

Original Article

The Prepared of Chitosan /Polyethylene Oxide /Henna Extract and Evaluate Its Anti-Bacterial Properties

Zahra Boorboor¹, Maryam Alem aref¹, Minoosadri², Javad Rasoli vani^{3,4}, Mahshid Aryafar⁴, Saedeh Arab², Gholamreza Herfehdoost^{1*}

¹Neuroscience research center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Department of biotechnology, Life Sciences Research Center, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

³Pharmaceutical Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Department of Nanotechnology, Pharmacy unit of Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author; E-mail: nanodrug85@yahoo.com

Received: 24 June 2014 Accepted: 31 August 2014 First Published online: 10 April 2017

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2017 June;39(2):14-18

Abstract

Background: Nano-fiber is a high-performance anti-microbial biocompatible polymer. And was used for Coverage of superficial wounds, such as burn wounds. These nanofibers can be a suitable alternative to conventional bandage. In this research the preparation of nanofibers and anti-bacterial properties has been studied.

Methods: Polymer solution of chitosan/ polyethylene oxide/ henna extract were prepared and using electrospinning machine for nanofibers prepared and Its antibacterial properties was evaluated with Hinton agar medium containing the bacteria Escherichia coli and staphylococcus.

Results: The diameter of nanofibers were of 130 to 300 nm with SEM microscopy. The result of antibiogram tests with disks containing antibiotics and nanofibers indicates the zone of no growth bacterial growth on medium. As regards the prevent infection were the most important point in the treatment of burns and wounds so bandage containing nanofibers with anti-bacterial properties can be used instead of using antibiotics with numerous side effects.

Conclusions: The results of Antibiogram test indicate the high antibacterial properties of prepared Nano-fibers this is due to the antibacterial properties of chitosan and extracts Henna.

Keywords: Electrospinning, chitosan/PEO nanofibers, henna Extract, Antibiogram test

How to cite this article: Boorboor Z, Alem aref M, Sadri M, Rasoli Vani J, Aryafar M, Arab S, Herfehdoost G. [The Prepared of Chitosan /Polyethylene Oxide /Henna Extract and Evaluate Its Anti-Bacterial Properties]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2017 June;39(2):14-18. Persian.

مقاله پژوهشی

تهیه نانو الیاف کیتوسان/ پلی اتیلن اکساید/ عصاره حنا و بررسی خاصیت آنتی باکتریال آن

زهرا بوربور^۱، مریم عالم عارف^۱، مینو صدری^۲، جواد رسولی ونی^۳، مهشید آریافر^۴، سائده عرب^۲، غلامرضا حرفه دوست^{۱*}

^۱ مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
^۲ گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات علوم زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
^۳ مرکز تحقیقات داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
^۴ مرکز فناوری های نوین (نانو فناوری پزشکی)، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران
* نویسنده رابط؛ ایمیل: seyedsadri52@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۳/۳/۲۸ پذیرش: ۱۳۹۳/۵/۲۷ انتشار برخط: ۱۳۹۶/۱/۲۱
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. خرداد و تیر ۱۳۹۶؛ ۳۹(۲): ۱۴-۱۸

چکیده

زمینه: نانو الیاف، پلیمری زیست سازگار با قابلیت بالای ضد میکروبی است که برای پوشش زخم های سطحی، مانند زخم های حاصل از سوختگی ها استفاده می شود، همچنین این نانو الیاف می تواند جایگزین مناسب برای پانسمان های معمولی باشد. در این تحقیق، الکتروریسی کیتوسان/ پلی اتیلن اکساید/ عصاره حنا و ایجاد نانو الیاف با خواص آنتی باکتریال مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: محلول پلیمری از کیتوسان/ پلی اتیلن اکساید/ عصاره حنا تهیه و به کمک دستگاه الکتروریسی نانو الیاف تهیه شد و خواص آنتی باکتریال آن روی محیط کشت مولر هیتون آگار حاوی باکتری های اشریشیا کولی و استافیلوکوکوس بررسی گردید.

یافته ها: نانو الیاف تهیه شده به کمک میکروسکوپ SEM بررسی شد و قطر آن ۱۳۰ تا ۳۰۰ نانومتر بود و نیز نتایج حاصل از تست آنتی - بیوگرام با دیسک های حاوی آنتی بیوتیک و نیز نانو الیاف، نشان دهنده هاله عدم رشد باکتری روی محیط کشت می باشد. با توجه به اینکه مهمترین نکته در درمان سوختگی ها و زخم ها جلوگیری از عفونت می باشد پس به جای استفاده از آنتی بیوتیک ها با عوارض جانبی متعدد می - توان از پانسمان های حاوی نانو الیاف دارای خاصیت آنتی باکتریال بهره برد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از تست آنتی بیوگرام نشان دهنده خاصیت بالای آنتی باکتریالی نانو الیاف تهیه شده می باشد که این امر با توجه به خاصیت آنتی باکتریالی کیتوسان و نیز عصاره حنا میسر گردیده است.

کلید واژه ها: الکتروریسی، نانو الیاف کیتوسان/ پلی اتیلن اکساید، عصاره حنا، تست آنتی بیوگرام

نحوه استناد به این مقاله: بوربور ز، عالم عارف م، صدری م، رسولی ونی ج، آریافر م، عرب س، حرفه دوست غ. تهیه نانو الیاف کیتوسان/ پلی اتیلن اکساید/ عصاره حنا و بررسی خاصیت آنتی باکتریال آن. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۶؛ ۳۹(۲): ۱۴-۱۸

حق تالیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد

مقدمه

نانوتکنولوژی با ورود خود به عرصه‌های مختلف علمی تحول شگرفی را به وجود آورد. یکی از زمینه‌هایی که توانست با استفاده از مواد نانو مقیاس رشد چشمگیری نماید بیو پزشکی است (۱). کیتوسان در ترمیم پوست بسیار موثر است و مانع از فیبروپلازی در ترمیم پوست شده و رشد بافت را سرعت می‌بخشد. کیتوسان توانایی عجیبی در تسریع تشکیل بافت گرانولاسیون، تشکیل رگ خونی و ایجاد فیبرهای کلاژن‌دار است. کیتوسان سبب (۲-۳) افزایش فعالیت ماکروفاژها نیز می‌شود. فعال‌سازی ماکروفاژها منجر به سنتز عوامل رشد، رهش واسطه‌های بیولوژیکی و بیگانه خواری اجزای خارجی می‌شود. گلوکاگن عامل فعال‌سازی ماکروفاژها است و تولید سیتوکین را افزایش می‌دهد، کیتوسان نیز پلی‌ساکاریدی مانند گلوکاگن است و بنابراین سیتوکین تولید می‌کند که فرایند ترمیم زخم را سرعت می‌بخشد. کیتوسان تولید ایترلوکین با ماکروفاژ را افزایش می‌دهد و تکثیر فیبروبلاست و سنتز کلاژن با ایترلوکین تغییر می‌کند. بنابراین کیتوسان روی فعالیت فیبروبلاست، تولید سیتوکین، مهاجرت سلول‌های غول پیگر و تحریک سنتز کلاژن موثر است (۴-۵). در چند سال اخیر دانشمندان به دنبال یافتن روش‌های جدید پانسمان با استفاده از علوم مختلف از جمله نانوبیوتکنولوژی بوده‌اند و در این راه به توفیقاتی نیز دست یافته‌اند. از جدیدترین روش‌های پانسمان که مدتی است در ارتش آمریکا نیز مورد استفاده قرار گرفته است، استفاده از لایه‌های بسیار نازک تهیه شده از پلیمر کیتوسان می‌باشد. در این روش لایه پلیمری به صورت استریل در قطعاتی با اندازه‌های مختلف تهیه می‌شود. در هنگام ایجاد جراحت یا پس از اعمال جراحی در نقاط مختلف بدن از دندان و لثه تا جراحی‌های بزرگ مثل جراحی‌های شکمی و قطع عضو این لایه بر روی سطح مورد نظر گذاشته می‌شود (۶-۷). آزمایشات و تجربیات مختلف، نشان داده‌اند که در این روش، سرعت ترمیم جراحت نسبت به سایر روش‌های مرسوم بیشتر بوده و خود کیتوسان از چند نظر در این ترمیم نقش مفید دارد. اول این که به لحاظ زیست سازگار بودن آن، احتمال واکنش و تحریک پاسخ‌های دفاعی بدن نسبت به آن وجود ندارد لذا در سیستم ایمنی مشکلی را ایجاد نمی‌کند. دوم این که دارای خاصیت زیست تخریب پذیری بوده و محصولات تخریبی آن توسط آنزیم‌های موجود در ناحیه جراحت نه تنها مضر نیستند بلکه خود به عنوان مواد مفید در ترمیم زخم بکار می‌روند. سوم این که مشخص شده است که کیتوسان و محصولات تجزیه‌ای آن دارای خاصیت ضد باکتریایی به خصوص بر علیه باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیا کولی بوده و لذا از ایجاد عفونت‌های ناشی از این عوامل باکتریایی (بدون اینکه نیاز به استفاده از آنتی بیوتیک‌ها با عوارض ناشی از استعمال آنها باشد) به نحو چشمگیری جلوگیری می‌کند. لائوسون که ماده

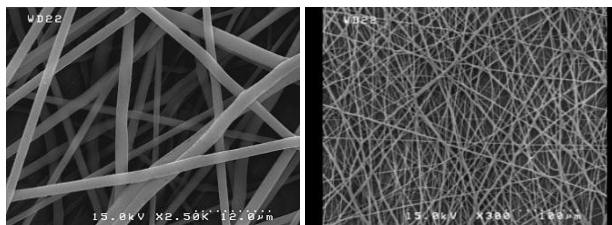
موثره حنا است به غیر از خاصیت رنگی دارای مزایایی از قبیل خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی، تقویت رشد و تسریع در بهبودی و التیام زخم می‌باشد که خاصیت ضد باکتریایی آن روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی به اثبات رسیده است (۸-۱۰). هدف نهایی از این مطالعه تهیه نانو الیاف با کمک پلیمرهای کیتوسان/ پلی اتیلن اکساید و عصاره حنا، و بررسی خاصیت آنتی باکتریال آن روی رشد باکتری‌های اشریشیا کولی و استافیلوکوکوس آئروس می‌باشد.

روش کار

در این مطالعه از پودر کیتوسان با وزن ملکولی متوسط $1/095 \times 10^6 \text{g/mol}$ (شرکت سیگما)، پودر پلی اتیلن با وزن ملکولی $9 \times 10^5 \text{g/mol}$ (شرکت سیگما)، کتامین و زایلازین (شرکت آلفاسن هلند)، پودر EMBA (شرکت مرک) و دستگاه الکترورسی (شرکت فناوران) استفاده گردید. با استفاده از محلول‌های ۲٪ کیتوسان و ۳٪ PEO می‌توان نسبت‌های مختلف وزنی مخلوط پلیمری کیتوسان-PEO تهیه کرد. مثلاً وقتی گفته می‌شود نسبت ۹۰ به ۱۰ کیتوسان-PEO، منظور نسبت حجمی ۹۰ به ۱۰ کیتوسان ۲٪ به ۳PEO٪ است. سپس $0/005$ میلی‌لیتر تریتون $100 \times$ و 2 میلی‌لیتر عصاره حنا را در یک بالن ژورژه و به کمک همزن مغناطیسی به مدت ۳ ساعت مخلوط سپس در یک سرنگ ۵ میلی‌لیتر ریخته و توسط سرسوزن شماره ۱۸ در فاصله ۱۵ سانتیمتری جمع‌کننده در دستگاه الکترورسی (شرکت فناورسان ایران) قرار داده شد. نانوالیاف با استفاده از ولتاژ ۲۰ کیلووات با میزان تزریق یک میلی‌لیتر در ساعت تهیه گردید. شکل و میانگین قطر نانوالیاف حاصل از روند الکترورسی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM (هیتاچی ژاپن) تعیین شد. برای تهیه SEM از نانوالیاف تهیه شده، ابتدا بخش کوچک از شبکه نانوالیاف الکترورسی شده روی پایه نگهدارنده نمونه قرار داده شد. سپس با دستگاه لایه نشانی طلا، نمونه با طلا روکش گردید. نمونه‌ها در محل مربوطه دستگاه قرار گرفته و تصاویر با بزرگنمایی‌های مختلف تهیه گردید. از محیط کشت LB-Agar و مولر هیتون آگار (اختصاص آنتی بیوگرام) از شرکت Merck استفاده گردید. بعد از رشد باکتریها در محیط عمومی از محیط کشت مولر هیتون آگار استفاده کرده و در دو بطری جداگانه باکتری‌های اشریشیا کولی و استافیلوکوکوس به صورت چمنی و در شرایط استریل کشت و سپس از دیسک‌های حاوی آنتی بیوتیک به عنوان شاهد و نیز از دیسک‌های بدون آنتی بیوتیک حاوی نانوالیاف فوق در روی محیط کشت داده شده قرار داده و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه گردید.

یافته‌ها

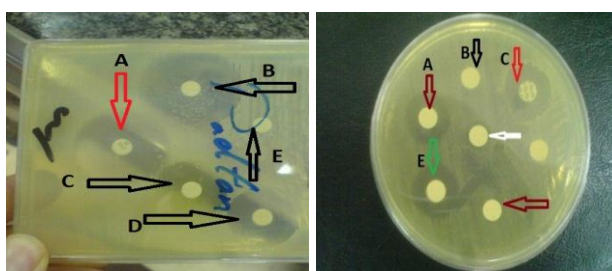
عکسبرداری با کمک میکروسکوپ الکترونی SEM که محلول پلیمری با نسبت ۸۰ (کیتوسان) به ۲۰ (پلی اتیلن اکساید) تهیه شده است.



شکل ۱: SEM از نانو الیاف کیتوسان/پلی اتیلن اکساید/ عصاره حنا با دو بزرگنمایی متفاوت. بر روی نانو الیاف تهیه شده سلول‌های فیروپلاست را کشت داده و با کمک رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج زنده و مرگ سلولی را بررسی کرده که نتایج نشان‌دهنده زنده بودن سلولی در حدود 98 ± 2 می‌باشد.



شکل ۲: رنگ‌آمیزی آکریدین 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 را نشان می‌دهد. عکس با عدسی $\times 40$ توسط میکروسکوپ اینورت گرفته شده است. بعد از کشت چمنی باکتری‌های ذکر شده روی محیط مولر هیتون آگار و انجام تست آنتی بیوگرام نتایج حاصل از هاله عدم رشد به شرح ذیل می‌باشد.



ب

الف

شکل ۳: نتایج حاصل از تست بررسی خاصیت ضد باکتریایی نانو الیاف حاوی عصاره حنا. (الف) با دیسک حاوی نانو الیاف (B) با دیسک حاوی محلول پلیمری و عصاره حنا (C) کنترل مثبت (D) کنترل منفی، (ب) (A) کنترل مثبت، (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

برای تهیه نانو الیاف کیتوسان / پلی اتیلن اکساید از نسبت‌های 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 شد. برای بالا بردن استحکام الیاف تولید شده طبق رفرانس‌ها از گلو تار آلدئید استفاده شده بود اما به دلیل سمی بودن آن که مانع رشد سلولی می‌شد از تریتون ۸۰ به عنوان سورفاکتانت برای کاهش کشش سطح استفاده شد که به تهیه نانو الیاف یکدست و با کمترین بید و اندازه کمتر کمک کرد. امروزه بهترین گزینه در کاربردهای پزشکی به خصوص در درمان نقص یا آسیب در بدن به ویژه زخم و آسیب‌های پوستی استفاده از نانوالیاف می‌باشد که نانو الیاف کیتوسان پیش‌تاز بوده است. تجربیات مختلف نشان داده است که در این روش سرعت ترمیم جراحات نسبت به سایر روش‌های مرسوم بیشتر بوده و از طرفی کیتوسان و عصاره حنا دارای خاصیت آنتی باکتریال بوده و مانع تحریک پاسخ‌های دفاعی علیه بدن بوده و در ترمیم و بهبودی نقش موثرتری دارند. چون هدف عمده از این طرح بررسی عدم ممانعت رشد سلول‌های فیروپلاست روی کشت سلولی و به عبارتی در شرایط آزمایشگاهی بود که نتایج نشان دهنده حصول این هدف است و در آینده نانوالیاف بهینه شده به صورت پانسمان تهیه و اثرات آن روی زخم اعم از التیام، سرعت رشد و خاصیت آنتی باکتریال آن بررسی می‌گردد (۱۰-۱۲).

نتیجه‌گیری

برای دست یابی به نانوالیاف بدون بید و یکدست بهتر است از شرایط بهینه شده الکتروریسی کرد و از درصد‌های متفاوت از پلیمرها بهره برد که بهترین حالت ۸۰ به ۲۰ (کیتوسان به پلی اتیلن اکساید) می‌باشد. در کارهای بالینی بهتر است قبل از ادامه کار مطالعات سمیتی آن هم بررسی گردد که نتایج نشان‌دهنده زیست سازگاری و زیست تخریب‌پذیری و عدم توکسیسیته نانوالیاف می‌باشد. کیتوسان به تنهایی دارای خاصیت آنتی باکتریال می‌باشد که این امر با وجود عصاره حنا تشدید می‌یابد و روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی تاثیر می‌گذارد. می‌توان از نانو الیاف بدست آمده به عنوان پانسمان جهت التیام و ممانعت از عفونی شدن جای زخم و سوختگی بهره برد.

References

- Herfehdoost Gh, Kamali M, Javadi Hr, Zolfagary D, Emamgoli A, Chopani A, et al. Rapid detection of *Vibrio Cholerae* by Polymerase Chain Reaction based on nanotechnology method. *Journal of Applied Biotechnology Reports* 2014; **1**(2): 58-62.
- Yun Ye-Rang , Won Jong Eun , Jeon Eunyi , Lee Sujin , Kang Wonmo, Jo Hyejin, et al. "Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration." *Journal of tissue engineering* 2010; 2010: 1-18. doi: 10.4061/2010/218142
- Naughton G K, Naughton B A. *Three-dimensional cell and tissue culture apparatus*. 1992, Google Patents.
- Jay P, Malmquist DMD, Stephen C, Clemens DMD, Hal J, Oien DMD, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; **66**: 1177-1183.
- Hua Xie, Yashodhan S. Khajanchee, Jeffrey S. Teach, Brian S. Shaffer Published 2007 in Wiley Inter Science.
- Pakravan M, Heuzeya MC, Ajjia A. "A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning." *Polymer* 2011; **52**(21): 4813-4824. doi: 10.1016/j.polymer.2011.08.034
- Chaudhary G. "Lawsonia inermis Linnaeus: A phytopharmacological review." *International journal of pharmaceutical sciences and drug research* 2010; **2**(2): 91-98.
- Rahmoun N, Boucherit-Otman Z, Boucherit K, Benabdallah M, Villemin D, Choukchou-Braham N. "Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives." *Medecine et maladies infectieuses* 2012; **42**(6): 270-275. doi: 10.1016/j.medmal.2012.05.002
- Avci H, Monticello R, Kotek R. "Preparation of antibacterial PVA and PEO nanofibers containing Lawsonia Inermis (henna) leaf extracts." *Journal of Biomaterials Science* 2013; **24**(16): 1815-1830. doi: 10.1080/09205063.2013.804758
- Muzzarelli RA. "Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone." *Carbohydrate Polymers* 2009; **76**(2): 167-182. doi: 10.1016/j.carbpol.2008.11.002
- Khora E, Yong L. Implantable applications of chitin and chitosan. *J Biomaterials* 2003; **24**(13): 2339-2349. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00026-7
- Bhattarai N, Edmondson D, Veisoh O. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *J Biomaterials* 2005; **26**(31): 6176-6184. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.03.027