

Uploading Camel Milk Lactoferrin onto Perflouroctylbromide Nanoparticles and its Effect on the Growth of Osteoblasts Cell Line MG-63

Behnaz Shadan¹,
Saeid Zibaie²,
Noosha Zia-Jahromi³

¹ MSc in Biochemistry, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

² Associate Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO) Mashhad, Iran

³ Assistant Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

(Received August 15, 2016 ; Accepted March 6, 2017)

Abstract

Background and purpose: Osteoporosis is a common disease characterized by low bone mass that can harm health. Lactoferrin increase osteogenesis. PerFlouroctyl Bromide is a neutral particle that used as a drug carier.

Materials and methods: In this study, lactoferrin (LF) of Camel milk were isolated. PFOB-NEP was prepared using an oil-in-water emulsion method (O/W). and then evaluated by The zeta potential measurement methods and tryptophan fluorescence spectroscopy before and after loaded by lactoferrin. The concentrations of 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ of LF were loaded on perflouroctylbromide -NEPs. The effects of standard LF, the LF, and LF loaded on PFOB-NEPs on growth of osteoblasts Cell Line (MG-63) was studied using MTT assay.

Results: The results showed that the LF and the LF loaded on PFOB-NEPs significantly increased Osteoblast cells proliferation. But there was no significant difference between the LF and LF uploaded on PFOB-NEPs ($\alpha < 1\%$). But there were significant differences of growth in different concentrations of lactoferrin relative to each other in both lactoferrin and lactoferrin loaded on nanoparticles ($\alpha < 5\%$).

Conclusion: The results proved that LF of camel milk causes the growth of osteoblasts cells in MG-63 cell lines. It is also possible to load LF on PFOB-NEPs and this nanoparticle could be used as carriers of lactoferrin.

Keywords: osteoporesis, osteoblast, lactoferrin, nanoparticles, PerFlouroctyl Bromide

بارگذاری لاکتوفرین شیر شتر بر روی نانو ذرات پر فلئورو اکتیل برماید و بررسی اثر آن بر رشد سلول های استئوبلاست M G-63

بهناز شادان^۱

سعیدزیبائی^۲

نوشا ضیاء جهرمی^۳

چکیده

سابقه و هدف: پوکی استخوان بیماری بسیار شایع می باشد که می تواند به سلامت ساختاری استخوان آسیب برساند. لاکتوفرین نقش به سزایی در افزایش استخوان زایی دارد. پرفلئورو اکتیل برماید به عنوان نانو ذره خنثی و حامل دارو مورد استفاده قرار می گیرد. هدف از تحقیق حاضر، بارگذاری لاکتوفرین شیر شتر بر روی این نانو ذره و بررسی اثر آن بر رشد سلول های استئوبلاست M G-63 می باشد.

مواد و روش ها: پس از خالص سازی لاکتوفرین شیر شتر، نانو ذرات پرفلئورو اکتیل برماید با استفاده از روش ساخت امولسیون روغن در آب (O/W) تهیه و با روش های اندازه گیری، پتانسیل زتا و طیف سنجی تریپتوفان فلورسانس قبل و بعد از بارگذاری مورد بررسی قرار گرفت. غلظت های ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر لاکتوفرین بر روی نانو ذرات بارگذاری شد و اثر لاکتوفرین بارگذاری شده و بدون بارگذاری و لاکتوفرین استاندارد بر روی سلول های استئوبلاست با استفاده از آزمایش MTT مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که سلول های استئوبلاست در مجاورت با لاکتوفرین بارگذاری نشده و لاکتوفرین پس از بارگذاری توسط PFOB، افزایش رشد داشته اند و این افزایش رشد در مقایسه با هم (به طور کلی در هر سه غلظت نسبت به هم) اختلاف معنی داری ($\alpha < 1\%$) ندارد، اما افزایش رشد در غلظت های مختلف لاکتوفرین نسبت به هم در هر دو مورد لاکتوفرین بارگذاری شده بر روی نانو ذره و لاکتوفرین بدون بارگذاری (اثر غلظت های مختلف نسبت به هم) اختلاف معنی داری ($\alpha < 5\%$) دارد.

استنتاج: لاکتوفرین شیر شتر باعث رشد سلول های استئوبلاست رده MG-63 می شود و امکان بارگذاری آن بر روی نانو ذرات PFOB وجود دارد و از این نانو ذرات می توان به عنوان حامل لاکتوفرین استفاده نمود.

واژه های کلیدی: پوکی استخوان، استئوبلاست، لاکتوفرین، نانو ذرات، پرفلئورو اکتیل برماید

مقدمه

پوکی استخوان یک بیماری مهم است که مشخصه آن کاهش کیفیت ریزساختار استخوانی است و زمینه را برای ایجاد شکستگی ها فراهم کند (۱). تحقیقات در ایران نیز حاکی از آن است که بیش از ۷۰ درصد زنان

مؤلف مسئول: سعید زیبائی - مشهد: سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی E-mail: s.zibae@mrzi.ac.ir

۱. کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲. استاد یار پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق - پایه ۲۲

۳. استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

© تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۶/۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۲/۱۶

بیش تر می شود (۹). نتایج مطالعات فوق نشان داد که لاکتوفرین باعث افزایش رشد سلول‌های استئوبلاست می شود.

تحقیقات پاکنژاد و همکاران در سال ۱۳۸۹، نشان می دهد که با افزایش غلظت لاکتوفرین گاوی، میزان رشد سلول‌ها افزایش یافته است (۱۰). تفاوت موجود در تحقیق فوق می تواند به علت تفاوت در نحوه انجام آزمایش و شرایط *in vivo* و یا شاید به دلیل استفاده از لاکتوفرین استخراج شده از شیر شتر در مطالعه حاضر بوده است. لاکتوفرین شیر شتر حدود ۱۰ برابر بیش تر از شیر گاو بوده و مکان گلیکوزیله شدن آن با لاکتوفرین در حیوانات دیگر متفاوت می باشد (۱۱). در حال حاضر تحقیقات در زمینه نانوذرات، به علت گسترده بودن کاربردهای آن در زمینه پزشکی بسیار اهمیت دارد (۱۲). پرفلوئورواکتیل برماید با دانسیته ۱/۹۳ گرم بر میلی لیتر و جرم مولکولی ۴۹۸/۹۶ یک ترکیب سازگار با شرایط بدن است (۱۳). دو کاربرد مهم پرفلوئورواکتیل برماید در تصویربرداری از بیماری‌ها و هم چنین شواهد قطعی برای تحویل دارو، به اثبات رسیده است (۱۳). Schmieder و همکاران در سال ۲۰۰۵، Soman و همکاران در سال ۲۰۰۸ و Goette و همکاران در سال ۲۰۱۲ از پرفلوئوروکربن‌ها به عنوان ماده‌ای در تصویربرداری مولکولی و به عنوان حامل برخی از داروهای خاص یاد کرده‌اند (۱۴-۱۶). هدف تحقیق حاضر، بارگذاری لاکتوفرین خالص شده از شیر شتر بر روی نانوذره پرفلوئورو اکتیل بروماید و بررسی اثر آن بر رشد سلول‌های استئوبلاست M G-63 به عنوان مدلی برای افزایش تراکم استخوان می باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه که از نوع مطالعه تجربی می باشد، طی سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی واحد شمال شرق کشور انجام گرفت.

و ۵۰ درصد مردان بالای ۵۰ سال به پوکی استخوان مبتلا هستند (۲). امروزه شیر شتر به دلیل داشتن خواص ویژه بیش تر مورد توجه قرار گرفته است. خواص درمانی چشمگیری دارد و در درمان بیماری‌ها مفید واقع شده است. لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۸۰ کیلودالتون و یکی از مهم ترین بیواکتیوهای شیر می باشد (۳) که کاربردهای بالینی و تجاری متنوعی دارد (۴). از جمله کاربردهای لاکتوفرین می توان به فعالیت‌های ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی، ضد انگلی، تمایز و فعال شدن سلول‌های سیستم ایمنی، تقویت پاسخ ایمنی و فعالیت ضد توموری اشاره کرد و نیز به عنوان فاکتور آنابولیک سبب رشد و تمایز سلول‌های استئوبلاست می گردد (۶-۴). خواص بیولوژیکی لاکتوفرین از طریق اتصال آن به گیرنده‌های اختصاصی بر روی سلول‌ها اعمال می گردد (۵). محققان به بررسی خواص این گلیکوپروتئین بر انسان و سایر جانوران پرداخته‌اند.

Palmano و همکاران در سال ۲۰۰۶ به بررسی ساختار لاکتوفرین شیر گاو و اثر آن بر روی سلول‌های استخوان پرداختند و بیان کردند که لاکتوفرین در رشد سلول‌های استئوبلاست و هم چنین در کاهش رشد سلول‌های استئوکلاست اثر دارد (۷).

Naot و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مورد ساختار و عملکرد لاکتوفرین شیر گاو و اثر آن بر استخوان در بدن و شرایط آزمایشگاهی و استفاده از آن برای بهبود سلامت استخوان تحقیق کردند و نتایج آزمایش آن‌ها نشان داد که لاکتوفرین در استخوان در شرایط آزمایشگاهی باعث افزایش بقا و تمایز استئوبلاست و مهار تشکیل استئوکلاست می شود و در زمان کمبود استروژن از کاهش بافت استخوان جلوگیری می کند (۸). Vandrovcova و همکاران اثر سطح اشباع آهن لاکتوفرین شیر گاو در فعالیت‌های استخوان در شرایط آزمایشگاهی و در داخل بدن را بررسی کردند و بیان کردند که رشد سلول‌های استئوبلاست رده Saos-2، در حضور لاکتوفرین

جداسازی و خالص کردن لاکتوفرین

به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط هم زده شد و امولسیون‌های کوچکی تشکیل گردید. در ادامه توسط سونیکاتور با توان ۵۰۰ وات به مدت ۲۰ دقیقه با دستور ۱ دقیقه روشن، ۱ دقیقه خاموش مخلوط هم خورده تا ذرات به سایز نانو درآمدند. در انتها نانو ذرات به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه قرار داده شدند (۱۷).

بارگذاری لاکتوفرین بر روی نانوذرات پرفلوئورواکتیل بروماید

جهت بارگذاری لاکتوفرین بر روی نانوذرات پرفلوئورواکتیل بروماید، یک میلی‌لیتر نانوذره در ظرفی کوچک و استریل ریخته شد. لاکتوفرین شیر شتر در نسبت‌های (۱۰۰، ۵۰، ۲۵ μg/ml) در یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰mM حل گردید و به نانوذره اضافه شد. سپس به مدت ۹۰ دقیقه با سرعت ۷۵۰ دور در دقیقه شیک گردید (۱۷).

تعیین بازده بارگذاری لاکتوفرین بر روی نانوذرات پرفلوئورواکتیل بروماید

جهت تعیین بازده بارگذاری لاکتوفرین بر روی نانوذرات، مخلوط لاکتوفرین - نانوذرات تهیه شده به مدت ۱۰ دقیقه، با دور ۱۰۰۰g در سانتریفیوژ قرار گرفت و مایع روئی از روی نانوذرات برداشته شد تا با روش برادفورد تعیین غلظت گردد و بازده بارگذاری تعیین شود. برای محاسبه بازده بارگذاری از فرمول زیر استفاده شد (۱۷):

$$EE\% = \frac{(C_1 - C_2)}{C_1} \times 100$$

تعیین اندازه ذرات پرفلوئورواکتیل بروماید و ذرات بارگذاری شده توسط لاکتوفرین

جهت تعیین توپوگرافی، مورفولوژی و سایز ذرات نمونه‌های آماده شده قبل و بعد از بارگذاری با لاکتوفرین

۱۰۰ میلی‌لیتر از شیر شتر در دو مرحله با دور ۸^۳ و ۴۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و از کاغذ صافی واتمن شماره ۷ عبور داده شد. سپس در اولترا سانتریفیوژ، به مدت ۳۰ دقیقه و با دور ۲۵۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. جهت خالص‌سازی لاکتوفرین از رزین CM sephadex C-50 استفاده گردید. عمل متعادل سازی رزین‌ها با بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار انجام و به منظور رهاسازی از بافر فسفات با درصد‌های مختلف نمک (از ۰/۱ تا ۱ مولار) استفاده شد. جهت تعیین خلوص پروتئین و مشخص کردن محدوده وزن مولکولی آن، از الکتروفورز پلی‌آکریل‌آمید (۱۵ درصد) سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) همراه با رنگ‌آمیزی نیرات نقره استفاده گردید. جهت سنجش میزان پروتئین از آزمایش برادفورد با استفاده از تهیه منحنی استاندارد توسط غلظت‌های مختلف سرم آلبومین گاوی و تعیین جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر استفاده شد. سپس جهت شناسایی لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز از آزمایش رنگ سنجی توسط TMB^۱ استفاده گردید (۱۳).

تهیه نانوذرات

آماده سازی نانوذرات

۱۹۴ میلی‌گرم لسیتین و ۸ میلی‌گرم DPPE^۲ را در ۷ میلی‌لیتر آب دیونایز استریل حل نموده و با سرعت ۷۰۰ دور در دقیقه با استفاده از هم‌زن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه هم زده می‌شود، پس از به دست آمدن مخلوط یکنواخت، در حمام آب گرم با دمای ۷۰ درجه قرار داده شد. ۲ میلی‌لیتر پرفلوئورواکتیل بروماید به مخلوط سورفاکتانت در حال هم‌زدن افزوده شد و ۵ دقیقه هم‌زدن ادامه یافت. در ادامه در حین هم‌زدن، حجم مخلوط توسط آب دیونایز استریل به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس توسط هم‌زن اولتراتورکس، ۱۲۰۰۰g

1. Tetramethylbenzidine-3,3',5,5'

2. 1,2-Bis(diphenylphosphino)ethane

۲- اثر غلظت‌های مختلف (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) لاکتوفرین بارگذاری شده بر روی سلول‌های پرفلوئورواکتیل بروماید و لاکتوفرین (شیر شتر) به تنهایی و لاکتوفرین استاندارد (لاکتوفرین شیر گاو، جهت مقایسه اثر بر روی سلول) در ۳ تکرار و از هر شاهد (کنترل مثبت جهت رشد سلول‌ها به طور عادی در محیط کشت و کنترل نانوذرات جهت کنترل بررسی اثر نانوذرات بر کشت سلولی) سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت، آزمایش MTT انجام گردید. ۳- ابتدا سلول‌های موجود در پلیت، توسط PBS در ۳ مرحله شستشو داده شدند. سپس به هر خانه ۲۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد و پلیت به مدت ۴ ساعت در شرایط تاریکی در انکوباتور قرار گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر DMSO داخل همه چاهک‌های پلیت اضافه و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه شیک گردید. سپس میزان جذب نوری در طول موج‌های ۴۹۰ و ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج حاصل از بررسی آماری به روش آزمایشات فاکتریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار با استفاده از نرم افزار MSTATC انجام گردید و میانگین تیمارها به روش دانکن مقایسه شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از خالص سازی لاکتوفرین

نتایج حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی

تکنیک کروماتوگرافی تعویض یونی به منظور جداسازی لاکتوفرین شیر شتر انجام شد. فراکسیون‌های به دست آمده با گرادیان‌های مختلف (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹، ۱) در لوله‌های آزمایش استریل جمع‌آوری شدند.

از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده گردید. جهت انجام این آزمایش ابتدا نانوذرات خشک و با یک لایه نازک از ترکیب فلزات طلا/پالادیوم پوشش داده شدند و سپس عکس‌برداری صورت گرفت (۱۷).

اندازه‌گیری پتانسیل زتای نانوذرات بارگذاری شده توسط لاکتوفرین

جهت تایید بارگذاری لاکتوفرین به نانوذرات و تعیین پایداری محلول به دست آمده، پتانسیل زتای نانومولسیون‌های تهیه شده و هم‌چنین نانومولسیون‌های حامل لاکتوفرین توسط دستگاه تعیین پتانسیل زتا (CAD Instruments, France) اندازه‌گیری شد (۱۷).

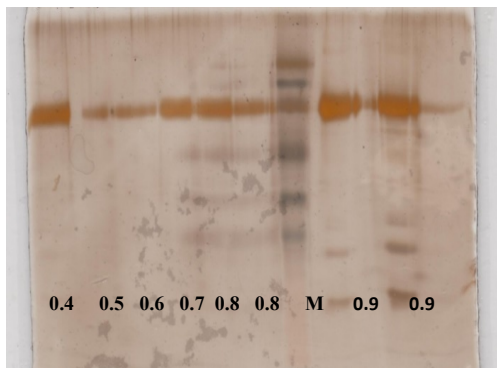
تعیین اندازه نانوذرات پرفلوئورواکتیل بروماید قبل و بعد از بارگذاری

جهت بررسی سایز نانوذرات پرفلوئورواکتیل بروماید قبل و بعد از بارگذاری، ابتدا محلول حاوی نانوذرات رقیق سازی گردید و سپس توسط دستگاه اندازه‌گیری سایز ذرات، توزیع سایز ذرات به دست آمد.

بررسی طیف سنجی تریپتوفان فلورسانس لاکتوفرین بارگذاری شده بر روی نانوذرات پرفلوئورواکتیل بروماید جهت کسب اطلاعاتی درباره بارگذاری لاکتوفرین به نانوذرات از طیف سنجی فلورسانس که روشی بسیار حساس و پرکاربرد است، استفاده گردید. به دلیل وجود آمینواسیدهای آروماتیک از جمله تریپتوفان در ساختار لاکتوفرین، این آزمایش کاربرد زیادی دارد.

اثر غلظت‌های مختلف لاکتوفرین به تنهایی و لاکتوفرین بارگذاری شده بر روی نانوذرات پرفلوئورواکتیل بروماید بر سلول‌های استوبلاست رده MG-63 توسط آزمایش MTT ۱- جهت انجام آزمایش در ابتدا سلول‌های استوبلاست آماده شده، به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به مقدار ۱۰۰ هزار سلول در هر خانه و نیز نمونه‌ها همراه با شاهد‌های مورد نیاز افزوده شدند.

بارگذاری شده با لاکتوفرین، در تصویر شماره ۳، با بزرگنمایی بین ۱۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰ نشان داده شده است. با توجه به تصویر شماره ۳ (B)، به وضوح مشخص است ساختار نانو امولسیون‌ها در طی فرآیند تولید و بارگذاری لاکتوفرین بسیار همگن با توزیع یکنواخت قطر می‌باشد که مورفولوژی ذرات کروی است و تغییر نکرده است.



تصویر شماره ۱: تصویر ژل پلی آکریل آمید حاصل الکتروفورز با استفاده از SDS-PAGE نتایج حاصل از خالص سازی لاکتوفرین، وجود باند ۸۰ KD در فراکسیون‌های مختلف، نتایج نشان می‌دهد که فراکسیون‌های ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸ دارای باند خالص ۸۰ کیلو دالتون می‌باشند که با استفاده از آزمایش TMB نشان داده شد که فراکسیون‌های ۰/۷ و ۰/۸ لاکتوفرین خالص می‌باشند.



تصویر شماره ۲: نتایج حاصل از آزمایش با TMB نشان می‌دهد که فراکسیون‌های ۰/۴، ۰/۵ و ۰/۶ در واکنش با TMB به رنگ آبی در آمده که نشان می‌دهد این فراکسیون‌ها لاکتوپراکسیداز می‌باشند اما فراکسیون‌های ۰/۷ و ۰/۸ در این آزمایش فاقد رنگ بودند، بنا براین لاکتوفرین خالص می‌باشند.

نتایج حاصل از الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید نتایج حاصل از الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲/۵ درصد نشان می‌دهد که در گرادیان‌های ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷ و ۰/۸ باندهایی با وزن مولکولی ۸۰ کیلو دالتون وجود دارد، یعنی این که ممکن است در این فراکسیون‌ها دو پروتئین لاکتوفرین و یا لاکتوپراکسیداز وجود داشته باشد که باید بر اساس آزمایش TMB معلوم گردد که در کدام فراکسیون لاکتوفرین وجود دارد (تصویر شماره ۱).

نتایج حاصل از اندازه گیری پروتئین

نتایج حاصل از اندازه گیری پروتئین به روش برادفورد نشان داد که غلظت لاکتوفرین در فراکسیون‌های (M ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸) به ترتیب ۱۴۸، ۱۵۳، ۲۵۳، ۲۲۴ و ۲۸۳ می‌باشد.

نتایج حاصل از آزمایش TMB

نتایج حاصل نشان می‌دهد که فراکسیون‌های ۰/۷ و ۰/۸ در حضور تترامتیل بنزیدین و پراکسید هیدروژن تغییر رنگ نداشته اند. عدم تغییر رنگ نشان دهنده خالص بودن لاکتوفرین می‌باشد (تصویر شماره ۲).

نتایج حاصل از تهیه نانوذرات قبل و بعد از بارگذاری

توسط لاکتوفرین

نتایج حاصل از تعیین بازده بارگذاری لاکتوفرین

بر روی نانوذرات پرفلوئورواکتیل بروماید

بازده بارگذاری لاکتوفرین بر روی نانو ذرات

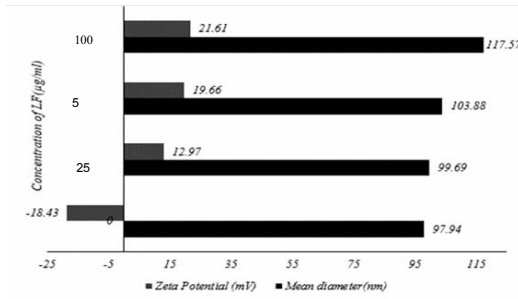
پرفلوئورواکتیل بروماید ۹۱ درصد به دست آمد.

نتایج حاصل از بررسی توسط میکروسکوپ روبشی

(SEM) جهت تایید ناوذرات قبل و بعد از بارگذاری

توسط لاکتوفرین

تصاویر حاصل از SEM³ نانوذرات و نانوذرات

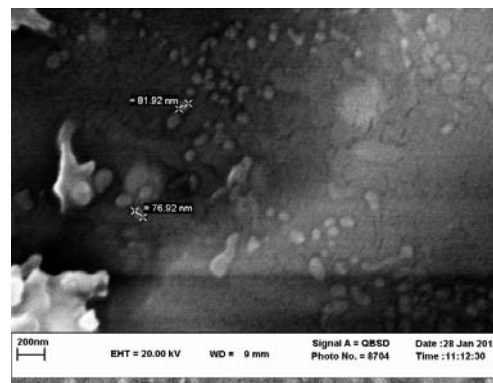
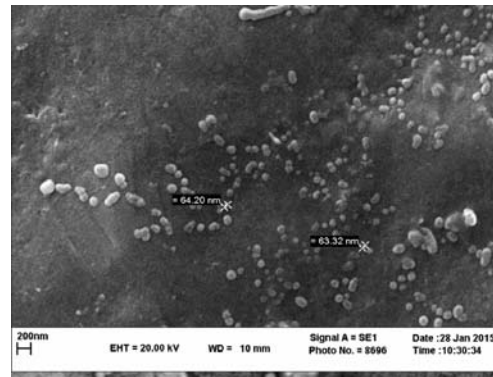


نمودار شماره ۱: نمودار حاصل از پتانسیل زتا و اندازه ذرات نانوذرات پرفلوئورواکتیل بر مایند قبل و بعد از بارگذاری با لاکتوفیرین در غلظت‌های مختلف - میانگین سایز ذرات قبل و بعد از بارگذاری لاکتوفیرین تغییر زیادی نداشته است و پتانسیل زتای نانوذرات از ۱۸/۴۳- (بدون لاکتوفیرین) به ۲۱/۶۱+ (لاکتوفیرین با غلظت ۱۰۰ µg/ml) تغییر کرده است که این نتایج تایید کننده بارگذاری لاکتوفیرین بر نانوذرات می باشد.

نتایج حاصل از آزمایش طیف سنجی تریپتوفان فلورسانس بر روی نانو ذرات پرفلوئورواکتیل بر مایند قبل و بعد از بارگذاری توسط لاکتوفیرین

به منظور بررسی برهمکنش و الحاق لاکتوفیرین به نانوذرات پرفلوئورواکتیل بر مایند، نمودار شدت فلورسانس در طول موج برانگیختگی ۲۸۰ نانومتر ثبت گردید. نانوذرات بدون لاکتوفیرین فاقد پیک می باشند، در حالی که نانوذرات حاوی لاکتوفیرین دارای یک پیک منفی در طول موج ۲۰۲nm است که نشان دهنده محتوای ساختاری ماریپچ آلفا است و الحاق پروتئین لاکتوفیرین به نانوذرات را تایید می کند. این در حالی است که محلول لاکتوفیرین نیز دارای یک پیک قوی می باشد (نمودار شماره ۲).

نتایج حاصل از بررسی اثر لاکتوفیرین و لاکتوفیرین بارگذاری شده بر روی نانوذرات پرفلوئورواکتیل بر مایند بر روی سلول استوبلاست MG-63 با استفاده از آزمایش MTT لاکتوفیرین جدا شده از شیر شکر، باعث افزایش رشد سلول‌های استوبلاست شد. سپس جذب در دو طول موج ۴۹۰ و ۶۳۰ خوانده شد و نتایج ارائه گردید (جدول شماره ۱).



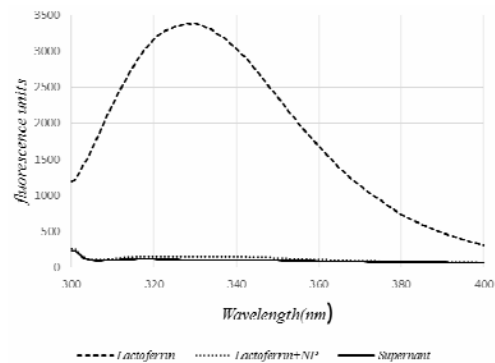
تصویر شماره ۳: نتایج حاصل از بررسی توسط میکروسکوپ روبشی (SEM) جهت تایید ناوذرات قبل (A) و بعد از بارگذاری توسط لاکتوفیرین (B) با بزرگنمایی بین ۱۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰۰ نشان می دهد که ساختار نانو امولسیون‌ها در طی فرآیند تولید و بارگذاری لاکتوفیرین بسیار همگن با توزیع یکنواخت قطر می باشد، مورفولوژی ذرات کرووی است و تغییر نکرده است.

نتایج حاصل از اندازه ذرات و اندازه گیری پتانسیل زتا در نانوذرات پرفلوئورواکتیل بر مایند، قبل و پس از بارگذاری جهت بررسی تغییرات میانگین سایز نانوذرات قبل و بعد از بارگذاری آن با لاکتوفیرین از دستگاه اندازه گیری سایز ذرات استفاده گردید. همان طور که نمودار نشان می دهد، میانگین سایز ذرات قبل و بعد از بارگذاری لاکتوفیرین تغییر زیادی نداشته است. هم چنین پتانسیل زتای نانوذرات از ۱۸/۴۳- (بدون لاکتوفیرین) به ۲۱/۶۱+ (لاکتوفیرین با غلظت ۱۰۰ µg/ml) تغییر کرده است که این نتایج تایید کننده بارگذاری لاکتوفیرین به نانوذرات می باشد (نمودار شماره ۱).

اختلاف معنی داری وجود ندارد. بین سه تکرار استفاده شده از لاکتوفرین استاندارد بر رشد سلول استوبلاست، اختلاف معنی داری وجود ندارد. اما بین غلظت‌های استفاده شده از لاکتوفرین استاندارد بر رشد سلول استوبلاست اختلاف بسیار معنی داری در سطح $\alpha < 1\%$ وجود دارد. هم‌چنین بین میانگین اثر استفاده از لاکتوفرین خالص شده از شیر شتر بر رشد سلول استوبلاست با اثر لاکتوفرین استاندارد حاصل از شیر گاو (خریداری شده و استفاده شده به عنوان استاندارد) به طور کلی اختلاف معنی داری ($\alpha < 5\%$) وجود دارد.

بحث

پوکی استخوان، نوعی بیماری است که با کاهش توده استخوانی و از دست رفتن کیفیت ریز ساختار استخوان شناخته می‌شود که خود منجر به افزایش خطر شکستگی می‌شود (۱۸). برای پیشگیری و درمان، از داروهای مختلف و مواد بیولوژیک طبیعی مختلف استفاده می‌شود و یکی از این مواد می‌تواند لاکتوفرین باشد. لاکتوفرین یکی از ترکیبات مهم موجود در شیر است و پروتئینی Iron-Bound می‌باشد که در شیر انسان و سایر پستانداران غلظت بالایی دارد (۲۰، ۱۹). هدف از پژوهش حاضر بارگذاری لاکتوفرین بر روی نانوذرات پرفلوئورواکتیل بر مایند به عنوان حامل و بررسی و مقایسه خواص آن با لاکتوفرین بدون بارگذاری بر سلول استوبلاست بود. لاکتوفرین با روش کروماتوگرافی تعویض یونی، خالص گردید (۱۳). برای جلوگیری از شکستن لاکتوفرین و حفظ فعالیت بیولوژیکی آن در برابر عواملی مانند فراصوت، هم‌زدن و گرما، پس از آماده سازی نانوذرات، لاکتوفرین به آن اضافه شد (۱۷). تحقیقات مختلف نشان داده است که لاکتوفرین در استخوان‌سازی موثر می‌باشد، لاکتوفرین باعث افزایش تکثیر و تمایز استوبلاست‌ها و مهار رشد استئوکلاست‌ها می‌گردد (۲۱). این‌طور به نظر می‌رسد که لاکتوفرین بارگذاری شده و بدون بارگذاری بر روی پرفلوئورواکتیل



نمودار شماره ۲: تعامل بین لاکتوفرین و نانوذرات پرفلوئورواکتیل بر مایند توسط تریپتوفان فلورسانس

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین اثر متقابل اثر استفاده از غلظت‌های مختلف لاکتوفرین خالص شده به تنهایی و استفاده از غلظت‌های مختلف لاکتوفرین بارگذاری شده بر روی نانوذرات

نانوذره	لاکتوفرین	OD به دست آمده از آزمایش MTT
عدم نانوذره (لاکتوفرین تنها)	(کنترل سلولی)	۰٫۳۳۷ ^c
عدم نانوذره (لاکتوفرین تنها)	(۲۵)	۰٫۷۵۴ ^a
عدم نانوذره (لاکتوفرین تنها)	(۵۰)	۰٫۶۲۸ ^{ab}
عدم نانوذره (لاکتوفرین تنها)	(۱۰۰)	۰٫۴۹۸ ^b
لاکتوفرین همراه نانوذره	(کنترل تانوپارنیکل بدون لاکتوفرین)	۰٫۳۱۹ ^d
لاکتوفرین همراه نانوذره	(۲۵)	۰٫۷۴۳ ^a
لاکتوفرین همراه نانوذره	(۵۰)	۰٫۶۳۵ ^{ab}
لاکتوفرین همراه نانوذره	(۱۰۰)	۰٫۴۹۲ ^b

نتایج حاصل نشان داد که سلول‌های استوبلاست در مجاورت با لاکتوفرین، افزایش رشد و تکثیر داشته‌اند. هم‌چنین نشان داد که لاکتوفرین شیر شتر در مقایسه با لاکتوفرین گاوی بیش تر باعث رشد سلول‌ها گردیده است. نتایج آماری ($\alpha < 1\%$) حاصل از آزمایش MTT به دست آمده از مقایسه اثر استفاده از لاکتوفرین خالص شده به تنهایی و استفاده از لاکتوفرین بارگذاری شده بر روی نانوذره بر رشد سلول استوبلاست MG-63 نشان می‌دهد که بین سطوح مختلف نانوذره اختلاف معنی داری وجود ندارد. در مقایسه بین سطوح مختلف اثر لاکتوفرین بارگذاری شده بر روی نانوذره در کشت سلولی و سطوح مختلف اثر لاکتوفرین به تنهایی بر کشت سلولی (مقایسه هر سطح با سطح هم‌ردیف خود)،

غلظت‌های مختلف اثر لاکتوفیرین استفاده شده (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) بر رشد سلول اختلاف بسیار معنی داری وجود دارد. این نتایج برای لاکتوفیرین بارگذاری شده و بدون بارگذاری یکسان ارزیابی گردید. نتایج نشان می‌دهد که لاکتوفیرین در غلظت کم‌تر (۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر) سبب رشد بهتر سلول شده است. به طور کلی می‌توان نتیجه‌گیری نمود که امکان بارگذاری لاکتوفیرین بر روی نانوذرات پرفلوئورواکتیل برماید وجود داشته و اثر لاکتوفیرین بارگذاری شده همانند لاکتوفیرین بدون بارگذاری بر روی سلول استوبلاست MG-63 می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شمال شرق کشور و نیز از سرکار خانم مهندس نرگس غیور، خانم دکتر حدیث رحمانی و سرکار خانم شنوایی به خاطر کمک در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

برماید می‌تواند همانند عوامل رشد، در استخوان‌سازی موثر بوده و کیفیت و کمیت ترمیم استخوان را بهبود بخشد. عامل اصلی ارتباط موثر بین نانوذرات و لاکتوفیرین، تعاملات الکترواستاتیک بین لایه لیپیدی سطح نانوذرات با بار منفی و بار مثبت سطح لاکتوفیرین است که الحاق آن‌ها توسط فلورسانس تریپتوفان و پتانسیل زتا به اثبات رسید (۲۲). تجزیه و تحلیل داده‌های میکروسکوپ الکترونی SEM از نانوذرات پرفلوئورواکتیل برماید در تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تمامیت ساختاری آن‌ها حتی پس از اضافه کردن لاکتوفیرین به دلیل کشش سطحی بسیار بالای نانوذرات و هسته آبرگریز حفظ و مانع از فروپاشی نانوذرات می‌گردد. بعد از تهیه نانوذرات، میزان بارگذاری نانوذرات با لاکتوفیرین محاسبه گردید که معادل ۹۱ درصد بود. نتایج حاصل از بررسی آماری به روش آزمایشات فاکتریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار با استفاده از نرم افزار MSTATC و مقایسه میانگین تیمارها به روش دانکن نشان می‌دهد که بین

References

1. Anee koda-kimble M, Liyod Yee Y, Brain A, Robin C, Guglielmo J, Wayne K, et al. Applied Therapeutics: The clinical use of drugs. 9th ed. Philadelphia: LWW; 2009.
2. Aala M, Aghaei Meybodi HR, Peymani M, Larijani B. Osteoporosis and Exercise in Postmenopausal Women. Iranian J Clin Endocrinol Metab. 2009; 11(2): 209-217 (Persian).
3. Steijns JM. Milk ingredients as nutraceuticals. Int J Dairy Technol. 2001; 54(2): 81-88.
4. Sharbafi R, Moradian F, Rafiei AR, Barzegar A. Isolation and Purification of Bovine Lactoferrin. J Mazandaran Univ Med Sci. 2011; 21(84): 44-51 (Persian).
5. González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. Int J Antimicrob Agents. 2009; 33(4): 301-308.
6. García-Montoya IA1, Cendón TS, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin multiple bioactive protein: an overview. Biochim Biophys Acta. 2012; 1820(3): 226-236.
7. Palmanno KP, Naot D, Reid IR, Cornish J. Understanding Milk Proteins: Lactoferrin and Bone — Current Knowledge and Future Potential. CiNZ. 2006; 1(1): 118-121.
8. Naot D, Palmano K, Cornish J. Lactoferrin-A Potential Anabolic Intervention in

- Osteoporosis. Osteoporosis. Yannis Dionyssiotis. 2012; P: 803-820.
9. Vandrovцова M, Douglas TEL, Heinemann S, Scharnweber D, Dubruel P, Bacakova L. Collagen-lactoferrin fibrillar coatings enhance osteoblast proliferation and differentiation. *J Biomed Mater.* 2015; 103(2): 525-533.
 10. Paknejad M, Rohn A, Sabur Yaraghi A, Elhami F. Histologic and histomorphometric study on the effects of lactoferrin and porous bovine bone mineral(Bio-Oss) on the regeneration of bone defects made on rabbit calvarium. *JDM.* 2010; 3(3): 1-8 (Persian).
 11. Surendiran A, Sandhiya S, Pradhan SC, Adithan C. Novel applications of nanotechnology in medicine. *Indian J Med Res.* 2009; 130(6): 689-701.
 12. Devlamalappally H, Chakilam A, Amiji M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. *J Pharma Sci.* 2007; 96(10): 2547-2565.
 13. Raei M, Rajabzadeh G, Zibaei S, Jafari SM, Sani AM. Nano-encapsulation of lactoferrin isolated from camel milk by calcium alginate. *Int J Biol Macromol.* 2015; 79: 669-673.
 14. Schmieder AH, Winter PM, Caruthers SD, Harris TD, Williams TA, Allen JS, et al. Molecular MR imaging of melanoma angiogenesis with alphanubeta3-targeted paramagnetic nanoparticles. *Magn Reson Med.* 2005; 53(1): 621-627.
 15. Soman NR, Lanza GM, Heuser JM, Schlesinger PH, Wickline SA. Synthesis and Characterization of Stable Fluorocarbon Nanostructures as Drug Delivery Vehicles for Cytolytic Peptides. *Nano Lett.* 2008; 8(4): 1131-1136.
 16. Goette MJ, Schmieder AH, Williams TA, Allen JS, Keupp J, Lanza G, et al. *In Vivo* quantitative imaging of angiogenesis-targeted PFOB nanoparticles in a hypercholesterol rabbit model using ¹⁹F-MRI with ultra-short echo time balanced SSFP. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2012; 14(1): 131-158.
 17. Rahmani Inche Keykanlu H, Zibaei S, Ardjmand C, Safekordi AK. Fluorocarbon Nanostructures (PFOB-NEP) as Camel Milk Lactoferrin and its anti cancer effects on human breast cancer cell line MCS7. *Bulgarian Chemical Communications.* 2016; 48(2): 323-331. (Persian).
 18. Brown VP, Josse RG. Clinical practice guidelines the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *CMAJ.* 2002; 167(1): 1-34.
 19. Newman MG, Takei H, Carranza FA, Klokkevold PR. Carranza's Clinical periodontology. 10th ed. St Louis: WB Saunders. 2006
 20. Steijns JM, Van Hooijdonk AC. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *Br J Nutr.* 2000; 84(1):81-88.
 21. Neve A, Corrado A, Cantatore Fp. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res.* 2011; 343(2): 289-302.
 22. Mohammadi M, Ghanbaarzaadeh B, Rezaei Mokarram R, Yar Hosseini M, Hamishehkar H. Study of Stability, Zeta-potential, and Steady Rheological Properties of Nanoliposomes Containing Vitamin D3. *Med J Tabriz Univ Med Sci.* 2014; 36(4): 102-111. (Persian).