گزارش می‌شود قطر هیدرودینامیک است که شامل هسته ذره به‌همراه لایه هیدراته، گروه‌های سطحی و هرگونه تجمع موقت (agglomeration) است. در مقابل، TEM تصویر ذرات خشک‌شده و فاقد لایه‌های هیدراته را ارائه می‌دهد و تنها نواحی با دانسیته‌ی الکترونی بالا را نشان می‌دهد. بنابراین، مشاهده اندازه بزرگ‌تر در DLS نسبت به TEM پدیده‌ای طبیعی و در مشاهدات دیگر پژوهشگران نیز گزارش شده است (۴۴). افزون بر آن

یا بازاریابی شده‌اند و سیستم به یک حالت پایدارتر با جذب کمتر رسیده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نانوکامپوزیت طی ۹۰ روز از نظر شیمیایی پایدار بوده، هرچند کاهش جذب در پایان دوره بیانگر تغییر در نحوه‌ی پراکندگی ذرات است (۴۶).

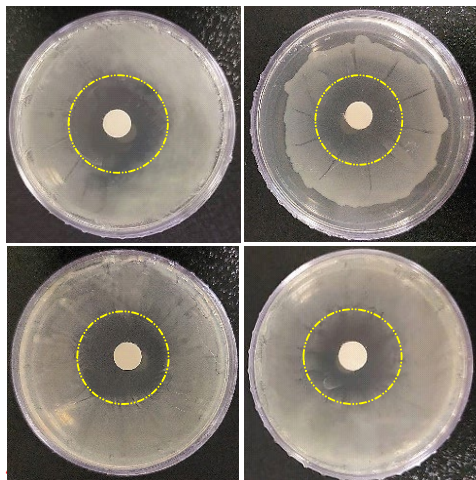


شکل ۱۱. طیف‌های جذبی مرئی-فرابنفش نانوکامپوزیت nK/MSNPs در بازه‌ی زمانی ۱۵ تا ۹۰ روز

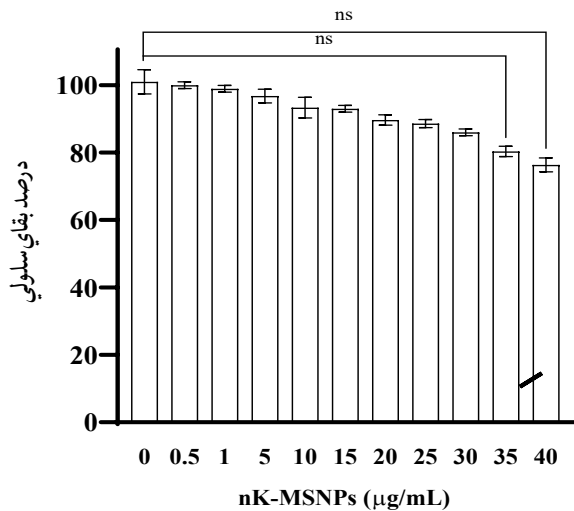
۳-۹- نتایج ارزیابی خواص ضدباکتری

برای ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نانوکامپوزیت nK-MSNPs، آزمون انتشار دیسک علیه دو گونه باکتریایی *S. aureus* و *E. coli* انجام شد. مطابق با نتایج ارائه‌شده در شکل ۱۱، نانوکامپوزیت nK/MSNPs اثر ضد میکروبی قابل توجهی از خود نشان داد. قطر ناحیه بازدارندگی برای *S. aureus* برابر با $22/8 \pm 0/5$ میلی‌متر و برای *E. coli* معادل $20/2 \pm 0/4$ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. اگرچه این مقادیر اندکی کمتر از نتایج به‌دست‌آمده برای آنتی‌بیوتیک مرجع جنتامایسین بودند (به ترتیب برای *S. aureus* $24/0 \pm 0/4$ میلی‌متر و برای *E. coli* $24/3 \pm 0/5$ میلی‌متر)، اما اختلاف مشاهده‌شده از نظر آماری معنادار بود ($P < 0.05$) که نشان‌دهنده‌ی فعالیت ضدباکتریایی مؤثر نانوکامپوزیت nK-MSNPs است. مطالعات پیشین نیز خواص ضد میکروبی ترکیبات مبتنی بر کراتین را گزارش کرده‌اند. به‌طور مثال، اثرگذاری نانوکراتین همراه با یون‌های فلزی مانند روی، نقره و مس در مهار رشد *E. coli* مشاهده شده است (۴۷). همچنین، نانوکامپوزیت مس-کراتین در برابر سویه‌های مقاوم دارویی *E. coli*

همان‌گونه که در نتایج این پژوهش نیز مشاهده شد، نانوکامپوزیت nK-MSNPs قادر است هر دو نوع باکتری گرم‌مثبت و گرم‌منفی را به‌طور مؤثری مهار کند. حساسیت بالاتر *S. aureus* ممکن است ناشی از ساختار نسبتاً ضخیم و نفوذپذیر لایه پپتیدوگلیکان در دیواره سلولی آن باشد که امکان برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی با ذرات دارای بار منفی (پتانسیل زتا: $-16/9$ میلی‌ولت) را فراهم می‌سازد. در مقابل، باکتری‌های گرم‌منفی مانند *E. coli* به‌دلیل برخورداری از غشای خارجی غنی از لیپوپلی‌ساکارید، مقاومت ساختاری بیشتری در برابر این نوع برهم‌کنش‌ها دارند (۴۸). با این حال، مکانیسم‌های غیرالکترواستاتیکی همچون جذب فیزیکی، نیروهای واندروالس، و ایجاد اختلال در عملکرد کانال‌های یونی ممکن است در بروز اثرات ضد میکروبی مشاهده‌شده علیه باکتری‌های گرم‌منفی نیز نقش داشته باشند. این یافته‌ها نشان می‌دهند که نانوکامپوزیت nK-MSNPs می‌تواند به‌عنوان یک عامل ضد میکروبی مؤثر در کاربردهای زیست‌پزشکی، به‌ویژه در حوزه‌هایی مانند پوشش‌های ضد میکروبی به کار رود.



شکل ۱۱. ارزیابی فعالیت ضد میکروبی nK-MSNPs علیه *S. aureus* و *E. coli* با استفاده از روش انتشار دیسک. جنتامایسین به‌عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار



شکل ۱۲. بررسی زنده‌مانی سلول‌های hFF پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوکامپوزیت nK-MSNPs به روش MTT. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند. *اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل ($p < 0.05$).

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، با هدف توسعه یک نانوسامانه زیست‌پایه مؤثر، ابتدا پروتئین کراتین از پر بلدرچین استخراج شد و با استفاده از روش اولتراسونیک به نانوکراتین تبدیل گردید. به منظور بهبود خواص عملکردی و پایداری ذرات، نانوکراتین بر روی نانوذرات سیلیکای مزوپوروس بارگذاری کامپوزیت nK-MSNPs سنتز شد. نتایج طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش حضور کروموفورهای پروتئینی نظیر پیوندهای پپتیدی و اسیدهای آمینه آروماتیک را در طول موج‌های ۲۲۵ و ۲۸۰ نانومتر تأیید کرد. حفظ این قله‌ها پس از فرآیند نانوکردن و بارگذاری، نشان‌دهنده پایداری ساختار شیمیایی کراتین در نانوسامانه نهایی بود. الگوی پراش پرتو ایکس نشان داد که ساختار اولیه کراتین نیمه‌بلورین بوده و پس از نانوکردن، با حذف پیک ۱۰/۶۱ و تضعیف پیک ۱۹/۴۱ درجه، به ساختار آمورف تغییر یافت. در نانوکامپوزیت nK-MSNPs نیز پیک پهن در زاویه ۲۱/۵۶ درجه تأییدکننده ماهیت آمورف ترکیب و تلفیق موفق دو فاز کراتین و سیلیکا بود. تحلیل توزیع اندازه ذرات با DLS نشان داد که میانگین اندازه ذرات نانوکراتین ۲۴۵/۴ نانومتر با شاخص پراکندگی برابر با ۰/۵۹۴ است، در

گرفت. نواحی بازدارندگی با دایره‌های خطچین مشخص شده‌اند. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ($n = 3$) ارائه شده‌اند.

۳-۱۰- نتایج بقای سلولی

برای ارزیابی سمیت سلولی نانوکامپوزیت nK-MSNPs، آزمون MTT بر روی سلول‌های hFF پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های ۰.۵-۴۰ $\mu\text{g/mL}$ انجام شد (شکل ۱۲). نتایج نشان داد که میزان زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست انسانی در تمام غلظت‌های آزمون‌شده بالاتر از ۸۰٪ باقی مانده و کاهش معنادار آماری مشاهده نشد (ns). به ویژه در غلظت‌های کمتر از ۱۰ $\mu\text{g/mL}$ بقاء سلولی بیش از ۹۵٪ بود. تنها در غلظت ۴۰ $\mu\text{g/mL}$ میزان بقاء سلولی به کمتر از ۸۰٪ رسید. اما نتایج آنالیز آماری تفاوت معنی‌داری نسبت به کنترل را نشان نداد. این نتایج بیانگر آن است که نانوکامپوزیت nK-MSNPs در محدوده‌ی غلظت‌های مورد استفاده از سازگاری زیستی مناسبی برخوردار بوده و فاقد سمیت سلولی قابل توجه بر روی hFF cells است. این نتایج همسو با گزارش‌های پیشین در زمینه نانوذرات کراتین‌پایه است؛ برای نمونه، در مطالعه‌ای بر روی نانوذرات کراتین-تانیک اسید بارگذاری‌شده با دوکسوروبیسین، اثرات سمی تنها بر سلول‌های سرطانی A549 مشاهده شد، در حالی که سلول‌های نرمال فاقد کاهش معنی‌دار در بقاء سلولی بودند (۲۲). همچنین در سامانه‌ی دارورسانی Cu-MOFs@Keratin نشان داده شد که پوشش کراتین می‌تواند سمیت نانوذرات فلزی بر سلول‌های نرمال را کاهش داده و در عین حال تجمع انتخابی در بافت توموری را افزایش دهد (۴۹). مشابه این نتایج، داده‌های حاضر نیز نقش نانوکراتین را به عنوان یک ترکیب زیست‌سازگار در ارتقاء ایمنی و پایداری نانوکامپوزیت nK-MSNPs تأیید می‌کند.

نظیر پوشش‌های ضد عفونی کننده و مهندسی بافت به شمار رود.

تقدیر و تشکر

از خانم فاطمه شریفی به خاطر همکاری ارزشمندشان در انجام تست‌های بقای سلولی و میکروبی صمیمانه قدر دانی می‌شود. همچنین از همکاری کارشناسان محترم مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی که در پیشبرد این پژوهش یاری‌رسان بودند، تشکر می‌گردد.

تعارض در منافع

نویسندگان هیچگونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

۵. منابع

1. Todros S, Todesco M, Bagno A. Biomaterials and their biomedical applications: From replacement to regeneration. Processes. 2021;9(11):1949. [10.3390/pr9111949](https://doi.org/10.3390/pr9111949)
2. Bhari R, Kaur M, Sarup Singh R. Chicken feather waste hydrolysate as a superior biofertilizer in agroindustry. Current Microbiology. 2021;78(6):2212-30. [10.1007/s00284-021-02491-z](https://doi.org/10.1007/s00284-021-02491-z)
3. Martella E, Ferroni C, Guerrini A, Ballestri M, Columbaro M, Santi S, et al. Functionalized keratin as nanotechnology-based drug delivery system for the pharmacological treatment of osteosarcoma. International journal of molecular sciences. 2018;19(11):3670. [10.3390/ijms19113670](https://doi.org/10.3390/ijms19113670)
4. Kamarudin NB, Sharma S, Gupta A, Kee CG, Chik SMSBT, Gupta R. Statistical investigation of extraction parameters of keratin from chicken feather using Design-Expert. 3 Biotech. 2017;7:1-9. [10.1007/s13205-017-0767-9](https://doi.org/10.1007/s13205-017-0767-9)
5. Konop M, Czuwara J, Kłodzińska E, Laskowska AK, Sulejczak D, Damps T, et al. Evaluation of keratin biomaterial containing silver nanoparticles as a potential wound dressing in full-thickness skin wound model in diabetic mice. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. 2020;14(2):334-46. [0.1002/term.2998](https://doi.org/10.1002/term.2998)

حالی که اندازه ذرات در نانو کامپوزیت nK-MSNP به ۲۱۱/۴ نانومتر کاهش یافت، ولی PDI به ۱/۴۸ افزایش پیدا کرد. کاهش اندازه ذرات و افزایش PDI در کامپوزیت ممکن است ناشی از ناهمگنی در فرآیند بارگذاری نانوکراتین بر سطح سیلیکا باشد. نتایج آنالیز پتانسیل زتا نیز نشان داد که نانوکراتین دارای زتای ۹/۶- میلی‌ولت میلی‌ولت و کامپوزیت دارای مقدار بهبود یافته ۱۶/۹- میلی‌ولت است که بهبود پایداری الکترواستاتیکی نانوکامپوزیت را تأیید می‌کند. نقش گروه‌های سیلانول سیلیکا در افزایش بار سطحی منفی و دافعه بین ذرات، از دلایل اصلی این بهبود است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی توزیع ذرات نانوکراتین را به شکل توده‌های نامنظم و متراکم نشان دادند، در حالی که در نانو کامپوزیت nK-MSNPs ساختاری بازتر، ذرات پراکنده‌تر و تجمع کمتر مشاهده شد. اندازه کیفی ذرات منفرد در بازه ۲۰ تا ۵۰ نانومتر تخمین زده شد. همچنین بررسی فعالیت ضدباکتریایی نانو کامپوزیت با استفاده از آزمون انتشار دیسک نشان داد که نانو کامپوزیت nK-MSNPs در برابر هر دو سویه *E. coli* و *S. aureus* اثر مهاری معنادار و قابل توجهی دارد و نشان دهنده‌ی توان ضدباکتریایی بالای این نانو کامپوزیت است. افزون بر این، آزمون پایداری با طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش نشان داد که نانو کامپوزیت سنتز شده در بازه‌ی ۹۰ روزه از نظر شیمیایی پایدار باقی می‌ماند، هرچند تغییرات جزئی در شدت جذب در روزهای پایانی بیانگر بازآرایی یا ته‌نشینی بخشی از ذرات است. از سوی دیگر، نتایج بررسی سمیت سلولی بر روی فیبروبلاست‌های انسانی نشان داد نانو کامپوزیت nK-MSNPs حتی در غلظت‌های نسبتاً بالا (۴۰ $\mu\text{g/mL}$) کاهش معناداری در بقاء سلولی ایجاد نمی‌کند و از سازگاری زیستی مطلوبی برخوردار است. در مجموع، یافته‌های این پژوهش نشان داد که استفاده از نانوذرات سیلیکای مزوپوروس به‌عنوان بستر، منجر به بهبود پراکندگی، افزایش پایداری، ارتقاء ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حفظ زیست‌سازگاری نانوکراتین شده است. بنابراین، نانو کامپوزیت nK-MSNPs به‌دلیل عملکرد ساختاری پایدار، زیست‌سازگاری مناسب و خواص ضدباکتریایی مؤثر، می‌تواند گزینه‌ای امیدبخش برای کاربردهای زیست‌پزشکی



14. Sarma A. Biological importance and pharmaceutical significance of keratin: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;219:395-413. [10.1016/j.ijbiomac.2022.08.002](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.002)
15. Han X, Wang L, Du J, Dou J, Yuan J, Shen J. Keratin-dopamine conjugate nanoparticles as pH/GSH dual responsive drug carriers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2020;31(18):2318-30. [10.1080/09205063.2020.1803182](https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1803182)
16. de Q. Souza GE, Burin GR, de Muniz GI, Alves HJ. Valorization of feather waste in Brazil: structure, methods of extraction, and applications of feather keratin. *Environmental Science and Pollution Research*. 2023;30(14):39558-67. [10.1007/s11356-023-25788-x](https://doi.org/10.1007/s11356-023-25788-x)
17. Yilma KT, Tesfaye T, Enawgaw H, Ayele M, Limeneh DY, Gibril M, et al. Optimizing the Extraction of Keratin from Cattle Hoof Using Central Composite Design. *Advances in Materials Science and Engineering*. 2022;2022(1):4866467. [10.1155/2022/4866467](https://doi.org/10.1155/2022/4866467)
18. Low CT. Human hair keratin and its interaction with metal ions. 2020. [10.32657/10356/142466](https://doi.org/10.32657/10356/142466)
19. Banasaz S, Ferraro V. Keratin from animal by-products: structure, characterization, extraction and application- a review. *Polymers*. 2024;16(14):1999. [10.3390/polym16141999](https://doi.org/10.3390/polym16141999)
20. Giteru SG, Ramsey DH, Hou Y, Cong L, Mohan A, Bekhit AEDA. Wool keratin as a novel alternative protein: A comprehensive review of extraction, purification, nutrition, safety, and food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2023;22(1):643-87. [10.1111/1541-4337.13087](https://doi.org/10.1111/1541-4337.13087)
21. Zhang Y, Zhang N, Wang Q, Wang P, Yu Y. A facile and eco-friendly approach for preparation of microkeratin and nanokeratin by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis. *Ultrasonics*
6. Mousavi SZ, Manteghian M, Shojaosadati SA, Pahlavanzadeh H. Keratin nanoparticles: synthesis and application for Cu (II) removal. *Advances in environmental technology*. 2018;4(2):83-93. [10.22104/aet.2018.2948.1143](https://doi.org/10.22104/aet.2018.2948.1143)
7. Posati T, Listwan A, Sotgiu G, Torreggiani A, Zamboni R, Aluigi A. Keratin/hydroxycalcites hybrid sponges as promising adsorbents for cationic and anionic dyes. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2020;8:68. [10.3389/fbioe.2020.00068](https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00068)
8. Babalola R, Ayeni AO, Joshua PS, Ayoola AA, Isaac UO, Aniediong U, et al. Synthesis of thermal insulator using chicken feather fibre in starch-clay nanocomposites. *Heliyon*. 2020;6(11). [10.1016/j.heliyon.2020.e05384](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05384)
9. Khodaei D, Álvarez C, Mullen AM. Biodegradable packaging materials from animal processing co-products and wastes: An overview. *Polymers*. 2021;13(15):2561. [10.3390/polym13152561](https://doi.org/10.3390/polym13152561)
10. Avancini G, Guerrini A, Ferroni C, Tedesco D, Ballestri M, Columbaro M, et al. Keratin nanoparticles and photodynamic therapy enhance the anticancer stem cells activity of salinomycin. *Materials Science and Engineering: C*. 2021;122:111899. [10.1016/j.msec.2021.111899](https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111899)
11. Guglielmelli A, Rosa P, Contardi M, Prato M, Mangino G, Miglietta S, et al. Biomimetic keratin gold nanoparticle-mediated in vitro photothermal therapy on glioblastoma multiforme. *Nanomedicine*. 2021;16(2):121-38. [10.2217/nnm-2020-0349](https://doi.org/10.2217/nnm-2020-0349)
12. Donato RK, Mija A. Keratin associations with synthetic, biosynthetic and natural polymers: An extensive review. *Polymers*. 2019;12(1):32. [10.3390/polym12010032](https://doi.org/10.3390/polym12010032)
13. Wang X, Shi Z, Zhao Q, Yun Y. Study on the structure and properties of biofunctional keratin from rabbit hair. *Materials*. 2021;14(2):379. [10.3390/ma14020379](https://doi.org/10.3390/ma14020379)



29. Miranda MP. Comparison of the effect of sodium chloride concentration on protein determination: Bradford and Biuret methods. *Analytical Biochemistry*. 2024;687:115450. [10.1016/j.ab.2023.115450](https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115450)
30. Ferroni C, Varchi G. Keratin-based nanoparticles as drug delivery carriers. *Applied Sciences*. 2021;11(20):9417. [10.3390/app11209417](https://doi.org/10.3390/app11209417)
31. Khan MUA, Razaq SIA, Mehboob H, Rehman S, Al-Arjan WS, Amin R. Antibacterial and hemocompatible pH-responsive hydrogel for skin wound healing application: In vitro drug release. *Polymers*. 2021;13(21):3703. [10.3390/polym13213703](https://doi.org/10.3390/polym13213703)
32. Rai S, Dash D, Agarwal N. Introducing the new face of CLSI M100 in 2023: An explanatory review. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2023;46:100432. [10.1016/j.ijmmb.2023.100432](https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2023.100432)
33. Kummari R, Puja R, Bose K. Protein quantitation and detection. *Textbook on cloning, expression and purification of recombinant proteins*: Springer; 2022. p. 279-99. [10.1007/978-981-16-4987-5_11](https://doi.org/10.1007/978-981-16-4987-5_11)
34. Hekmat A, Hatamie S, Saboury AA. The effects of synthesized silver nanowires on the structure and esterase-like activity of human serum albumin and their impacts on human endometrial stem cells. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*. 2024;54(5):399-412. [10.1080/24701556.2022.2034859](https://doi.org/10.1080/24701556.2022.2034859)
35. Ge N, Zhang Y, Zhang H, Cheng L, Shi X, editors. Extraction and characterization of keratin and keratin hydrogels from wasted rabbit hair. *Journal of Physics: Conference Series*; 2021: IOP Publishing. [10.1088/1742-6596/1790/1/012008](https://doi.org/10.1088/1742-6596/1790/1/012008)
36. Banerjee S, Vishakha K, Das S, Sangma PD, Mondal S, Ganguli A. Oxidative stress, DNA, and membranes targets as modes of antibacterial and Sonochemistry. 2020;68:105201. [10.1016/j.ultsonch.2020.105201](https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105201)
22. Du J, Wang L, Han X, Dou J, Yuan J, Shen J. Keratin-tannic acid complex nanoparticles as pH/GSH dual responsive drug carriers for doxorubicin. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2021;32(9):1125-39. [10.1080/09205063.2021.1906074](https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1906074)
23. Pakdel M, Moosavi-Nejad Z, Kermanshahi RK, Hosano N, Qamsari EM, Hosano H. Keratin nanoparticles derived from feather waste for novel antibacterial delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2025;298:139676. [10.1016/j.ijbiomac.2025.139676](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.139676)
24. Biradar AI, Sarvalkar PD, Teli SB, Pawar C, Patil P, Prasad NR. Photocatalytic degradation of dyes using one-step synthesized silica nanoparticles. *Materials Today: Proceedings*. 2021;43:2832-8. [10.1016/j.matpr.2020.11.946](https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.11.946)
25. Hekmat A, Haertlé T, Leblanc RM, Khan HY, Khan RH, Saboury AA. A Review on Interaction of Nanomaterials of Group-XIV (G14) Elements of the Periodic Table with Proteins and DNA: Applications in Biotechnology and Pharmacy. *BioNanoScience*. 2024;14(2):1978-2003. [10.1007/s12668-024-01423-y](https://doi.org/10.1007/s12668-024-01423-y)
26. Nairi V, Medda S, Piludu M, Casula MF, Vallet-Regi M, Monduzzi M, et al. Interactions between bovine serum albumin and mesoporous silica nanoparticles functionalized with biopolymers. *Chemical Engineering Journal*. 2018;340:42-50. [10.1016/j.cej.2018.01.011](https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.011)
27. Maurya SD, Singh A. Extraction and Characterization of Keratin from Waste Broiler Chicken Feathers. *Environmental Protection Research*. 2023:372-81. [10.37256/epr.3220233579](https://doi.org/10.37256/epr.3220233579)
28. Subroto E, Lembong E, Filianty F, Indiarto R, Primalia G, Putri M, et al. The analysis techniques of amino acid and protein in food and agricultural products. *Int J Sci Technol Res*. 2020;9(10):29-36.



Journal of Biological Macromolecules. 2024;259:129162.

[10.1016/j.ijbiomac.2023.129162](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.129162)

43. Pakdel M, Moosavi-Nejad Z, Kermanshahi RK, Hosano H. Self-assembled uniform keratin nanoparticles as building blocks for nanofibrils and nanolayers derived from industrial feather waste. Journal of Cleaner Production. 2022;335:130331.

[10.1016/j.jclepro.2021.130331](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.130331)

44. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential—what they are and what they are not? Journal of controlled release. 2016;235:337-51.

[10.1016/j.jconrel.2016.06.017](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017)

45. Rawle A. Basic of principles of particle-size analysis. Surface coatings international Part A, Coatings journal. 2003;86(2):58-65.

46. Wang X, Zhang Z, Xu H, Li X, Hao X. Preparation of sheep bone collagen peptide-calcium chelate using enzymolysis-fermentation methodology and its structural characterization and stability analysis. RSC advances. 2020;10(20):11624-33.

[10.1039/D0RA00425A](https://doi.org/10.1039/D0RA00425A)

47. Shankar S, Rhim J-W. Eco-friendly antimicrobial nanoparticles of keratin-metal ion complex. Materials Science and Engineering: C. 2019;105:110068.

[10.1016/j.msec.2019.110068](https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110068)

48. Godoy-Gallardo M, Eckhard U, Delgado LM, de Roo Puente YJ, Hoyos-Nogués M, Gil FJ, et al. Antibacterial approaches in tissue engineering using metal ions and nanoparticles: From mechanisms to applications. Bioactive Materials. 2021;6(12):4470-90.

[10.1016/j.bioactmat.2021.04.033](https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.033)

49. Du J, Chen G, Yuan X, Yuan J, Li L. Multi-stimuli responsive Cu-MOFs@Keratin drug delivery system for chemodynamic therapy. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2023;11:1125348.

[10.3389/fbioe.2023.1125348](https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1125348)

antibiofilm activity of facile synthesized biocompatible keratin-copper nanoparticles against multidrug resistant uro-pathogens. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2022;38(2):20.

[10.1007/s11274-021-03187-z](https://doi.org/10.1007/s11274-021-03187-z)

37. Zhang C, Xia L, Zhang J, Liu X, Xu W. Utilization of waste wool fibers for fabrication of wool powders and keratin: A review. Journal of Leather Science and Engineering. 2020;2:1-15. [10.1186/s42825-020-00030-3](https://doi.org/10.1186/s42825-020-00030-3)

38. Pourjavaheri F, Pour SO, Jones OA, Smooker PM, Brkljača R, Sherkat F, et al. Extraction of keratin from waste chicken feathers using sodium sulfide and l-cysteine. Process Biochemistry. 2019;82:205-14.

[10.1016/j.procbio.2019.04.010](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.04.010)

39. Sharma I, Pranaw K, Soni H, Rawat HK, Kango N. Parametrically optimized feather degradation by Bacillus velezensis NCIM 5802 and delineation of keratin hydrolysis by multi-scale analysis for poultry waste management. Scientific Reports. 2022;12(1):17118.

[10.1038/s41598-022-21351-9](https://doi.org/10.1038/s41598-022-21351-9)

40. Elizondo-Villarreal N, Gandara-Martínez E, García-Méndez M, Gracia-Pinilla M, Guzmán-Hernández AM, Castaño VM, et al. Synthesis and characterization of SiO₂ nanoparticles for application as nanoadsorbent to clean wastewater. Coatings. 2024;14(7):919.

[10.3390/coatings14070919](https://doi.org/10.3390/coatings14070919)

41. Yildiz SN, Arslan TS, Arslan YE. Organic-inorganic biohybrid films from wool-keratin/jellyfish-collagen/silica/boron via sol-gel reactions for soft tissue engineering applications. Biomedical Materials. 2024;19(2):025032.

[10.1088/1748-605X/ad2557](https://doi.org/10.1088/1748-605X/ad2557)

42. Sellappan LK, Manoharan S. Fabrication of bioinspired keratin/sodium alginate based biopolymeric mat loaded with herbal drug and green synthesized zinc oxide nanoparticles as a dual drug antimicrobial wound dressing. International



Synthesis and Characterization of Keratin–Mesoporous Silica Nanocomposite Using Keratin Extracted from Quail Feathers: Evaluation of Its Antibacterial Activity and Biocompatibility

Fatemeh Darvishzadeh¹, Azadeh Hekmat^{1*}, Aghdas Banaei²

¹ Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Nanoscience and Biophysics, Research Institute for Applied Sciences, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Abstract

Despite the high potential of nanoproteins and mesoporous silica nanoparticles (MSNPs), few studies have explored the simultaneous integration of these biogenic and inorganic components—particularly using keratin naturally extracted from bird feathers. In this study, keratin was, for the first time, extracted from quail feathers and converted into nanokeratin (nK) via the ultrasonic method. The nK was subsequently loaded onto MSNPs. UV–Vis spectroscopy confirmed the presence of peptide bonds and aromatic amino acids in both nK and the composite (nK–MSNPs). FTIR spectra verified characteristic functional groups of keratin, such as amide I, amide II, and cysteine (S–S) peaks in nK, and Si–O–Si bands at 1100 and 800 cm⁻¹ corresponding to the MSNPs framework in the composite. X-ray diffraction patterns revealed an amorphous structure of nK–MSNPs. The average particle sizes of nK and nK–MSNPs were 245.4 nm and 211.4 nm, respectively, with polydispersity indices of 0.594 and 1.48. The zeta potentials of nK and nK–MSNPs were measured at -9.6 mV and -16.9 mV, respectively, indicating the electrostatic stability of the composite. Electron microscopy images confirmed reduced aggregation in nK–MSNPs compared with pure nK. The nanocomposite remained chemically stable over a 90-day period. Cytotoxicity assessment (MTT assay) using human fibroblast cells (hFF) demonstrated that nK–MSNPs exhibited no significant adverse effects on cell viability even at relatively high concentrations. Antibacterial evaluation showed inhibition zone diameters of 22.8 ± 0.5 mm and 20.2 ± 0.4 mm against *S. aureus* and *E. coli*, respectively, which were statistically significant ($P < 0.05$) and comparable to reference antibiotics. Therefore, nK–MSNPs, featuring a porous structure, long-term stability, biocompatibility, and potent antimicrobial activity, can be considered a promising candidate for biomedical applications.

Keyword: Nanokeratin, Mesoporous Silica Nanoparticles (MSNPs), Nanocomposite, Antibacterial Activity, Quail Feathers,