

The Preparation of Nanofibers Chitosan/Polyethylene Oxide (PEO)/from(and) Henna (extract)Plant for Medicine Application

Gholamreza Herfehdoost¹, Minoosadri^{*2}, Narjes Pashmforosh¹, Davodzolfagari³, Asgar Emamgholi³

¹Department of Nanotechnology, Pharmacy Unit of Azad University, Tehran, Iran

²Department of biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

³Neuroscience research center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 19 Jan, 2014 Accepted: 27 Feb, 2014

Abstract

Background & Objectives: Electro spinning is a method to produce the submicron nanofiber polymer in fibers produced by this technique have a unique feature in the medical field due to their high porosity and strength, Chitosan has been used as antimicrobial and healing properties, but because of its high viscosity it is unable to form nanofibers by it self. To overcome this problem, the polymers such PEO and PVE are used. Henna extract because of its ability to Boost the growth, antibacterial and healing properties were used to form nanofibers with the above polymers.

Material and Methods: The solution of chitosan, polyethylene oxide and henna in ratio ranges of 40/60 up to 10/90 were prepared. Then stabilized on the cell culture medium and then after fibroblast cells were culture on it.

Results: No significant difference was detected between nanofibers cell cultured compared to controls. As healing of burn or wound is the growth of fibroblast cell and inhabitation of wound infection. Thus nanofibers could potentially be used for ulcer healing and bacterial growth prevention. Thereby the chitosan and henna is a candidate because of its anti-bacterial and boost growth boosting effect.

Conclusion: As a result, Chitosan and henna as a candidate anti-bacterial and healing can be used.

Keywords: Electro Spinning, Chitosan, Henna, Fibroblast

*Corresponding author:

E-mail: Mnsadri@yahoo.com

مقاله پژوهشی

تهیه نانو الیاف کیتوسان/پلی اتیلن اکساید/عصاره حنا برای کاربردهای پزشکی

غلامرضا حرفه دوست^۱، مینو صدری^{۲*}، نرگس پشم فروش^۱، داود ذوالفقاری^۲، عسگر امامقلی^۳

^۱گروه نانو تکنولوژی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران، تهران، ایران
^۲پژوهشکده فناوری های زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر تهران، تهران، ایران
^۳مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) تهران، تهران، ایران

دریافت: ۹۲/۱۰/۲۹ پذیرش: ۹۲/۱۲/۸

چکیده

زمینه و اهداف: الکترورسی فرآیندی جهت تهیه الیاف پلیمری زیر میکرون می باشد. الیاف حاصل از این تکنیک به دلیل مقاومت و تخلخل بالا، ویژگیهای منحصر به فردی را در حیطه پزشکی و دارویی نشان داده اند. کیتوزان از جمله پلیمرهایی است که اثرات ضد میکربی و ترمیم کننده آن به اثبات رسیده است. به علت ویسکوزیته بالایی که کیتوسان دارد به تنهایی قادر به تولید نانو الیاف نمی باشد فلذا برای غلبه به این مشکل از پلیمرهایی از قبیل PEO و PVE استفاده میگردد. عصاره حنا به دلیل توانایی هایی از قبیل تقویت رشد، آنتی باکتریال بودن، التیام و تسریع در بهبود زخم به همراه پلیمر های فوق در تهیه نانو الیاف استفاده گردید.

مواد و روش ها: با کمک دستگاه الکترورسی محلول پلیمری از کیتوزان و پلی اتیلن اکساید و عصاره حنا به نسبت های ۴۰/۶۰ تا ۱۰/۹۰ تهیه گردید و در داخل محیط کشت سلولی تثبیت و سلولهای فیبروبلاستی بر روی آن کشت داده شد.

یافته ها: نتایج کشت بر روی نانوفیبر نسبت به شاهد تفاوت معنی داری (از لحاظ مورفولوژی و مرگ سلولی) نداشت و با توجه به اینکه یکی از مراحل درمان و بهبود جای سوختگی یا زخم، رشد سلولهای فیبروبلاستی و مهار عفونت محل زخم می باشد، می توان از نانو الیاف تهیه شده جهت تسریع در بهبود زخم و ممانعت از رشد باکتری استفاده کرد.

نتیجه گیری: در نتیجه کیتوزان و حنا به عنوان کاندید آنتی باکتریال و التیام زخم می توانند استفاده گردند.

کلید واژه ها: الکترورسی، کیتوزان، حنا، فیبروبلاست

ایمیل نویسنده ارتباط: Mnsadri@yahoo.com

مقدمه

که هر یک به نوبه خود تأثیر بسزایی را در درمان و ترمیم ارگانهای بدن انسان دارند. از روشهای مختلفی برای تولید نانو الیاف استفاده میگردد (۱-۲). ساخت داربست مناسب برای کشت سلول یکی از مهمترین پارامترهای مهندسیافت می باشد. یک داربست خوب باید بتواند ساختار فیزیکی و شیمیایی ماتریکس خارج سلولی را که شبکه ای متخلخل از انواع فیبرها و پروتئینهاست شبیه سازی نماید (۳). در این میان سنتز نانوالیاف با استفاده از تکنیک

نانوتکنولوژی با ورود خود به عرصه های مختلف علمی تحولی شگرف را به وجود آورد. یکی از زمینه هایی که توانست با استفاده از مواد نانو مقیاس رشد چشمگیری نماید بیوپزشکی است. به همین دلیل شاخه های مختلف حوزه بیوپزشکی همچون مهندسی بافت و سیستم های رهایش دارو در سالهای اخیر محصولات بسیار متنوع و کاربردی را با بازده بالا تولید نموده اند. علت اصلی این رشد استفاده از نانو الیاف و نانوداروهای است

آلمان)، کتامین و زایلازین (شرکت آلفاسن هلند)، سرم و محیط کشت α -MEM (شرکت جیبکوری انگلیس) تهیه شدند. موش های صحرائی (رت) نر بالغ جهت استخراج سلولها از آزمایشگاه حیوانات مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی بقیه ... (عج) تهیه گردید.

الکتروریسی

شکل ۱ طرح شماتیک دستگاه الکتروریسی برای سنتز نانوالیاف را نشان میدهد. با استفاده از محلول های ۲٪ کیتوسان و ۳٪ PEO می-توان نسبت های مختلف وزنی مخلوط پلیمری کیتوسان-PEO تهیه کرد. مثلا وقتی گفته می شود نسبت ۹۰ به ۱۰ کیتوسان-PEO، منظور نسبت حجمی ۹۰ به ۱۰ کیتوسان ۲٪ به ۳٪ PEO است. سپس ۰/۰۵ میلی لیتر تریتون X100 و ۲ میلی لیتر عصاره حنا را در یک بالن ژورژه و به کمک همزن مغناطیسی به مدت ۳ ساعت مخلوط شد. در یک سرنگ ۵ میلی لیتر ریخته و توسط سر سوزن شماره ۱۸ در فاصله ۱۵ سانتیمتری جمع کننده در دستگاه الکتروریسی (شرکت فناورسان ایران) قرار داده شد. نانوالیاف با استفاده از ولتاژ ۲۰ کیلووات با میزان تزریق یک میلی لیتر در ساعت تهیه گردید. شکل و میانگین قطر نانوالیاف حاصل از روند الکتروریسی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM (هیتاچی ژاپن) تعیین شد.

برای تهیه SEM از نانوالیاف تهیه شده ابتدا یک بخش کوچک از شبکه نانوالیاف الکتروریسی شده روی پایه نگهدارنده نمونه قرار داده شد. سپس با دستگاه لایه نشانی طلا نمونه با طلا روکش گردید. نمونه ها در محل مربوطه دستگاه قرار گرفته و تصاویر با بزرگنمایی های مختلف تهیه گردید.

برای استخراج سلول ها از لاله گوش موش صحرائی بالغ نژاد ویستار استخراج گردید. بدین ترتیب که پس از بیهوش کردن حیوان با مخلوط ۵۰ mg/kg کتامین و ۵ mg/kg زایلازین، توسط محلول بتادین جراحی و الکل ۷۰ درصد اندام خلفی و لاله گوش حیوان به طور کامل ضد عفونی گردید. سپس لاله گوش با پروتکل استخراج و در زیر هود در فلاسک مخصوص کشت سلولی حاوی محیط کشت α -MEM حاوی یک درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین و ۱۰٪ FBS ریخته، و سپس در انکوباتور CO₂ (MMM/انگلیس) قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت سلولی با محلول PBS استریل شستشو و با محیط تازه تعویض شد.

از سلول های فیروبیلاست پاساژ دوم مرحله قبل سوسپانسیون سلولی تهیه و پس از بررسی تعداد در واحد حجم و زنده و مرده بودن آنها توسط تریپان بلو، تعداد 5×10^3 سلول به هر کدام از خانه های پلیت ۱۲ خانه ای مذکور اضافه شد و سپس در انکوباتور CO₂ قرار داده شد.

برای بررسی میزان رشد و تکثیر سلول ها، هر کدام از خانه ها در روزهای دوم، چهارم و ششم با میکروسکوپ اینورت (Leica/آلمان) مشاهده و توسط دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ (Infinity/کانادا) با بزرگنمایی های مختلف عکس گرفته شد. جهت شمارش سلول ها، ۵ میدان میکروسکوپی

الکتروریسی به علت ویژگیهای خوب آن نظیر افزایش سطح تماس، انعطاف، تخلخل و اندازه های نانومتری تا چند میکرون می تواند جایگزین مناسبی برای ماتریکس خارج سلولی باشد (۵-۲). و نیز از پلیمرهای مختلف برای این اهداف استفاده می شود که در تحقیق اخیر از کیتوزان و پلی اتیلن اکساید استفاده گردیده است.

کیتوزان (۲-آمینو-۲-داکسی- β -D-گلوکز) می باشد و از N-داستیله شدن مشتقات کیتین بدست می آید و از فراوانترین پلی ساکاریدهایی است که در جهان موجود می باشد (دیواره سخت پوستان) و به خاطر فعالیت زیستی بالا، غیر سمی بودن، زیست تخریب پذیری و زیست سازگاری بالایی که دارد توجه محققین را در زمینه های تهیه داربست های مهندسی بافت، رهایش کنترل شده دارو، تسریع در درمان سوختگی های پوستی و ... به خودش اختصاص داده است.

کیتوزان بهترین کاندید برای گرفتن فیبر می باشد و برای دست یابی به نانو فیبر های بهتر با پلیمر هایی دیگری ترکیب می کنند که از جمله پلیمرها می توان به پلی اتیلن اکساید PEO اشاره کرد که فرایند الکتروریسی با کیتوزان راتسهیل و نیز پتانسیل زیست سازگاری آن را بالایی برد PEO در حلالهای مختلفی چون آب، اتانل و کلروفرم قابل حل است. زیست سازگاری و غیرسمی بودن مهمترین فاکتورهای آن برای انتخاب در زمینه مهندسی بافت و التیام زخم می باشد. PEO دارای ویژگیهایی از قبیل ویسکوزیته عالی، هدایت پذیری و تمایل به سطح می باشد که این خواص در مورفولوژی و ساختار نانوفیبر تأثیر می گذارد (۱۲-۶).

برگهای حنا دارای تانن، صمغ، پنتوزان، کوئینون و فلاونوئید است. مهمترین ترکیب شناخته شده حنا لاوسون (Lawson) یا ۲-هیدروکسی-۱،۴-نفتاکینون می باشد که ماده اصلی رنگی در گیاه است. گل های حنا معطر و دارای اسانس است. حنا همچنین حاوی مانیتول و موسیلاژ است. لاوسون که ماده موثره حنا است به غیر از خاصیت رنگی دارای مزایایی از قبیل خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی، تقویت رشد و تسریع در بهبودی و التیام زخم می باشد که خاصیت ضد باکتریایی آن روی باکتری های گرم مثبت و منفی به اثبات رسیده است (۱۴-۱۳).

هدف نهایی از انجام این طرح تهیه نانوالیاف کیتوزان/PEO/عصاره حناست و با توجه به اینکه در مقالات معتبر به استفاده از نانوالیافهای طبیعی به عنوان داربستی در پوشش زخمها و سوختگی ها جهت درمان بهتر و سریعتر اشاره گردیده است. و با توجه به خاصیت ضد باکتریایی، تسریع در التیام زخم و تقویت رشد عصاره حنا، از عصاره حنا به عنوان ماده موثره درمانی در ترکیب با کوپلیمر اشاره شده برای تهیه نانو الیاف حاوی حنا استفاده در نهایت سلول های فیروبیلاست روی نانو الیاف کشت و نتایج آن بررسی گردید.

مواد و روشها

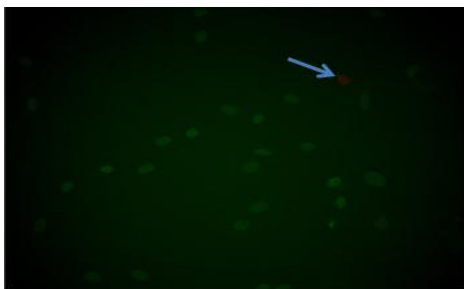
در این مطالعه از پودر کیتوسان با وزن ملکولی متوسط $10^6 \times 95$ (شرکت سیگما)، پودر پلی اتیلن با وزن مولکولی $10^5 \times 9$ (شرکت سیگما)، رنگها (همه شرکت مرک

شکل ۱) نشان داد که وجود عصاره حنا مانعی در رشد و تکثیر سلولی ایجاد نمی‌کند و تعداد سلول زنده در هر دو نمونه و کنترل حدود $92 \pm 0/8$ می‌باشد. پس می‌تواند در پانسمان زخم‌ها و سوختگی‌ها موثر باشد و از طرفی با توجه به مطالعات گسترده پیرامون خواص تقویت رشد سلول‌ها به کمک عصاره حنا در التیام و بهبودی سریع زخم می‌توان استناد کرد و از طرفی تحقیقات نشان داده است که کیتوسان و نیز عصاره حنا دارای خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی نیز می‌باشند که نتایج حاصل از تست حساسیت عصاره حنا در نانو الیاف روی محیط کشت مولر هیتون آگار علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی (شکل ۴) این موضوع را ثابت می‌کند. که تست روی باکتری‌های اشریشیا کولی و استافیلوکوکوس به عنوان شاخص انجام و نتایج حاصل بررسی گردید. نیز نتایج حاصل از بررسی شکل سلول‌های فیبروبلاست نشان داد که شکل و مورفولوژی سلول‌ها در محیط کنترل و نیز نانو الیاف اختلافی ندارند.

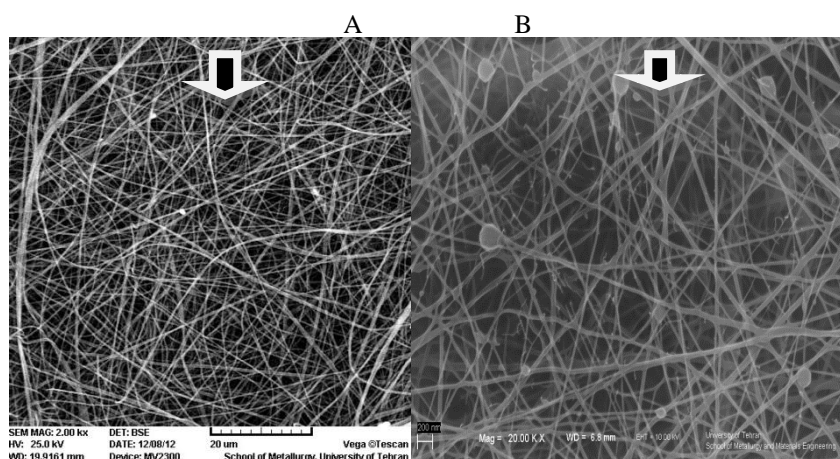
مختلف با عدسی شیئی $40\times$ به صورت تصادفی انتخاب، و تعداد سلول‌ها در هر میدان با استفاده از رنگ آمیزی اکریدین اورنج شمارش و میانگین آن محاسبه گردید (۱۶-۱۵).

یافته‌ها

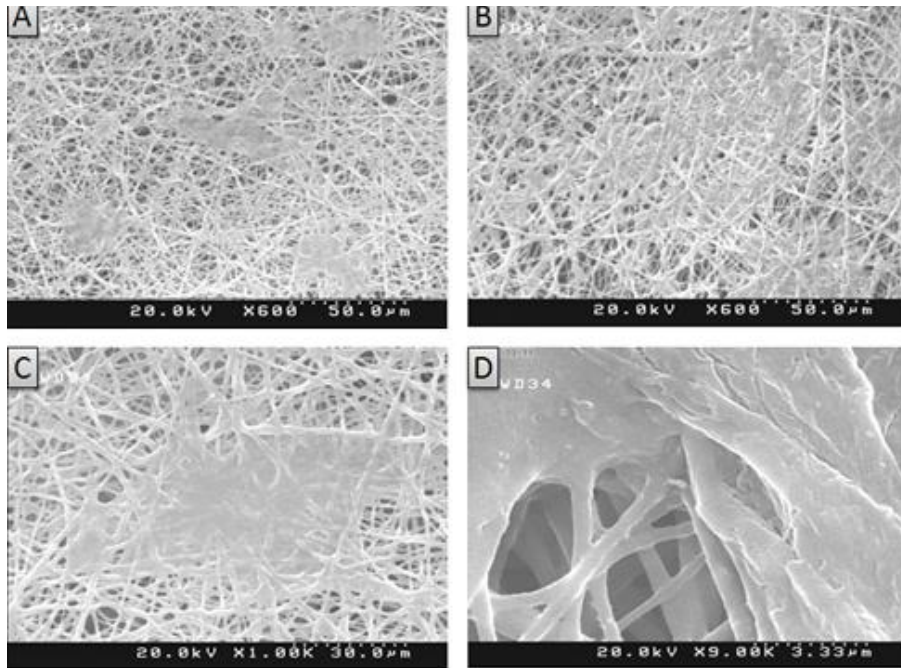
در عکس برداری از نانو الیاف توسط میکروسکوپ الکترونی (شکل ۲) قطر این الیاف بین 270 تا 700 نانومتر بود. تصاویر گرفته شده از سلول‌های کشت شده روی این الیاف نشان دهنده رشد و چسبندگی خوب این سلول‌ها در شبکه الیاف می‌باشد. چون هدف از این مطالعه بررسی رشد سلول‌های فیبروبلاست روی نانو الیاف تهیه شده فوق به منظور تهیه پانسمان زخم و نیز بستری در مهندسی بافت بود فلذا نتایج حاصل از رشد سلول‌های فیبروبلاست بر روی نانو الیاف و مقایسه آن با نمونه کنترل (حاوی محیط کشت بدون نانو الیاف، بررسی مورفولوژی سلول (شکل ۳)، مرگ سلولی و بررسی تست‌های زنده و مرده بودن سلولی)



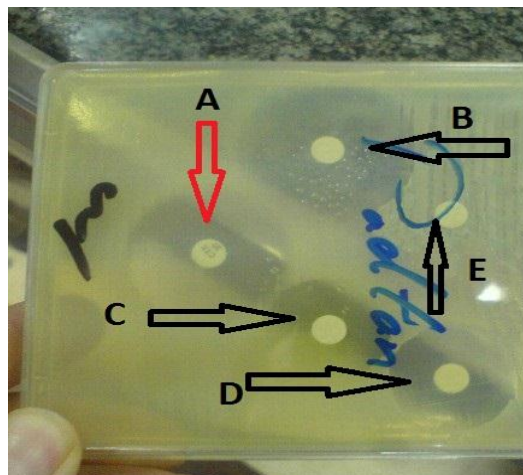
شکل ۱: رنگ آمیزی کریدین اورنج از سلول‌ها روی نانو الیاف کیتوسان/PEO/عصاره حنا. هسته سلول‌های سالم به رنگ سبز دیده می‌شود نوک پیکان هسته یک سلول مرده را که به رنگ نارنجی است نشان می‌دهد. عکس با عدسی $40\times$ توسط میکروسکوپ اینورتر گرفته شده است.



شکل ۲: SEM از نانو الیاف کیتوسان/ پلی اتیلن اکساید (A) و نانو الیاف کیتوسان/ پلی اتیلن اکساید/ عصاره حنا (B)



شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ الکترونی از کشت سلولهای نانو الیاف کیتوسان/PEO/عصاره حنا. (A) بعد از دو روز کشت تصویر با بزرگنمایی 600X، (B) بعد از چهار روز کشت تصویر با بزرگنمایی 600X، (C) تصویر یک سلول فیروبیلاست با بزرگنمایی 1000X، (D) تصویر همان سلول با بزرگنمایی 9000X که نشان دهنده چسبندگی و اتصال خوب سلول با نانو الیاف کیتوسان/PEO/عصاره حنا است.



شکل ۴: نتایج حاصل از تست بررسی خاصیت ضد باکتریایی نانو الیاف حاوی عصاره حنا. (A) کنترل مثبت با دیسک آنتی بیوگرام، (B) نمونه با دیسک حاوی نانو الیاف با عصاره حنا، (C) بررسی خاصیت ضد باکتریایی با عصاره خالص حنا، (D) محلول پلیمری و عصاره حنا، (E) کنترل منفی (دیسک خالی)

بحث

استفاده شده بود اما به دلیل سمی بودن آن که مانع رشد سلولی می شد استفاده نگردید و از تریتون ۸۰ به عنوان سورفاکتانت برای کاهش کشش سطح استفاده شد که در نتایج به تهیه نانو الیاف یکدست و با کمترین بید و اندازه کمتر کمک کرد.

امروزه بهترین گزینه در کاربردهای پزشکی بخصوص در درمان نقص یا آسیب در بدن به ویژه زخم و آسیب های پوستی استفاده از نانو الیاف می باشد که نانو الیاف کیتوسان پیشنهاد شده است. تجربیات مختلف نشان داده است که در این روش سرعت ترمیم جراحات نسبت به سایر روشهای مرسوم بیشتر بوده و از طرفی

نتایج حاصل از کشت نشان داد که سلولها توانستند بر روی داربست نانو الیاف کیتوسان/PEO/عصاره حنا که زیست سازگار و زیست تخریب پذیرند رشد و تکثیر مناسبی داشته و نیز بدون تمایز و مرگ سلولی باقی بمانند. برای تهیه نانو الیاف کیتوسان / پلی اتیلن اکساید از نسبت های ۶۰/۴۰ تا ۱۰/۹۰ استفاده گردید که نتایج حاصل از الکتروریسی نشان داد که بهترین حالت برای تهیه نانو الیاف نسبت ۸۰ کیتوسان به ۲۰ پلی اتیلن اکساید است. از اسید استیک ۵۰ درصد به عنوان حلال استفاده گردید و برای بالا بردن استحکام الیاف تولید شده طبق رفرنسها از گلو تار آلدهید

مورفولوژی سلول ها نیز طبیعی بوده است که نشان می‌دهد می‌توان از عصاره حنا به عنوان ماده آنتی باکتریال در کنار نانو الیاف برای درمان زخم ها و سوختگی ها بهره برد.

نتیجه گیری

نانو الیاف تشکیل شده روی فویل آلومینیومی بسیار شکننده و ترد است و امکان جدا کردن الیاف از آن بسیار مشکل می باشد و نیز دارای خاصیت سمی در محیط کشت است که از غشاء کیتوسان به عنوان بستری برای تهیه نانو الیاف استفاده گردید. کشت و تکثیر سلول‌های فیبرو بلاست روی نانو الیاف کیتوسان/PEO در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی داری (از لحاظ رشد، مرگ و میر، شکل ظاهری یا مورفولوژی) نداشت. با کشت سلول روی غشاء نازک کیتوسان، امکان جدا سازی آن از کف پلیت بدون کمک تریپسین یا EDTA وجود دارد و نیز امکان انتقال راحت آن به درون بدن موجود زنده را نیز به راحتی میسر می‌کند.

کیتوسان و عصاره حنا دارای خاصیت آنتی باکتریال بوده و مانع تحریک پاسخ‌های دفاعی علیه بدن می‌شود و در ترمیم و بهبودی نقش موثرتری دارند. چون هدف عمده از این طرح بررسی عدم ممانعت رشد سلول‌های فیرو بلاست روی کشت سلولی و به عبارتی در شرایط آزمایشگاهی بود که نتایج نشان دهنده حصول این هدف است و در آینده نانو الیاف بهینه شده به صورت پانسمان تهیه و اثرات آن روی زخم اعم از التیام، سرعت رشد و خاصیت آنتی باکتریال آن بررسی می گردد.

در تحقیقی که Mengyan و همکاران انجام دادند نشان داده شد که بعد کشت سلول های قلب رت روی نانو الیاف، سلول‌ها در مواجهه با نانو الیاف هم رشد و تکثیر خوبی داشته و هم مورفولوژی خود را حفظ کرده اند (۱۷).

در مطالعه Bhattarai و همکاران از سلول های کیتوسان و PEO با ۹۰ به ۱۰ استفاده کرده که هم ساختار خود را در آب حفظ کرده و هم نتایج حاصل از چسبیدن سلول های کندروسیت و استئوبلاست در آن بهتر بوده است (۱۲).

مطالعه اخیر نشان داد که رشد سلول‌ها روی نانو الیاف بهتر بوده و مرگ سلولی در مقایسه با نمونه کنترل معنی دار نبوده و شکل و

References

- Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell* 1972; **54**: 626-637.
- Stenoien MD, Drasler WJ, Scott RJ, Jenson ML. Silicone Composite Vascular Graft. 1999; **33**: 125-132.
- Hohman M.M, Shin M, Rutledge G.C, Brenner M.P. Electrospinning an electrically forced jets. *Phys* 2001; **13**: 2201-2220.
- Taylor GI. Electrically Driven Jets. *Proc R Soc Lond, A Math Phys Sci* 1990; **313**: 453-475.
- Pham Q.T, Sharam U, Mikos A.G. *Tissue Engineering* 2006; **12**: 1197-1205.
- Khora E, Yong L. Implantable applications of chitin and chitosan. *J Biomaterials* 2003; **24**: 2339-2349.
- Muzzarelli, R.A. "Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone." *Carbohydrate Polymers* 2009; **76**(2): 167-182.
- Lenka M, Daniela L. Electrospun Chitosan Based Nanofibers 2008; **72**: 1024-1031.
- Kahovec J, Fox RB, Hatada K. Nomenclature of regular single-strand organic polymers. *Pure and Applied Chemistry*, 2002.
- Krause T.L, Bittner G.D. Rapid Morphological Fusion of Severed Myelinated Axons by Polyethylene Glycol. *PNAS* 1990; **87**(4): 1471-1475.
- Kovar J, Wang Y, Simpson MA, Olive DM. Imaging Lymphatics with a Variety of Near-Infrared-Labeled Optical Agents; *Pure Appl. Chem* 2002; **74**(10): 1921-1956.
- Bhattarai N, Edmondson D, Veisheh O. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *J Biomaterials* 2005; **67**: 35-42.
- Cragg GM, Newman DJ, Sander KM. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* 1997; **60**: 52-60.
- Lavhate MS, Mishra SH. A review: nutritional and therapeutic potential of *Ailanthus excelsa*. *Pharmacog Rev* 2007; **1**(1): 105-113.
- Gupta AK. Quality standards of Indian medicinal plants. *Indian Council of Medicinal Research* 2003; **1**: 123-129.
- Sastri BN. *The Wealth of India: Raw Materials*. 6th Ed. New Delhi, (L-M) CSIR, 1962; PP: 47-50.
- Mengyan L, Yi G, Yen W, Alan GM, Peter I.L. Electro spinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *J Biomaterials* 2006; **27**: 2705-2715.