

دانشور

پژوهشی

تهیه نانوالیاف کیتوسان حاوی عصاره حنا و بررسی خواص آنتی‌باکتریالی و زیست سازگاری آن

نویسندگان: مینو صدیقی*^۱، ایمان یوسفی^۲ و حسین وطنی^۳

۱. دانشیار دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

۲. کارشناسی ارشد، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

۳. دکتری شیمی، داروسازی ثامن، مشهد، ایران

E-mail: minoosadri92@gmail.com

* نویسنده مسئول: مینو صدیقی

چکیده

مقدمه و هدف: گیاه حنا دارای خواصی منحصر به فرد است و از دیرباز به عنوان یک گیاه دارویی استفاده می‌شده است. در این طرح، نانوالیاف پلیمری کامپوزیتی از کیتوسان، پلی اتیلن اکسید و عصاره حنا برای تهیه پوشش زخم به کمک فرایند الکتروریسی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: نانوالیاف‌های پلیمری به کمک روش الکتروریسی تهیه شدند. به منظور بررسی اثر حنا روی خواص نانوالیاف تهیه شده، نانوالیاف‌های مختلف در حضور و عدم حضور عصاره حنا تهیه شدند. مورفولوژی و قطر نانوالیاف‌های الکتروریسی شده با کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی و اندازه قطر متوسط نانوالیاف‌ها با استفاده از نرم‌افزار Image J معین شد.

نتایج: مؤلفه‌های مختلف مؤثر روی کیفیت نانوالیاف‌ها، بررسی و بهینه شدند. شرایط بهینه برای تهیه نانوالیاف با قطر کمتر از ۱۰۰ نانومتر عبارت‌اند از: ولتاژ ۲۰ کیلوولت؛ دبی خروجی ۰/۵ میلی لیتر بر ساعت؛ فاصله سر نازل تا جمع‌کننده، ۱۰ سانتی‌متر و نسبت وزنی کیتوسان به پلی اتیلن اکسید برابر با ۰/۹. قطر متوسط نانوالیاف تهیه شده در شرایط بهینه، برابر ۹۵ نانومتر به دست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان دادند که نمونه‌های حاوی عصاره حنا، پایداری خوبی دارند؛ به علاوه با افزایش درصد حنا در ساختار نانوالیاف، تخریب‌پذیری و میزان جذب آب افزایش می‌یابد. با توجه به نتایج حاصل به نظر می‌رسد که داربست کیتوسان/پلی اتیلن اکسید حاوی ۱ درصد عصاره حنا، انتخابی مناسب به عنوان پوشش زخم بوده، موجب تسهیل فرایند ترمیم زخم می‌شود.

واژگان کلیدی: نانوالیاف، کیتوسان، عصاره حنا، پلی اتیلن اکسید، آنتی‌باکتریال.

دوماهنامه علمی-پژوهشی

دانشگاه شاهد

سال بیست و دوم - شماره ۱۱۷

تیر ۱۳۹۴

دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۱۳

آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۴/۰۳/۱۹

پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۲۵

مقدمه

یکی از مهم‌ترین کاربردهای فناوری نانو، طراحی و تولید نانوالیاف پلیمری تقویت‌کننده رشد و ترمیم بافت است. پوشاندن زخم با غشای نانوالیافی، خواصی منحصر به فرد را در مقایسه با سایر پوشش‌ها دارد زیرا ساختارهای نانوالیاف، بسیار به ماتریکس خارج سلولی (ECM)، شبیه بوده، می‌تواند سازگاری با خون و دیگر مایعات بافتی را بهبود دهد و در نتیجه، ترمیم زخم و احیای پوست را تسهیل کند (۱). روش‌هایی متعدد برای تولید لیاف وجود دارند ولی روش‌هایی که می‌توانند به تولید لیاف با قطرهای نانومتری یا نانوالیاف منجر شوند، عبارت‌اند از: کشش (۲)، تولید از قالب (۳)، جدایش فاز (۴)، خودآرایی (۵) و الکتروریسی (۶-۱۰). الکتروریسی روشی با نیروی محرکه الکترواستاتیکی برای تولید نانوالیاف است؛ با این روش، انواع مواد پلیمری با قطرهای لیاف متفاوت (از نانومتر تا چند میکرومتر) تولید می‌شوند (۱۱).

به‌طور کلی می‌توان بیوپلیمرها را به دو گروه عمده طبیعی و مصنوعی تقسیم‌بندی کرد که هر دسته از این بیوپلیمرها نیز از لحاظ تخریب‌پذیری به دو دسته زیست تخریب‌پذیر و زیست تخریب‌ناپذیر تقسیم می‌شوند (۱۲). در سال‌های اخیر، تحقیق‌ها روی پلیمرهای طبیعی و مصنوعی زیست تخریب‌پذیر به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته که دلیل اصلی آن، مصارف عمده و تخصصی این مواد برای کاربردهای زیست‌پزشکی از قبیل رهایش دارو، ایمپلنت، اورتوپدی، طراحی اندام‌های مصنوعی و پوشش زخم است؛ به دلیل مشابهت ساختار این مواد با ساختار طبیعی بدن، این مواد با بدن سازگاری کامل دارند. کیتوسان، نوعی پلیمر طبیعی زیست‌سازگار است که خصوصیات مختلف دارد، از قبیل زیست‌تخریب‌پذیری و زیست‌سازگاری، عدم سمیت، قابلیت انعقادپذیری، قابلیت آنتی‌ژنی، عدم حلالیت در آب و خاصیت زله‌ای شدن، آثار آنتی‌باکتریال، ضدقارچی و ضدویروسی؛ از این رو،

امروزه استفاده از کیتوسان در صنایع پزشکی، دارویی و مهندسی بافت، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۵-۱۳) اما مشخص شده که الکتروریسی کیتوسان به دلیل انحلال‌پذیری ضعیف آن در آب و ویسکوزیته بالای محلول‌های آبی آن، به‌تنهایی، امکان‌پذیر نیست و تنها در مجاورت پلیمری دیگر قابل انجام است (۱۶، ۱۷). یکی از روش‌هایی که برای بهبود قابلیت الکتروریسی کیتوسان، مخلوط کردن آن با یک پلیمر طبیعی یا سنتزی دیگر است که قابلیت الکتروریسی بالایی دارد؛ برخی از پلیمرهایی که برای این منظور به‌کار می‌روند، عبارت‌اند از: پلی‌اتیلن اکسید (۱۸)، پلی‌وینیل الکل (۱۹)، پلی‌استیک اسید (۲۰) و پلی‌آکریل آمید (۲۱) که همگی جزو پلیمرهای زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر هستند. پلی‌اتیلن اکسید، نوعی پلیمر مصنوعی زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر با قابلیت انحلال بالا در آب است که سمیتی پایین دارد و به‌راحتی، بدن، آن را پاکسازی می‌کند؛ این ویژگی‌ها این پلیمر را برای بسیاری از کاربردهای زیست‌پزشکی به‌خصوص در زمینه تولید نانوالیاف پوشش زخم مناسب می‌سازند؛ استفاده از این پلیمر در تولید پوشش‌های زخم در کنار زیست‌پلیمرهای طبیعی مانند کیتوسان، موجب تشکیل لیاف یکنواخت با قابلیت مکانیکی بالا می‌شود بدون اینکه موجب کاهش ظرفیت کیتوسان برای ترمیم زخم شود (۲۲، ۲۳).

گیاه حنا با نام علمی Lawsonia Inermis به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، ضدانعقاد خون، التیام‌دهنده زخم و ضدالتهاب شناخته شده و طیفی وسیع از فعالیت‌های ضد میکروبی، شامل اثر ضدباکتری به‌خصوص، باکتری‌های گرم مثبت، ضد ویروس، ضد قارچ و ضد انگل را داشته، می‌تواند برای درمان بیماری‌های پوستی و بهبود زخم‌های عفونی استفاده شود (۲۸-۲۴).

تحقیق‌های اخیر نشان داده‌اند که عصاره حنا، موجب تسکین و افزایش سرعت ترمیم زخم می‌شود (۲۹). به‌رغم مزایای فراوان و استفاده گسترده از عصاره حنا در طب سنتی در درمان بیماری‌های پوستی و ترمیم زخم، تحقیق‌هایی مبنی بر استفاده از این ماده در تهیه پوشش‌های زخم با فرایند الکترورسی گزارش نشده‌اند؛ بنابراین در این طرح، امکان الکترورسی نانوالیاف حاوی عصاره حنا بررسی شده‌است.

هدف از انجام این طرح، تولید نوعی پوشش زخم مناسب از نانوالیاف پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر به روش الکترورسی و بررسی شرایط عملیاتی برای به‌دافل‌رساندن قطر متوسط نانوالیاف حاوی ماده مؤثره است به‌طوری‌که در هنگام استفاده روی زخم بتواند خواصی مطلوب از قبیل «ایجاد کمترین آلودگی، سازگاری با محیط زخم، بهبود سریع زخم، کنترل میزان رطوبت و اکسیژن هوا به‌منظور ترمیم سریع و جلوگیری از خشک‌شدن آن، هزینه کمتر درمان به علت تعویض کم پوشش و درنهایت، جداشدن آسان از روی پوست» را دارا باشد.

هدف از انجام این طرح، تولید نوعی پوشش زخم مناسب از نانوالیاف پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر به روش الکترورسی و بررسی شرایط عملیاتی برای به‌دافل‌رساندن قطر متوسط نانوالیاف حاوی ماده مؤثره است به‌طوری‌که در هنگام استفاده روی زخم بتواند خواصی مطلوب از قبیل «ایجاد کمترین آلودگی، سازگاری با محیط زخم، بهبود سریع زخم، کنترل میزان رطوبت و اکسیژن هوا به‌منظور ترمیم سریع و جلوگیری از خشک‌شدن آن، هزینه کمتر درمان به علت تعویض کم پوشش و درنهایت، جداشدن آسان از روی پوست» را دارا باشد.

هدف از انجام این طرح، تولید نوعی پوشش زخم مناسب از نانوالیاف پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر به روش الکترورسی و بررسی شرایط عملیاتی برای به‌دافل‌رساندن قطر متوسط نانوالیاف حاوی ماده مؤثره است به‌طوری‌که در هنگام استفاده روی زخم بتواند خواصی مطلوب از قبیل «ایجاد کمترین آلودگی، سازگاری با محیط زخم، بهبود سریع زخم، کنترل میزان رطوبت و اکسیژن هوا به‌منظور ترمیم سریع و جلوگیری از خشک‌شدن آن، هزینه کمتر درمان به علت تعویض کم پوشش و درنهایت، جداشدن آسان از روی پوست» را دارا باشد.

مواد و روش‌ها

مواد و وسایل مورد استفاده

پلیمر کیتوسان با وزن مولکولی متوسط (ساخت شرکت Chitoclear ایسلند)، پلی‌اتیلن اکسید با وزن مولکولی ۹۰۰/۰۰۰ (ساخت شرکت Acros organic بلژیک)، اسید استیک، محیط کشت نوترینت آگار و Tween 80 (ساخت شرکت MERCK آلمان)، آب دوبار تقطیر، MTT (ساخت شرکت Sigma-Aldrich)، محیط کشت DMEM، FBS، PBS، پنی‌سیلین و استروپتومايسين (ساخت شرکت PAA)، سدیم کلراید ۰/۹ درصد (ساخت شرکت داروسازی شهید قاضی)، عصاره حنا (ساخت شرکت باریج اسانس)، باکتری اشرشیا E.coli و باکتری استافیلو کوکوس اورئوس.

دستگاه الکترورسی مدل ES1000، میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل MV2300، پوشش‌دهنده مدل

فرایند الکترورسی محلول‌های پلیمری در مرحله الکترورسی، محلول‌های پلیمری تهیه‌شده به‌طور جداگانه درون سرنگ پلاستیکی ۵ میلی‌لیتری ریخته و سرنگ توسط رابط (شیلنگ سیلیکونی) به یک نازل نوک‌صاف از جنس فولاد زنگ نزن متصل شد؛ هوای داخل سرنگ و نازل با فشاردادن محلول به‌طور

میزان جذب آب توسط داربست‌های نانوالیاف برای بررسی میزان جذب آب (میزان تورم) داربست نانوالیاف الکترورسی شده، ابتدا ۶۰ میلی‌گرم از نمونه داربست‌های نانوالیافی تهیه شده وزن شدند و در ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر استات در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور شدند؛ پس از ۲۴ ساعت نمونه‌ها از بافر خارج و به منظور حذف محلول اضافی، میان دو صافی قرار داده و سپس وزن شدند. درصد تورم هر نمونه طبق فرمول زیر محاسبه شد (۵):

$$\text{Degree of swelling (\%)} = \frac{(W_{st} - W_{dt})}{W_{dt}} \times 100 \quad (1)$$

W_{st} : وزن نمونه در حالت مرطوب پس از غوطه‌وری در محلول بافر استات
 W_{dt} : وزن نمونه در حالت خشک پس از غوطه‌وری در محلول بافر استات

بررسی تخریب‌پذیری داربست‌های نانوالیاف
 برای اندازه‌گیری میزان تخریب‌پذیری (کاهش وزن) داربست نانوالیاف الکترورسی شده، ابتدا ۶۰ میلی‌گرم از نمونه داربست‌های نانوالیافی وزن و در ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر استات در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، غوطه‌ور شدند؛ پس از ۲۴ ساعت نمونه‌ها از محلول بافری خارج شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند تا به طور کامل، خشک شوند؛ سپس نمونه‌ها وزن شدند و درصد کاهش وزن هر نمونه، طبق فرمول زیر محاسبه شد [۵]:

$$\text{Weight loss (\%)} = \frac{(W_{di} - W_{dt})}{W_{di}} \times 100 \quad (2)$$

W_{di} : وزن اولیه نمونه‌ها در حالت خشک پیش از غوطه‌وری در محلول بافر استات
 W_{dt} : وزن نمونه‌ها در حالت خشک پس از غوطه‌وری در محلول بافر استات

کامل خارج شد. سر نازل به قطب مثبت و صفحه جمع‌کننده (که در فاصله ۱۰ سانتی‌متری از سر نازل واقع شده‌است) به قطب منفی متصل شد. به منظور داشتن جریان پلیمری پایدار و ثابت، سرنگ روی یک پمپ سرنگی قرار گرفته که با سرعت ۲۰ میلی‌متر بر ثانیه به صورت رفت و برگشتی حرکت می‌کند. ریسندگی تحت ولتاژ ۲۰-۱۷ کیلوولت و در یک دبی خروجی ۰/۳-۰/۵ میلی‌لیتر بر ساعت انجام گرفت. به منظور حذف حلال و آب باقیمانده، نمونه‌های الکترورسی شده به مدت یک شبانه‌روز، تحت دمای محیط قرار گرفتند تا به طور کامل، خشک شوند. همه آزمایش‌های ریسندگی در دمای محیط انجام شدند و محلول‌های پلیمری بی‌درنگ پس از آماده شدن در فرایند الکترورسی استفاده شدند. برای دستیابی به داربست‌های نانوالیافی با ضخامت مناسب، الکترورسی به مدت ۱۰ ساعت انجام گرفت و از صفحه جمع‌کننده مدور با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه استفاده شد.

بررسی پایداری داربست‌های نانوالیاف

به منظور شبیه‌سازی پوست انسان برای انجام آزمون‌های پایداری، تخریب‌پذیری و میزان جذب آب (تورم) داربست نانوالیاف، از یک محلول بافر استات با pH ۵/۵ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد؛ همچنین، طی انجام این آزمایش‌ها، نمونه به طور مرتب با یک همزن مغناطیسی با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه هم‌زده می‌شد تا محلول بافری به صورت یکنواخت به تمام سطح نانوالیاف برسد.

به منظور بررسی پایداری داربست‌های نانوالیاف الکترورسی شده، ابتدا نمونه داربست‌های نانوالیافی تهیه شده به ابعاد ۴×۴ سانتی‌متر مربع برش داده و در محلول بافر استات در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت غوطه‌ور شدند؛ پس از این مدت، نمونه‌ها را از محلول بافری خارج کرده، اجازه داده شد در دمای محیط، خشک شوند؛ تغییر ساختار و مورفولوژی آنها با میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد.

تجزیه و تحلیل میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

مورفولوژی و قطر نانوالیافهای حاصل از فرایند الکتروریسی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل Camscan MV2300 مشاهده و بررسی شد؛ برای این منظور، ابتدا فویل آلومینیومی که نانوالیاف روی آن جمع آوری شده بود، به قطعات 21×1 سانتی متر برش داده شد. نمونه‌های آماده شده با دستگاه پوشش دهنده یونی مدل E5200 و با اعمال ولتاژ ۱ کیلوولت برای ۵ دقیقه پوشش طلا داده شدند؛ سپس تصاویر SEM داربست نانوالیاف با اعمال ولتاژی در حد کیلوولت به دست آمدند. برای اندازه گیری قطر متوسط نانوالیافها از نرم افزار Image J استفاده و به طور تصادفی در هر تصویر، قطر ۵۰ نمونه اندازه گیری شد.

بررسی فعالیت آنتی باکتریال داربست‌های نانوالیاف

فعالیت آنتی باکتریال داربست نانوالیاف الکتروریسی شده با استفاده از روش صفحه آگار و با دو گونه از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت به ترتیب *Escherichia coli* (E.coli) و *Staphylococcus aureus* (S.aureus) به عنوان شاخص، مورد مطالعه قرار گرفت؛ ابتدا محیط کشت میکروبی طبق پروتکل شرکت سازنده آماده شد؛ پس از آن به طور جداگانه، سوسپانسیونی از باکتری گرم مثبت و گرم منفی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. پس از آماده سازی محیط، با استفاده از سواب‌های پنبه‌ای استریل شده از سوسپانسیون تهیه شده روی سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار، کشت یکنواخت به صورت چمنی انجام شد و پس از آن، نانوالیاف‌های مورد بررسی به شکل دایره با قطر تقریبی ۱۰ میلی متر برش داده، با اتانول ۷۵ درصد، استریل شدند و روی سطح پلیت قرار گرفتند. پلیت‌های حاوی نمونه را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرارداد، پس از آن، نواحی مهاری در اطراف نمونه ارزیابی شدند.

بررسی کشت سلولی

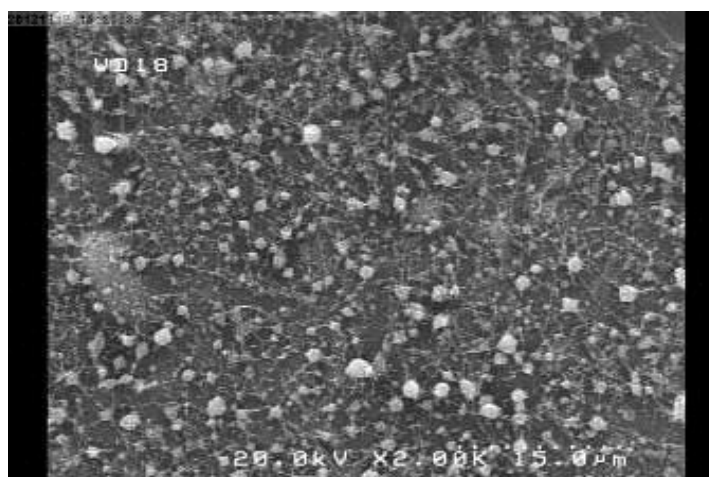
بررسی سیتوتوکسوسیتی و تکثیر سلول‌های فیروبلاست پوست روی داربست نانوالیاف کامپوزیتی براساس آزمایش 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-MTT (diphenyltetrazolium bromide) و با همکاری مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشکده داروسازی علوم پزشکی تهران انجام شد؛ این بررسی روی سلول‌های فیروبلاست موش انجام گرفت؛ سلول‌های جدا شده در محیط کشت DMEM high glucose به همراه ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی FBS و ۱ درصد آنتی بیوتیک penicillin/streptomycin در شرایط استاندارد ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 ۵ درصد، در انکوباتور نگهداری شدند و هر سه روز یکبار، محیط کشت عوض شد تا به پاساژ سوم رسیدند؛ پس از پاساژ سوم، سلول‌ها برای انجام آزمایش MTT آماده بودند. سلول‌های زنده، ترکیب MTT را به بلورهای آبی نامحلول فورمازان تبدیل می کنند درحالی که سلول‌های مرده، توانایی این کار را ندارند؛ در نهایت با دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر، مقدار جذب نمونه‌ها بررسی شدند. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیسی فعال هستند، رابطه‌ای مستقیم دارد. به منظور حذف خطاهای تصادفی و بهبود صحت نتایج، تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

نتایج و بحث

مؤلفه‌های مؤثر بر فرایند الکتروریسی محلول کیتوسان/پلی اتیلن اکسید بررسی شدند و تأثیر آنها بدین صورت بود: با تغییر ولتاژ از ۱۵ تا ۲۵ کیلوولت، در ولتاژ ۲۰ کیلوولت جت پایدار و الیاف مطلوب و بدون قطره روی صفحه آلومینیومی تشکیل شد؛ در ولتاژ ۲۰ کیلوولت، مطلوب ترین فاصله برای تشکیل نانوالیاف، ۱۰ سانتی متر به دست آمد. با قراردادن نرخ تغذیه ۰/۵ میلی لیتر بر ساعت، الیافی مطلوب با حداقل قطره و پاشش مناسب روی فویل به دست آمدند.

نانوالیاف‌های الکترورسی شده، از کیتوسان و پلی‌اتیلن اکسید حاوی درصدهایی مختلف از عصاره حنا به دست آمدند (شکل ۲)؛ این تصاویر نشان می‌دهند که الیافی بدون گره و با توزیع قطر باریک و یکنواخت در الکترورسی محلول پلیمری حاوی ۱ درصد عصاره حنا تشکیل شده‌اند؛ توزیع قطر این نانوالیاف در محدوده ۹۵ نانومتر است (شکل ۳)؛ همچنین با افزایش عصاره حنا، گره‌ها افزایش یافته، توزیع قطر نانوالیاف نیز افزایش می‌یابد.

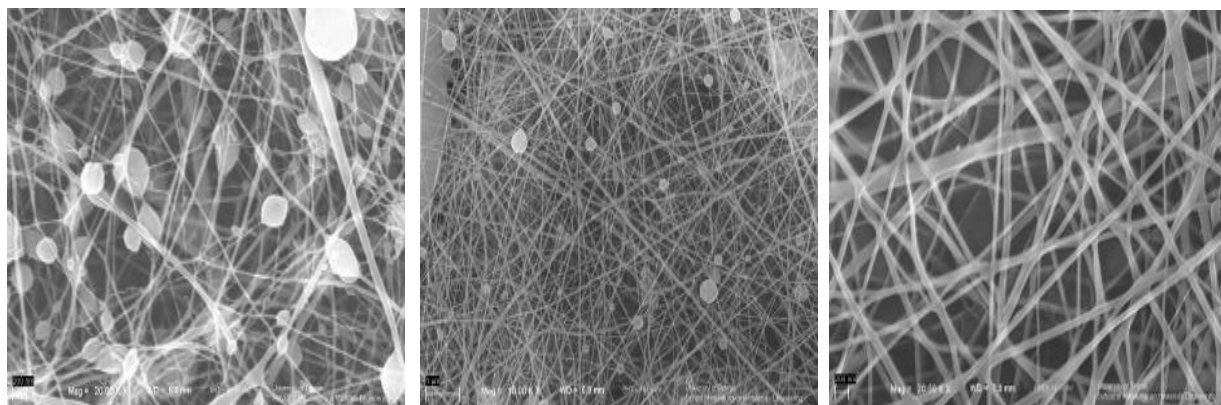
همان‌گونه که اشاره شد، کیتوسان به دلیل کشش سطحی بالا، به‌تنهایی قادر به تشکیل جت پایدار نیست و به‌صورت قطرات ریز از نوک نازل خارج می‌شود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) حاصل از فرایند الکترورسی محلول کیتوسان، نشان‌دهنده ساختاری با قطراتی کوچک از محلول پلیمر بوده، نشان می‌دهند که هیچ لیفی روی صفحه جمع‌کننده تشکیل نشده است (شکل ۱). درحالی‌که تصاویر SEM حاصل از مخلوط کیتوسان و پلی‌اتیلن اکسید، الیافی مناسب را نشان دادند که دارای توزیع قطر باریک و یکنواخت بوده، بدون گره‌اند؛ توزیع قطر این نانوالیاف در محدوده ۷۰ نانومتر است؛ همچنین، تصاویر SEM



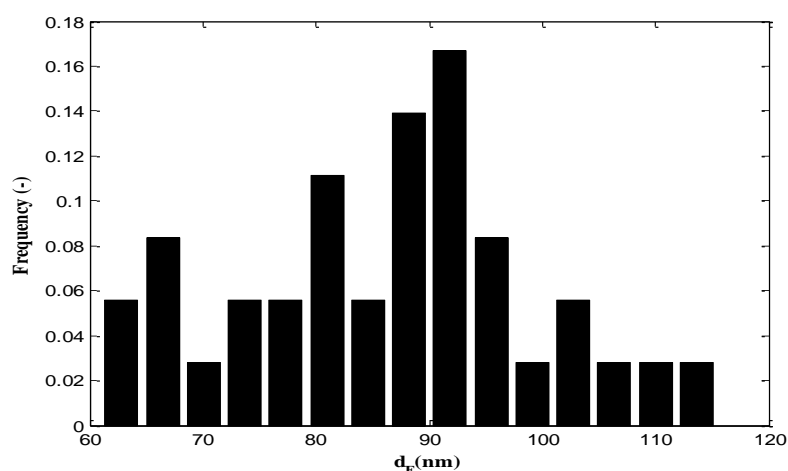
شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوالیاف حاصل از محلول کیتوسان خالص در غلظت ۳ درصد

جدول ۱. ناحیه عدم رشد باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت برای داربست نانوالیاف کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید در حضور و عدم حضور عصاره حنا

اندازه عدم رشد باکتری گرم مثبت (mm)	اندازه عدم رشد باکتری گرم منفی (mm)	نوع داربست نانوالیافی
۰	۷	داربست نانوالیاف کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید
۱۴	۱۶	داربست نانوالیاف کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید/حنا



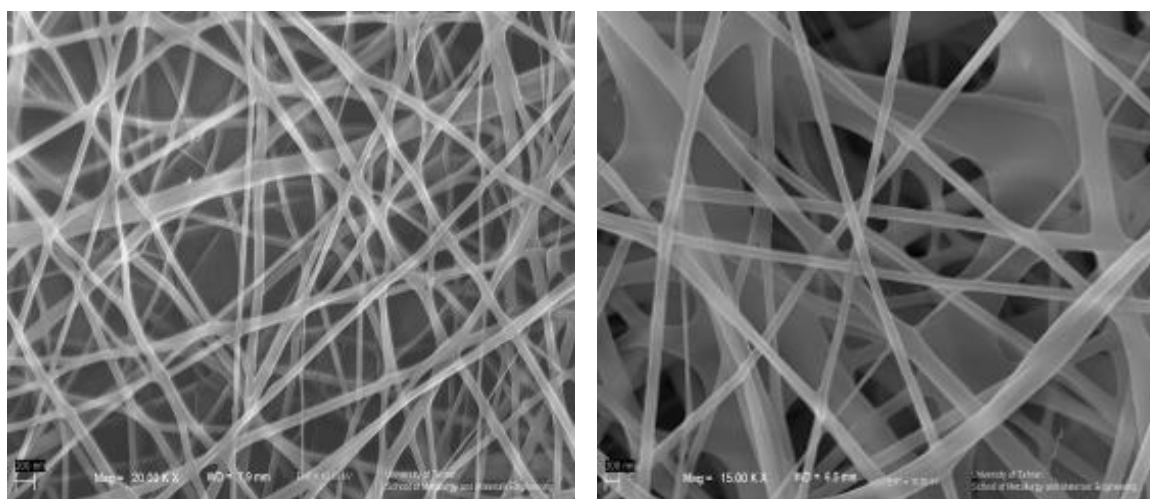
شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوالیاف حاصل از محلول کیتوسان/پلی اتیلن اکسید با نسبت ۹۰ به ۱۰ حاوی؛ الف) ۱ درصد؛ ب) ۲ درصد و ج) ۳ درصد از عصاره حنا



شکل ۳. نمودار توزیع قطر نانوالیاف بهینه شده کیتوسان/پلی اتیلن اکسید حاوی ۱ درصد عصاره حنا

پس از آن، تغییرهای ساختار داربست‌های نانوالیاف پیش و پس از قرارگیری در محلول بافر استات با میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شدند؛ نتایج حاصل نشان دادند که نمونه‌های حاوی ماده مؤثره حنا در مجاورت با محلول بافر استات، پس از ۲۴ ساعت، ساختار خود را به‌طور کامل حفظ کرده‌اند (شکل ۴).

به‌منظور بررسی پایداری داربست نانوالیاف در محیط پوست بدن، داربست‌های نانوالیاف حاوی ۱ درصد عصاره حنا، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محلول بافر استات غوطه‌ور شدند؛ سپس نمونه‌های خارج شده از محلول به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار داده شدند تا به‌طور کامل، خشک شوند؛

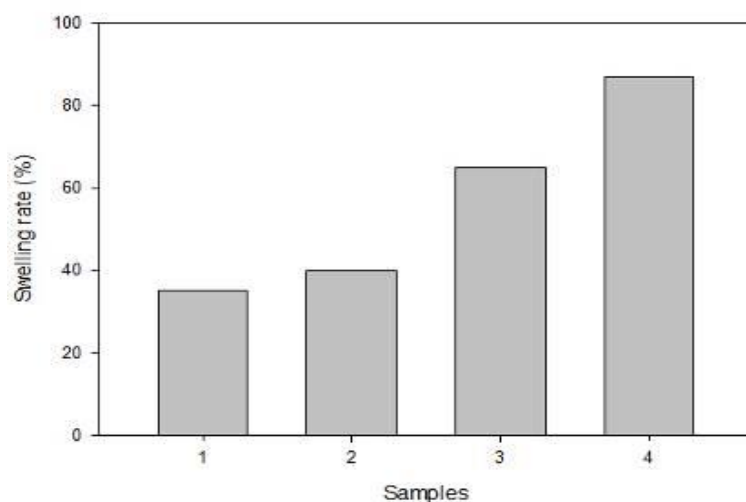


شکل ۴. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوالیاف؛ الف) پیش و ب) پس از غوطه‌وری در محلول بافر استات به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

عصاره حناست، میزان جذب آب آن قابل قبول است. با توجه به اینکه میزان تورم نانوالیاف روی رهایش ماده مؤثره، بسیار تأثیر دارد، بنابراین می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری کرد که با افزایش میزان تورم داربست نانوالیاف، ماده مؤثره سریع‌تر از میان نانوالیاف خارج و به محیط رهایش وارد می‌شود؛ از طرف دیگر، افزایش میزان تورم به این معنی است که داربست نانوالیاف، رطوبتی بیشتر را در خود حفظ می‌کند در نتیجه در تمام مراحل ترمیم زخم، سطح زخم تا حدودی مرطوب می‌ماند که این امر، موجب می‌شود که داربست نانوالیاف به زخم نچسبد و در حین برداشتن آن از روی سطح زخم، باعث ناراحتی بیمار نشود و عبور و مرور اکسیژن روی آن به آسانی انجام گیرد؛ بدین ترتیب، سرعت بهبود و ترمیم زخم افزایش می‌یابد.

پایداری داربست‌های نانوالیاف حاوی عصاره حنا، به دلیل حضور ۹۰ درصدی کیتوسان و به هم پیوستن مولکول‌های این پلیمر است که در این حالت، مولکول‌های آب به سختی به داخل شبکه‌های داربست نفوذ می‌کنند.

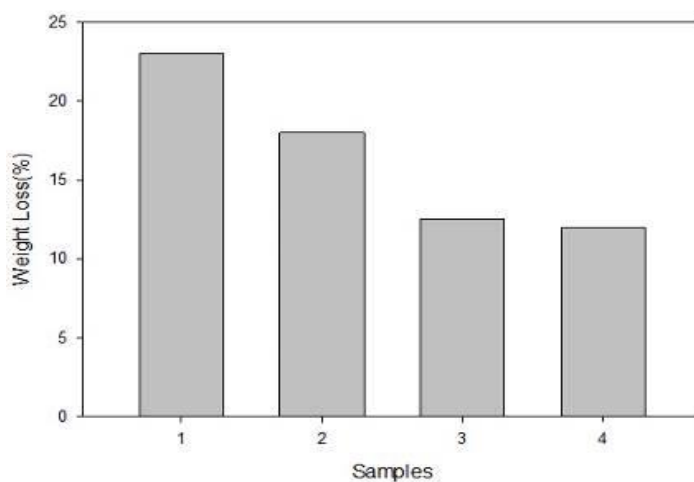
همان‌گونه که در شکل ۵ دیده می‌شود، بررسی میزان جذب آب توسط داربست‌های نانوالیاف نشان داد که نانوالیاف کیتوسان/پلی‌اتیلن اکساید، کمترین میزان جذب آب را داشته، با افزودن عصاره حنا به داربست‌های این نانوالیاف، میزان جذب و محتوای آب افزایش می‌یابد؛ اما وجود حنا که ترکیبی با وزن ملکولی پایین است، در داربست نانوالیافی، نقش نوعی پلاستی‌سایزر را ایفا می‌کند؛ در واقع، پلاستی‌سایزرها نیروی بین‌مولکولی میان زنجیره‌های مجاور ماکرومولکول‌ها را تضعیف می‌کنند و سبب افزایش حجم نانوالیاف می‌شوند؛ از طرف دیگر، افزودن پلاستی‌سایزر به نانوالیاف کیتوسان/پلی‌اتیلن اکساید به علت خصوصیات هیگروکوپیک مناسب، میزان رطوبت الیاف را افزایش داده، موجب انعطاف‌پذیری داربست نانوالیاف می‌شود. اگرچه داربست حاوی ۱ درصد عصاره حنا دارای میزان جذب آبی بیشتر نسبت به داربست بدون



شکل ۵. میزان جذب آب داربست‌های نانوالیاف کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید؛ الف) بدون عصاره حنا، ب) حاوی ۱ درصد عصاره حنا؛ ج) حاوی ۲ درصد عصاره حنا و د) حاوی ۳ درصد عصاره حنا

بین ملکولی پلیمر کیتوسان، تضعیف و تخریب هیدرولیتیکی تسریع می‌شود.

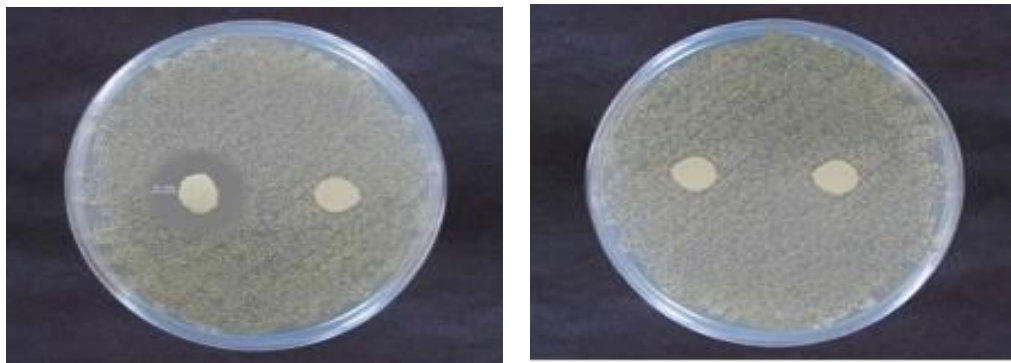
بررسی تخریب‌پذیری داربست‌های نانوالیاف تهیه‌شده (شکل ۶) نشان داد که بیشترین درصد تخریب‌پذیری به داربست نانوالیاف کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید حاوی ۳ درصد عصاره حنا مربوط است؛ در واقع، عصاره حنا به دلیل دارا بودن وزن مولکولی پایین، نیروی بین‌مولکولی مابین زنجیره‌های کیتوسان و پلی‌اتیلن اکسید را تضعیف می‌کند و با افزایش درصد عصاره حنا، نیروی



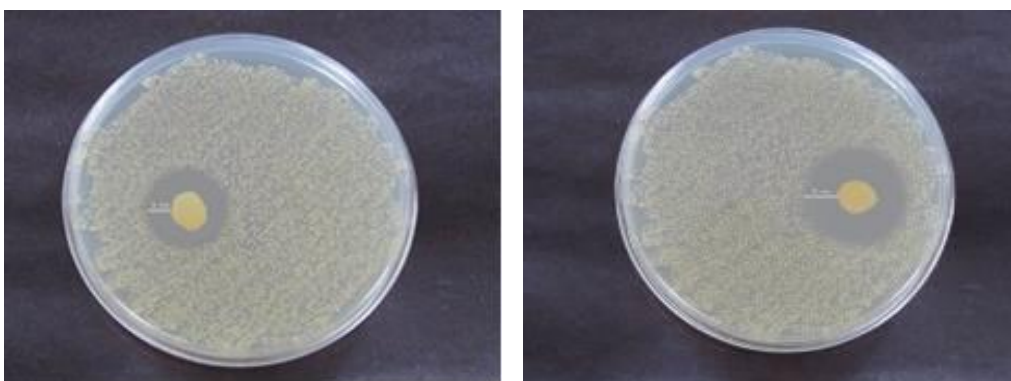
شکل ۶. میزان تخریب‌پذیری داربست‌های نانوالیاف کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید؛ الف) حاوی ۳ درصد عصاره حنا؛ ب) حاوی ۲ درصد عصاره حنا؛ ج) حاوی ۱ درصد عصاره حنا و د) بدون عصاره حنا

کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید حاوی عصاره حنا، در هر دو پلیت حاوی باکتری گرم مثبت و منفی، هاله عدم رشد مشاهده شد (شکل ۸) و این بدین معنی است که عصاره حنا، غشای باکتری گرم منفی و مثبت را تخریب کرده است. در جدول ۱، ناحیه عدم رشد باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت برای همه نمونه‌های داربست نشان داده شده است.

در آزمایش‌های میکروبی داربست‌های نانوالیاف مدنظر به روش صفحه آگار، قطر هاله تشکیل شده به‌عنوان شاخص میزان فعالیت ضد میکروبی داربست‌ها در نظر گرفته شد؛ نتایج به دست آمده برای داربست‌های نانوالیاف کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید نشان داد که در پلیت‌های حاوی باکتری گرم منفی، هاله عدم رشد مشاهده شد؛ اما این اثر در پلیت‌های حاوی باکتری گرم مثبت، رؤیت نشد (شکل ۷). در خصوص داربست



شکل ۷. فعالیت آنتی‌باکتریالی داربست نانوالیاف کیتوسان / پلی‌اتیلن اکسید در الف) باکتری گرم مثبت و ب) باکتری گرم منفی



شکل ۸. فعالیت آنتی‌باکتریالی داربست نانوالیاف کیتوسان / پلی‌اتیلن اکسید/عصاره حنا در الف) باکتری گرم مثبت و ب) باکتری گرم منفی

جذبی خیلی بیشتر را در مقایسه با کنترل منفی نشان می‌دهند و این گویای این مطلب است که نه تنها داربست‌های نانوالیافی اثر سمیت نداشته بلکه محیطی

آزمایش‌های تکثیر و سیتوتوکسوسیتی با استفاده از روش MTT برای سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان دادند که تمامی داربست‌ها در هر سه زمان، میزان

عصاره حنا، انتخابی مناسب به عنوان پوشش زخم باشد، زیرا هم رطوبتی قابل قبول را در خود حفظ می‌کند و هم میزان درصد تخریب‌پذیری آن نسبت به نانو الیاف حاوی ۲ و ۳ درصد حنا کمتر است.

آزمایش‌های میکروبی نشان دادند که داربست نانوالیاف کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید تنها در مجاورت محیط کشت حاوی باکتری گرم منفی، خاصیت میکروبی داشته، در مجاورت محیط کشت حاوی باکتری گرم مثبت، خاصیت میکروبی ندارد اما داربست نانوالیاف کامپوزیتی کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید/عصاره حنا به دلیل حضور ماده مؤثره عصاره حنا و کیتوسان، در مجاورت محیط کشت حاوی هر دو نوع باکتری گرم مثبت و گرم منفی، دارای خاصیت میکروبی است. آزمایش‌های کشت سلولی نشان دادند که تمامی داربست‌های نانوالیاف در هر سه زمان مورد بررسی، میزان جذبی خیلی بیشتر را در مقایسه با کنترل منفی نشان می‌دهند و این گویای آن است که نه تنها داربست‌های نانوالیافی اثر سمیت نداشته بلکه محیطی مناسب نیز برای رشد سلول‌های فیبروبلاستی هستند.

همه این نتایج نشان می‌دهند که داربست نانوالیاف کامپوزیتی کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید حاوی ۱ درصد عصاره حنا می‌تواند انتخابی مناسب برای پوشش زخم باشد و موجب تسهیل فرایند ترمیم زخم شود؛ علاوه بر این، پوشش‌های نانوالیاف حاوی ماده مؤثره می‌توانند علاوه بر مؤثرتر بودن در درمان زخم‌ها، هزینه‌های درمان را نیز کاهش دهند.

منابع

1. Poole CP, Owens FJ. editors. Introduction to Nanotechnology: John Wiley & Sons 2003.
2. Jayaraman K, Kotaki M, Zhang YZ, Mo XM, Ramakrishna S. Recent Advances in Polymer Nanofibers. Journal of Nanoscience and Nanotechnology 2004; 4: 52-65.
3. Hulteen JC, Chen HX, Chambliss CK, Martin CR. Template Synthesis of Carbon Nanotubule and Nanofiber Arrays. Nanostructured Materials 1997; 9: 133-36.
4. Ma PX, Zhang RY. Synthetic Nanoscale Fibrous Extracellular Matrix. Journal of Biomedical Materials Research 1999; 46: 60-72.
5. Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI. Peptide-Amphiphile Nanofibers: A Versatile Scaffold for the Preparation of Self-Assembling Materials. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2002; 99: 5133-38.

مناسب نیز برای رشد سلول‌های فیبروبلاستی هستند. میزان جذب بیشتر مربوط به داربست نانوالیاف کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید/عصاره حناست. هرچه میزان درصد جذب بیشتر باشد، نشان‌دهنده این است که تعداد سلول‌ها بیشتر بوده، سلول‌ها زنده و فعال هستند. به طور کلی، استفاده از پلیمر طبیعی کیتوسان و عصاره حنا می‌تواند محیطی مناسب برای چسبندگی و تکثیر سلول باشد؛ بنابراین، رشد سلول‌های فیبروبلاستی در داربست این نانوالیاف‌ها، موجب افزایش تولید کلاژن به منظور ترمیم بافت آسیب‌دیده می‌شود.

نتیجه‌گیری

روش الکترورسی، روشی ساده و ارزان برای تولید نانوالیاف پلیمری است؛ در این طرح، داربست نانوالیاف پلیمری کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید با نسبت وزنی ۹۰ به ۱۰ و داربست نانوالیاف کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید/عصاره حنا، توسط فرایند الکترورسی مورد مطالعه قرار گرفت.

بررسی پایداری داربست‌های نانوالیاف کامپوزیتی نشان داد که نمونه‌های حاوی ماده مؤثره حنا در مجاورت با محلول بافر استات، پس از ۲۴ ساعت، ساختار خود را حفظ کرده‌اند. در بررسی آزمون‌های تخریب‌پذیری و میزان جذب آب مشاهده شد که بیشترین درصد تخریب‌پذیری و جذب آب به نانوالیاف کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید حاوی ۳ درصد عصاره حنا و کمترین آن به نانوالیاف کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید، مربوط است. با توجه به نتایج حاصل به نظر می‌رسد که داربست کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید حاوی ۱ درصد

6. Hossain Z, Afroz H, Fakroddin M. editors. Prospect and Application of Nanobiotechnology: A Medical Perspective. Nanobiotechnology 2012.
7. Yarin AL, Koombhongse S, Reneker DH. Bending Instability in Electrospinning of Nanofibers. Journal of Applied Physics 2001; 89: 3018-26.
8. Reneker DH, Yarin AL, Fong H, Koombhongse S. Bending Instability of Electrically Charged Liquid Jets of Polymer Solutions in Electrospinning. Journal of Applied Physics 2000; 87: 4531-47.
9. Reneker DH, Chun I. Nanometre Diameter Fibers of Polymer, Produced by Electrospinning. Nanotechnology 1996; 7: 216-23.
10. Srinivasan G, Reneker DH. Structure and Morphology of Small-Diameter Electrospun Aramid Fibers. Polymer International 1995; 36: 195-01.
11. Ramakrishna S, Fujihara K, Teo WE, Lim TC, Ma Z. editors. An Introduction to Electrospinning and Nanofibers. World Scientific Publishing Company 2005.
12. Ma PX, Zhang R. Synthetic Nano-Scale Fibrous Extracellular Matrix. Journal of Biomedical Materials Research 1999; 46: 60-72.
13. Queen H. Electrospinning Chitosan-Based Nanofibers for Biomedical Application. Textile Engineering, M. Sc. Thesis. USA: North Carolina State University 2006.
14. Tchemtchoua VT, et al. Development of a Chitosan Nanofibrillar Scaffold for Skin Repair and Regeneration. Biomacromolecules 2011; 12: 3194-04.
15. Zahedi P, Rezaeian I, Ranaei-Siadat SO, Jafari SH, Supaphol P. A Review on Wound Dressings with an Emphasis on Electrospun Nanofibrous Polymeric Bandages. Polymers for Advanced Technologies 2010; 21: 77-95 .
16. Ignatova M, Starbova K, Markova N, Rashkov L. Electrospun Nanofiber Mats with Antibacterial Properties from Quaternized Chitosan and Poly (Vinyl Alcohol). Carbohydrate Research 2006; 341: 2098-07.
17. Desai K, Kit K, Li J, Zivanovic S. Morphological and Surface Properties of Electrospun Chitosan Nanofibers. Biomacromolecules 2008; 9: 1000-06.
18. An J, Zhang H, Zhang JT, Zhao YH, Yuan XY. Preparation and Antibacterial Activity of Electrospun Chitosan/Poly(Ethylene Oxide) Membranes Containing Silver Nanoparticles. Colloid and Polymer Science 2009; 287: 1425-34.
19. Zhang Y, Huang X, Duan B, Wu L, Li S, Yuan X. Preparation of Electrospun Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Membranes. Colloid and Polymer Science 2007; 285: 855-63.
20. Ignatova M, Manolova N, Markova N, Rashkov L. Electrospun Non-Woven Nanofibrous Hybrid Mats Based on Chitosan and PLA for Wound-Dressing Applications. Macromolecular Bioscience 2009; 9: 102-11.
21. Desai K, Kit K. Effect of Spinning Temperature and Blend Ratios on Electrospun Chitosan/Poly(Acrylamide) Blends Fibers. Polymer 2008; 49: 4046-50.
22. No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. Antibacterial Activity of Chitosans and Chitosan Oligomers with Different Molecular Weights. International Journal of Food Microbiology 2002; 74: 65-72.
23. Ravi Kumar MNV. A Review of Chitin and Chitosan Applications. Reactive and Functional Polymers 2000; 46: 1-27.
24. Zumrutdal E, Ozaslan M. A Miracle Plant for the Herbal Pharmacy: Henna (Lawsonia Inermis). International Journal of Pharmacology 2012; 8: 483-89.
25. Li Q, Gao WQ, Zhao YQ. Advances in Studies on Chemical Constituents and Biological Activities of Lawsonia Inermis. China Journal of Chinese Materia Medica 2013; 38: 795-99.
26. Philip JP, Madhumitha G, Mary SA. Free Radical Scavenging and Reducing Power of Lawsonia Inermis L. Seeds. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2011; 4: 457-61.
27. Prakash D, Suri S, Upadhyay G, Singh BN. Total Phenol, Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Some Medicinal Plants. International Journal of Food Sciences and Nutrition 2007; 58: 18-28.
28. Adetutu A, Owoade OA, Oyekunle OS. Comparative Effect of Some Medicinal Plants on Sodium Arsenite-Induced Clastogenicity. International Journal of Pharma and Bio Sciences 2013; 4: 777-83.
29. Berenji F, Rakhshandeh H, Ebrahimipour H. In Vitro Study of the Effect of Henna Extracts (Lawsonia Inermis) on Malassezia Species. Jundishapur Journal of Microbiology 2010; 3: 125-28.

Daneshvar
Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
22nd Year, No.117
June- July, 2015*

Received: 03/05/2015

Last revised: 09/06/2015

Accepted: 15/06/2015

Preparation of chitosan and *Lawsonia inermis* nano-fiber and evaluation of its antibacterial and biocompatibility properties

Minoo Sadri^{1*}, Iman Yousofi¹, Hossein Vatani²

1. Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.
2. Samen Pharmaceutical Company, Iran.

* E-mail: minoosadri92@gmail.com

Abstract

Background and Objective: *Lawsonia inermis* (henna) has unique properties and has been used as a medicine since the past. In this project, a polymeric nanofiber composite from Chitosan/Polyethylene oxide/Henna extract was produced as a wound's cover by electrospinning method.

Materials and Methods: Polymeric nanofibers were prepared by electrospinning method. In order to study the effect of henna on nanofiber properties, different nanofibers were prepared without henna and in the presence of henna extract. A scanning electron microscope was used in order to study the morphology and diameter of electrospun nanofibers. The average diameters of prepared nanofibers was obtained by Image J software.

Results: The affecting parameters on the nanofiber properties were studied and optimized. The optimum conditions for preparation of nanofibers with diameters less than 100 nm are: voltage; 20 KV, feed rate; 0.5 ml/h, nozzle-collector's distance; 10 cm and Chitosan/Polyethylene oxide weight ratio; 0.9. The average diameter of prepared nanofiber at optimized conditions was 95 nm.

Conclusion: The obtained results showed that the nanofibers containing henna extract have high stability. Moreover, water absorption and degradation of nanofibers increased as the amount of henna was increased. According to our results, it seems that the chitosan/PEO/henna (1%) is a suitable choice for wound dressing that facilitate wound healing procedure.

Keywords: Nanofiber, Chitosan, Henna extract, Polyethylene oxide, Antibacterial