

Biological Applications of Double Nanofibers based on Silk Fibroin

Fatemeh Ravari^{*1}, Seyed Hossein Miremad^{1*}, Mehdi Dadmehr², Morteza Ehsani³

1. Chemistry Department, Payame Noor University, 19395-4697, Tehran, Iran

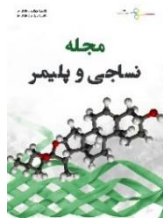
2. Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

3. Department of polymer processing, Iran Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, Iran

Article Information	Abstract
<p>Article history:</p> <p>Received: 2023-09-29 Accepted: 2024-05-13</p>	<p>In this study, nanofibers based on silk fibroin (SF) and polyvinyl alcohol (PVA), as non-toxic and biodegradable polymers, were successfully prepared using electrospinning method. Propolis (B) and cerium oxide nanoparticles (NCe) were optimally added in the electrospinning solution with 40% and 1.5%, respectively, to increase the antibacterial property. Then, Angi Pars, an Iranian herbal diabetic drug, was next loaded into above solution. The optimization was achieved based on the evaluation of the stability of the electrospinning process and the morphology of the nanofibers by field emission scanning electron microscope (FE-SEM) analysis. The SEM-FE images of the sample included SF:PVA (ratio 3:7), B (40% weight) and NCe (1.5% weight) showed the smooth and uniform nanofibers with mean diameter of 45 nm. To determine the antibacterial activity of the designed system, the disk diffusion method was used. According to diameter of the inhibition zone, (SF/PVA/B/NCe/A+) exhibited high antibacterial potential versus <i>Staphylococcus aureus</i> (25 mm) and <i>Bacillus cereus</i> (18 mm). Also, the loading of Angi Pars drug in the nanofibers showed very strong results for the medicinal wound healing, compared to Angi Pars drug alone. The electrospun nanofibers (SF/PVA/B/NCe/A+) showed accelerated skin wound healing in a rat model. Also, cytotoxicity assays indicated no toxicity for SF/PVA/B/NCe/A+ against MCF-7 cancer cells. These findings suggest that these composite nanofibers can create useful wounds for biomedical applications.</p>
<p>Keywords:</p> <p>Silk fibroin, Propolis, Cerium oxide nanoparticle, Electrospinning, Nanofibers.</p>	

(*) To whom correspondence should be addressed.

E-mail address: fatemeravari@pnu.ac.ir



کاربردهای زیستی نانوالیاف دوتایی بر پایه فیبروئین ابریشم

فاطمه راوری^{۱*}، سید حسین میرعماد^۱، مهدی دادمهر^۲، مرتضی احسانی^۳^۱ تهران، دانشگاه پیام نور، دانشکده شیمی^۲ تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست شناسی^۳ تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۷/۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۲۴	در این پژوهش، نانوالیاف بر پایه فیبروئین ابریشم (SF) و پلی وینیل الکل (PVA)، به عنوان پلیمرهای غیرسمی و زیست تخریب پذیر با استفاده از روش الکتروریسی با موفقیت تهیه شد. به منظور افزایش خاصیت ضد باکتریایی، بره موم (B) و نانو ذره سریم اکسید (NCE) به صورت بهینه به ترتیب با درصدهای ۴۰ و ۱/۵ در محلول الکتروریسی گنجانده شد. سپس، داروی آنژی پارس، داروی گیاهی دیابت تولید ایران، در محلول فوق بارگذاری شد. بهینه سازی بر اساس ارزیابی پایداری فرایند الکتروریسی و مورفولوژی نانوالیاف توسط آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM) به دست آمد. تصاویر حاصل از FE-SEM نمونه دارای SF:PVA (نسبت ۷:۳)، ۴۰ درصد وزنی بره موم و ۱/۵ درصد NCE نشان داد که نانوالیاف دارای سطحی صاف و یکنواخت با میانگین قطر ۴۵ نانومتر بودند. برای تعیین فعالیت ضد باکتریایی سیستم طراحی شده از روش تعیین قطر هاله عدم رشد استفاده شد. با توجه به قطر ناحیه مهار، (SF/PVA/B/NCE/A ⁺) پتانسیل ضد باکتریایی بالایی در مقابل استافیلوکوکوس اورئوس (۲۵ میلی متر) و باسیلوس سرئوس (۱۸ میلی متر) از خود نشان داد. بارگذاری داروی آنژی پارس در نانوالیاف نتایج خیلی خوبی را برای بهبود زخم دارویی در مقایسه با داروی آنژی پارس به تنهایی نشان داد. نانوالیاف الکتروریسی شده (SF/PVA/B/NCE/A ⁺) بهبود زخم پوستی را در مدل موش سرعت بخشید. همچنین، آزمون سمیت جهت بررسی تاثیر نانوالیاف طراحی شده روی سلول های سرطانی از رده MCF-7 نشان داد که سیستم مذکور فاقد سمیت سلولی است. این یافته ها نشان می دهد که سیستم فوق، می تواند پانسمان زخم امیدوارکننده ای برای کاربردهای زیست پزشکی باشد.
واژه های کلیدی:	
فیبروئین ابریشم، بره موم، نانو ذره اکسید سریم، الکتروریسی، نانوالیاف.	

۱ مقدمه

کمترا از ۱۰۰ نانومتر، خواص منحصر به فردی همچون نسبت سطح به حجم بسیار بالا، انعطاف پذیری در سطح عملکرد، تخلخل و مقاومت مکانیکی عالی به الیاف می بخشد که این امر به گسترش کاربردهای آن کمک می نماید. تاکنون روش های مختلفی برای تولید نانوالیاف توسط محققین معرفی شده است که در میان آنها، روش الکتروریسی علاوه بر سادگی از راندمان بیشتری نیز برخوردار است [۵].

بره موم (B) به عنوان محصول طبیعی مشتق شده از صمغ های گیاهی، دارای فعالیت های بیولوژیکی مختلفی از جمله اثرات ضد میکروبی، ضد التهابی و آنتی اکسیدانی دارد [۶]. مطالعات گوناگون نشان داده اند که این خواص بیولوژیکی بره موم مربوط به جزء فعال فنیل استر کافئیک اسید است که سبب کاهش التهاب در جراحات و افزایش فعالیت ماکروفاژها در زدایش سلول های مرده سطح زخم می شود [۷]. در نتیجه، ترمیم بافت و میزان جمع

در سال های اخیر، استفاده از پلیمرها و نانوالیاف زیست سازگار و زیست تخریب پذیر برای مصارف پزشکی و دارورسانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۱، ۲]. از این مواد برای کاربردهایی نظیر زخم پوش ها، دارورسانی، داربست های کشت سلول و بافت استفاده می شود. از نکات قابل توجه در این پژوهش ها، استفاده از پلیمرها و بیوپلیمرهای زیست سازگار نظیر کلاژن، فیبروئین ابریشم، پلی لاکتیک اسید، پلی گلایکولیک اسید و پلی کاپرولاکتون برای مصارف پزشکی هستند که تعدادی از این آنها، پیوستگی و خواص مکانیکی مناسبی ندارند، در حالی که فیبروئین ابریشم خواص مکانیکی مطلوبی نسبت به سایر پلیمرها نشان داده است [۳]. فیبروئین ابریشم (SF) به دلیل تخریب پذیری تدریجی، خواص مکانیکی خوب، قابلیت اختلاط با ترکیبات زیست سازگار در رشته های مختلف از نساجی تا زیست پزشکی کاربرد وسیعی یافته است [۴]. نانوالیاف به دلیل داشتن قطر

* مسئول مکاتبات، پیام نگار: fatemeravari@pnu.ac.ir

کاربردهای پوششی زخم تاکنون در هیچ مقاله‌ای گزارش نشده است. هدف اصلی در این پژوهش، بررسی مکانیسم‌های قابل قبول فعالیت ضد باکتریایی بره موم و نانوذره اکسید سربیم و فاکتورهای تأثیرگذار مختلف بر آن و همچنین ارزیابی خواص زیستی پلیمر فیبروین و پلی وینیل الکل با رویکرد افزایش خاصیت ضد باکتریایی برای استفاده در پوشش‌های زخم می باشد. در این مطالعه، خاصیت ضد باکتریایی و کاربرد زیستی آن به عنوان زخمپوش نانو الیاف‌های الکتروزیستی شده در هر دو حالت حضور و عدم حضور نانوذره NCE ارزیابی شد. در نهایت، آزمایش‌های سمیت سلولی برای تعیین زیست سازگاری سیستم طراحی شده مورد بررسی قرار گرفت. انتظار می‌رود این مطالعه یک روش امیدوارکننده برای طراحی نانو الیاف چند منظوره با خواص برجسته برای استفاده بالقوه در پانسمان زخم‌های دیابتی و کاربردهای زیست پزشکی ضد باکتریایی ارائه دهد.

۲ تجربیات

۱-۲ مواد

پلی‌وینیل الکل (PVA) با وزن مولکولی ۱۴۵۰۰۰ g/mol، سدیم کربنات (Na_2CO_3)، اتانول ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)، فرمیک اسید (HCOOH)، کلسیم کلرید (CaCl_2)، سربیم نیترات شش آبه ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) از شرکت Merck آلمان تهیه شدند. پیله کرم ابریشم از شرکت صنعتی ابریشم بابل، بره‌موم از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی دامغان و داروی آنژی پارس (Angi-Pars) از داروخانه هلال‌احمر تهران تهیه شدند. برای انجام آزمون سلولی، رده سلولی MCF-7 از انستیتو پاستور ایران تأمین و محلول-های MTT از شرکت کیازیست و دی متیل سولفوکسید (DMSO) از شرکت Merck خریداری شد.

۲-۲ دستگاه‌ها

در این پژوهش، از دستگاه الکتروزیستی تولیدی از شرکت نانو آزما و ساخت ایران که شامل یک منبع ولتاژ بالا، پمپ تزریق دیجیتال و یک جمع‌کننده هادی می‌باشد، استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱ دستگاه الکتروزیستی

اطلاعات میکروساختاری از سطح نمونه با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی اثر میدانی (Zeiss (FE-SEM) کشور آلمان مدل Sigma 300- HV) استفاده گردید.

شدگی زخم به سرعت رخ می‌دهد و به عبارت دیگر زمان التیام زخم کاهش می‌یابد [۹،۸].

در سال‌های اخیر پژوهش‌های بسیاری بر روی استفاده از بره‌موم صورت گرفته است. به‌عنوان نمونه کیم و همکاران با هدف استفاده از آن در مصارف پزشکی، نانوالیاف کامپوزیتی پلی‌یورتان بره‌موم را به روش الکتروزیستی تهیه کردند [۱۰]. نتیجه آزمایش‌ها نشان داد که مقدار کم بره‌موم، ویژگی‌های آب‌دوستی و قدرت مکانیکی غشای لیف را افزایش داده است. همچنین، این الیاف خاصیت ضد میکروبی نیز از خود بروز دادند. اسماعیل و همکاران، از ترکیب کیتوزان با عصاره بره‌موم، فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیری برای افزایش ویژگی‌های عملکردی و کاربرد بالقوه آن در بسته‌بندی فعال مواد غذایی استفاده کردند [۱۱].

به علت سمیت ترکیبات آلی مورد استفاده برای گندزایی، علاقه به مواد ضد عفونی‌کننده معدنی مانند نانوذرات (NPs) اکسید فلزی روبه‌افزایش است. با توجه به فراوانی نسبتاً بالای سربیم روی زمین، نانوذرات اکسید سربیم (NCE) مواد امیدوارکننده‌ای برای این‌گونه تحقیقات به شمار می‌آیند [۱۲]. همچنین NCE به دلیل سمیت کم، به‌عنوان یک عامل ضد باکتریایی عالی، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند، زیرا در مقایسه با نقره و مس، سمیت نسبتاً کمتری برای سلول‌های پستانداران دارند [۱۶-۱۳]. نتیجه تحقیقات کوانگ و همکاران نشان داد که NCE دارای اثر ضد باکتریایی بهتری نسبت به CeO_2 حجیم داشته است [۱۷]. در مقایسه با سایر نانوذرات از جمله نانوذرات اکسید روی و نانوذرات اکسید تیتانیوم، NCE دارای مکانیسم ضد باکتریایی منحصربه‌فردی هستند که از وجود همزمان دو حالت اکسیداسیون سربیم (III) و سربیم (IV) و تبدیل برگشت‌پذیر بین آنها ناشی می‌گردد [۱۸]. مطالعات بسیاری در زمینه کامپوزیت پلی‌وینیل الکل (PVA) با NCE [۱۹] و الیاف هیبریدی فیبروین ابریشم (SF) با NCE [۲۰] انجام گرفته است. اما تحقیقاتی که شامل ترکیب پلیمر SF و PVA حاوی NCE برای کاربردهای پوششی زخم باشد، کمتر به آن پرداخته شده است. برای تهیه نانو الیاف مناسب برای پانسمان‌های زخم از روش الکتروزیستی با قابلیت تولید الیاف نانومتری با تخلخل بالا استفاده می‌گردد. استفاده از این روش، ایجاد سطح به حجم بالا و تخلخل‌های ریز و پراکنده در سراسر الیاف را امکان‌پذیر می‌سازد [۲۱].

یکی از داروهایی که برای درمان زخم پای دیابتی استفاده می‌شود، داروی آنژی پارس (A) است که ماده مؤثره اصلی آن از گیاه *Melilotus officinalis* استخراج می‌شود. این دارو، به‌صورت سیستمیک و موضعی در درمان زخم‌های مختلف از جمله زخم پای دیابتی و زخم بستر عمل می‌کند و سبب بهبود جریان خون، رگ‌زایی و کاهش التهاب زخم پای ناشی از دیابت می‌شود [۲۲].

اگرچه در منابع علمی و مقاله‌ها به استفاده از B و یا NCE در بسترهای پلیمری با هدف‌های کاربردی متفاوت پرداخته شده‌است، اما بر اساس بررسی‌های انجام شده، تولید نانوالیاف پلیمری SF و PVA حاوی B و NCE برای

۳-۲ روش‌ها

۱-۳-۲ استخراج فیبروئین

برای دستیابی به فیبروئین ابریشم (SF) به‌عنوان ماده پایه، ابتدا صمغ‌گیری پيله‌های ابریشم در مجاورت سدیم کربنات درون حمام آب به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد [۲۳ و ۲۴]. سپس، پيله ابریشم در حلال سه‌جزئی آب/اتانول/کلسیم کلرید با نسبت‌های مولی ۱:۲:۸ در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت حل شد. در نهایت، عملیات خالص‌سازی و دیالیز با استفاده از غشاهای سلولزی به مدت ۷۲ ساعت انجام شد و پس از انجماد و خشک‌کردن فیبروئین بازیابی شده در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۳-۲ آماده‌سازی محلول PVA

برای تهیه این محلول، ۴ گرم پلیمر PVA را در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده، سپس در دمای ۸۰ درجه به مدت یک ساعت بر روی همزن مغناطیسی هم‌زده شد. پس از آن به منظور یکنواختی، در دمای محیط به مدت ۸ ساعت مجدد هم‌زده شد [۲۵].

۳-۳-۲ تهیه مخلوط دو‌تایی SF/PVA

محلول فیبروئین (SF) در اسید فرمیک ۹۸ درصد تهیه شد. محلول SF در اسید فرمیک و محلول آبی PVA با نسبت ۳:۱ به ترتیب مخلوط شدند. محلول‌ها روی همزن مغناطیسی به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق هم‌زده شدند [۲۶].

۴-۳-۲ تهیه محلول‌های ریسندگی

جهت فرایند الکتروریسی، محلول ۱۰ درصد وزنی فیبروئین در اسید فرمیک با محلول آبی ۱۰ درصد وزنی PVC با نسبت‌های ۷:۳، ۵:۵، ۳:۷ تهیه گردید. محلول‌های آماده شده درون سرنگی با گنجایش ۲ میلی‌لیتر ریخته و سر خارجی سرنگ، ۰/۶ میلی‌متر انتخاب شد. غلظت بهینه با در نظر گرفتن ویسکوزیته و هدایت الکتریکی بعد از انجام الکتروریسی انتخاب گردید. ولتاژ مناسب جهت الکتروریسی ۱۸ کیلوولت، دبی خروجی سیال ۰/۲ میکرولیتر بر دقیقه و فاصله صفحه تا نوک سوزن ۱۰ سانتی‌متر بصورت بهینه انتخاب شد [۲۷].

۵-۳-۲ تهیه عصاره هیدروالکلی بره موم

به‌منظور تهیه عصاره هیدروالکلی بره موم، ابتدا ۲۸ گرم از بره موم خام در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت در آون قرار گرفت. سپس پودر بره موم خام در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد حل گردید. محلول حاصل، تحت خلاء صاف و سپس به وسیله دستگاه سوکسله، الکل از محلول جداسازی شد. عصاره بره موم حاصل در ظرف شیشه‌ای تیره در مکانی تاریک در دمای اتاق قرار داده شد [۲۸].

۶-۳-۲ سنتز نانوذرات سریم اکسید

برای سنتز NCE، ۱۷/۳۷ گرم از سریم نیترات (III) شش‌آبه در ۲ میلی‌لیتر

اتانول حل شد. مخلوط حاصل در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد بر روی همزن مغناطیسی به مدت ۳۵ دقیقه هم‌زده شد، ۵/۲ میلی‌لیتر از محلول آمونیاک ۲۵ درصد به مخلوط واکنش به‌صورت قطره‌ای اضافه گردید و PH محلول به ۷ رسانده شد. در نتیجه محلول زرد کم رنگ حاصل را به مدت ۴ ساعت بوسیله همزن مغناطیسی در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد هم‌زده شد. سپس رسوب حاصل، چندین دفعه با آب و اتانول شسته و سانتریفیوژ شد. نانوذرات بدست آمده در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد خشک و طی ۲ ساعت در دمای ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد کلسینه شد [۲۹].

۷-۳-۲ بارگذاری داروی آنژی پارس (A) در نانوالیاف تهیه شده

داروی آنژی پارس در نمونه نانوالیاف بر اساس روش ارائه شده بارگذاری شد. به‌منظور بررسی خاصیت مؤثره ضد باکتریایی و ایجاد کاربرد درمانی سیستم طراحی شده برای بیماران دیابتی مقادیر بهینه نانوذره سریم اکسید و دارو به نمونه پایه اضافه گردید [۳۰].

۴-۲ بررسی کاربردهای زیستی نانو الیاف تهیه شده

۱-۴-۲ بررسی فعالیت ضد باکتریایی

برابر تحقیقات صورت‌گرفته، عصاره بره موم (B) به‌عنوان ترکیب ضد میکروبی در مقابل باکتری‌ها شناخته شده است. هدف از افزایش این ماده، تقویت خاصیت ضد باکتری سیستم طراحی شده می‌باشد. از آنجاکه باکتری‌های *استافیلوکوکوس* و *اورئوس باسیلوس* سرئوس از مهم‌ترین عوامل عفونت‌زا برای انسان هستند، برای بررسی اثر ضد باکتریایی نانوالیاف طراحی شده از استفاده گردید. در مطالعات انجام شده مشخص گردید که بره موم علیه باکتری‌های گرم مثبت فعالیت بیشتری را نشان می‌دهد که علت آن تفاوت در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است. باکتری‌های گرم منفی دارای یک غشاء خارجی اضافی شامل لیپو پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و فسفولیپیدها هستند که باعث نفوذ ناپذیر شدن غشاء این باکتری‌ها نسبت به برخی از مولکول‌ها و مقاومت بیشتر آنها نسبت به باکتری‌های گرم مثبت می‌شود. در نتیجه باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس) در مقایسه با باکتری گرم منفی *شریشیا کلی* حساسیت بیشتری دارد [۳۱].

۱-۴-۲ اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد

برای اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، ابتدا یک سواب پنبه‌ای استریل وارد سوسپانسیون میکروبی با کدورت نیم مک فارلند گردید. قبل از خارج کردن سواب، آن را به جدار داخلی لوله فشار آورده تا مایع اضافی آن خارج گردد. سپس سواب را به سطح محیط کشت جدید تماس داده و تمام سطح آن کشت شد. پلیت‌های کشت داده شده را به مدت ۲ تا ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه بدون جابه‌جایی قرار داده و با استفاده از پنس استریل، دیسک‌های کاغذی حاوی آنتی‌بیوتیک را به‌دقت بر روی سطح جامد در داخل پلیت قرار داده، سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت با استفاده از خط کش، قطر ناحیه هاله عدم رشد را بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد (شکل ۲) [۳۲].

گروه سیستم کامل بدون داروی آنژی پارس (A⁻/SF/PVA/B/NCE):
موش‌ها دیابتی گردیدند و سیستم کامل داروی A⁻ به میزان ۵۰ میکرولیتر تزریق وریدی گردید.

گروه سیستم کامل با داروی آنژی پارس (A⁺/SF/PVA/B/NCE):
موش‌ها دیابتی گردیدند و داروی آنژی پارس به میزان یک و نیم گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش دو بار در روز گاوژ دهانی گردید و سیستم کامل داروی A⁺ به میزان ۵۰ میکرولیتر تزریق وریدی گردید.

داده‌های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون ANOVA مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

۳-۴-۲ تعیین میزان سمیت با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT
اولین گام در بررسی زیست‌سازگاری و بررسی سمیت سلولی یک ماده، آزمون MTT می‌باشد که روشی آسان و ارزان در جهت فهم سمیت آن ماده است. به علاوه در مقایسه با آزمون‌های درون تنی، این روش بسیار ساده‌تر، قابل کنترل و فاقد موانع اخلاقی است. کنترل شرایط محیطی در این شرایط مهم است؛ زیرا سلول‌ها به شدت نسبت به تغییر شرایط محیطی حساس بوده و این تغییرات می‌تواند نتایج مثبت کاذب در افزایش سمیت نشان دهد. این روش بر اساس احیای محلول زرد رنگ MTT به یک ترکیب نامحلول بنفش رنگ به نام فورمازان می‌باشد که توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده انجام می‌گیرد [۳۳].

جهت بررسی سمیت نانوالیاف طراحی شده و تأثیر آن بر رشد و تکثیر سلول‌ها و مقایسه ارزیابی بقا و تکثیر سلول‌ها از روش MTT بر روی سلول MCF-7 انجام شد. سلول‌های پاساژ دوم با تراکم 2×10^4 سلول در هر خانه پلیت ۹۶ خانه با غلظت ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI (۲۰۰ میکرولیتر) شدند. از هر دو نمونه (A⁺/SF/PVA/B/NCE) و (A⁻) (SF/PVA/B/NCE)، غلظت‌های مختلف (۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ میکرولیتر) تهیه شد و پس از ۲۴ ساعت بر نمونه‌های سلولی داخل چاهک‌ها (ظرف‌های کشت سلول) اثر داده شد. تعداد سه چاهک به هر نمونه اختصاص داده شد. سلول‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت دیگر داخل انکوباتور قرار داده شدند. جذب محلول فورمازان توسط دستگاه الیزا در طول موج ۵۷۰ nm، درصد زنده‌بودن سلول‌ها را با استفاده از فرمول زیر تعیین کرد.

$100 \times (\text{جذب متوسط نمونه شاهد} / \text{جذب متوسط نمونه برای هر غلظت}) =$
درصد سلول‌های زنده

۵-۲ تجزیه و تحلیل آماری

برای تعیین تفاوت معنی‌دار بین داده‌های حاصل از گروه‌های مطالعه شده، از آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA, Chaffe: Post hoc) استفاده شد. از نظر آماری، $p < 0.05$ ، اختلاف معنادار بین نمونه‌ها در نظر گرفته شد.



شکل ۲ اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد

۲-۴-۲ سنجش ترمیم زخم در داخل بدن

۱-۲-۴-۲ حیوانات مورد آزمایش

این مطالعه روی ۲۰ سر موش صحرایی نر سفید، نژاد ویستار، با وزن تقریبی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم انجام شد. حیوانات تحت چرخه نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، رطوبت ۳۰ تا ۴۰ درصد و با درجه حرارت 22 ± 2 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. موش‌ها آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند و قوانین اخلاقی برخورد با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

۲-۲-۴-۲ روش ایجاد دیابت

موش‌ها به شکل تصادفی به ۴ گروه (۳ گروه تجربی و یک گروه کنترل) تقسیم شدند. گروه‌های تجربی با تزریق زیر جلدی یک دوز استرپتوزوتوسین 50 mg/kg دیابتی شدند. برای جلوگیری از ایجاد شوک هیپوگلیسمی، به مدت سه روز از محلول آب‌قند با درجات کاهش یابنده استفاده شد. بعد از ۵ روز قند خون با دستگاه گلوکومتر اندازه‌گیری شد و فقط حیواناتی که قند خون بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر داشتند، به مدت ۵۶ روز نگهداری شدند. سپس به مدت ۱۴ روز حیوانات در گروه کنترل و در سه گروه تجربی دیگر به ترتیب داروی آنژی پارس (A)، سیستم کامل بدون آنژی پارس (SF/PVA/B/NCE) و سیستم کامل با داروی آنژی پارس (A⁺/SF/PVA/B/NCE) دریافت نمودند.

۳-۲-۴-۲ ایجاد زخم

ابتدا حیوانات از طریق تزریق داخل صفاقی مخلوط ۱۰۰ میلی‌گرم کتامین و ۱۰ میلی‌گرم زایلازین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت عمیق بیهوش شدند. برای ایجاد زخم، موهای پشت حیوانات تراشیده و محل زخم ضدعفونی شد. سپس با استفاده از یک مارکر دایره‌ای شکل به وسعت ۳ سانتی‌متر مربع، علامتی در پشت حیوان زده شد و با استفاده از قیچی جراحی و تیغ بیستوری، برشی به وسعت ۳ سانتی‌متر که تمامی لایه شامل را می‌شد، ایجاد گردید.

سپس حیوانات در گروه‌های مورد استفاده در این آزمایش به شرح ذیل دسته‌بندی شدند:

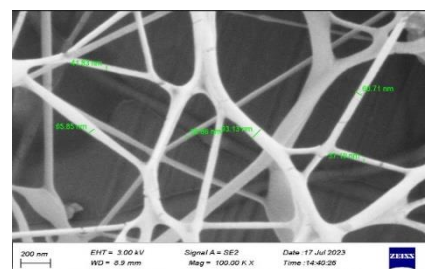
گروه کنترل: موش‌ها دیابتی گردیدند اما هیچ‌گونه درمانی بر روی آنها صورت نگرفت.

گروه داروی آنژی پارس: موش‌ها دیابتی گردیدند و دارو به میزان یک و نیم گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش، دو بار در روز گاوژ دهانی گردید.

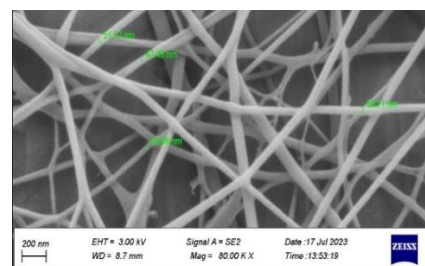
۳ نتایج و بحث

۳-۱ آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM) نانو الیاف تهیه شده

شکل ۳، تصاویر SEM مربوط به نمونه‌های SF/PVA و SF/PVA/B/NCE/A⁺ را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، نانوالیاف الکترونیسی شده در همه غلظت‌ها مورفولوژی مطلوبی داشتند و در هیچ‌کدام از نمونه‌ها، نانوالیاف دانه‌دار مشاهده نشد. یک راه مناسب برای تشکیل جت، دانسیته بالای شار الکتریکی در سطح جت محلول است که سبب تشکیل الیاف یکنواخت با دانه‌های کمتر می‌شود [۳۴]. با توجه به این تصاویر ارئه شده، مشخص شد که با افزایش برهموم و نانوذره NCE به محلول الکترونیسی، ساختار لیفی بسیار مطلوب‌تری بدست آمد زیرا این مواد سبب افزایش رسانایی و کشیدگی محلول الکترونیسی و در نتیجه یکنواختی و کاهش قطر نانوالیاف در فرایند الکترونیسی شده است [۳۵]. به طور خلاصه می‌توان گفت حضور نانوذرات NCE و ماده B و مقدار آنها در مخلوط، مهم‌ترین عامل تعیین‌کننده شکل و قطر نانوالیاف الکترونیسی شده است و به عبارت دیگر تأثیر بسیاری بر مورفولوژی نانوالیاف حاصل دارد. شکل ۳ نشان می‌دهد که مخلوط فاقد برهموم و نانوذره (SF/PVA)، دارای قطر با میانگین ۵۵ نانومتر است. درحالی‌که الیاف حاصل از نمونه دارای ۴۰ درصد وزنی برهموم و ۱/۵ درصد نانوذره سرب اکسید (SF/PVA/B/NCE/A⁺)، تا حدودی با ساختار یکنواخت‌تر و تجمع پلیمری کمتر در سطح با میانگین قطر، ۴۵ نانومتر بوده است. تصاویر مورفولوژی الیاف الکترونیسی شده همچنین نشان می‌دهد که ساختار متخلخل این نانو الیاف جهت خشک کردن مواد مترشحه زخم مناسب است و موجب نفوذپذیری اکسیژن به زخم می‌شود. در نتیجه این عامل به عنوان یکی از عوامل مهم در تهیه زخم‌بند مورد توجه است [۳۶].



(الف)



(ب)

شکل ۳ تصاویر FE-SEM الیاف الکترونیسی شده نمونه‌های (الف) SF/PVA/B/NCE/A⁺ و (ب) SF/PVA

۳-۲ بررسی کاربردهای زیستی نانو الیاف تهیه شده

بهبودی زخم از طریق اندازه‌گیری سطح زخم، درصد بهبودی زخم و مدت‌زمان لازم برای بسته‌شدن کامل زخم ارزیابی شد (شکل ۴). سطح زخم در روزهای ۱، ۵، ۹، ۱۳، ۱۷، ۱۹، بعد از ایجاد آن و با استفاده از نرم افزار ImageJ با واحد mm اندازه‌گیری شد. درصد بهبودی زخم طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$100 \times (\text{سطح زخم در روز اول} - \text{سطح زخم در روز A}) / \text{سطح زخم در روز اول} = \text{درصد بهبودی}$$

ایجاد زخم، اندازه‌گیری سطح آن، درمان زخم با سیستم طراحی شده (SF/PVA/B/NCE/A⁺) و همچنین اندازه‌گیری وزن حیوانات در ساعات مشخص (۱۳ تا ۱۴ بعد از ظهر) انجام شد. همچنین، مدت زمان لازم برای بهبودی کامل زخم، یعنی مدت زمانیکه پوست محل ایجاد زخم کاملاً بهبودیافته (شکل ۴) و شبیه پوست نواحی اطراف شده بود، نیز تا زمانیکه لازم بود ثبت گردید. سطح زخم در روز اول بعد از ایجاد زخم در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نشان نداد. درصد بهبودی زخم در روزهای پنجم، نهم، سیزدهم، هفدهم و نوزدهم اندازه‌گیری شد. درصد بهبودی زخم در هر سه گروه جدول ۱ درمقایسه با گروه کنترل در روزهای پنجم، نهم، سیزدهم به طور معنی‌داری افزایش یافته بود ($P < 0.05$). درصد بهبودی زخم میان گروه‌های مختلف در روزهای هفدهم و بیست یکم تفاوت معنی‌داری نشان نداد. همچنین تفاوت معنی‌داری در درصد بهبودی زخم بین سیستم کامل A⁻ (سیستم بدون ماده آنژی پارس) و سیستم کامل A⁺ (سیستم حاوی ماده آنژی پارس) در هیچ‌کدام از روزها مشاهده نشد. مدت زمان لازم برای بهبودی کامل زخم، یعنی مدت زمانی که پوست محل ایجاد زخم کاملاً بهبودیافته و شبیه پوست نواحی اطراف شده بود، بین گروه کنترل و هر دو گروه سیستم کامل (گروه‌های ۳ و ۴) تفاوت معنی‌داری نشان داد.

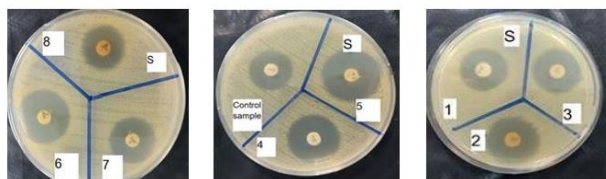
همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، تعداد روزهای بهبود زخم در گروه‌های تجربی دریافت‌کننده آنژی پارس، سیستم کامل بدون آنژی پارس (SF/PVA/B/NCE) و سیستم کامل با داروی آنژی پارس (SF/PVA/B/NCE/A⁺) در مقایسه با گروه کنترل (بدون درمان)، کاهش معنی‌داری نشان دادند. تعداد روزها در گروه دیابتیک درمان شده با SF/PVA/B/NCE/A⁺ در مقایسه با سایر گروه‌های دیابتیک بیشترین کاهش را داشت.

نتایج به‌خوبی نشان می‌دهد که سیستم طراحی شده به‌خصوص زمانی که همراه داروی آنژی پارس استفاده می‌شود، اثرات قابل‌ملاحظه‌ای بر بهبود زخم‌های دیابتی دارد که این نتایج در جای خود بسیار مثبت ارزیابی می‌شود.

دلایل متعددی برای چگونگی تسریع بهبود زخم پوستی توسط سیستم طراحی شده وجود دارد. به استناد تحقیقات انجام شده، جلوگیری از عفونت زخم و درمان زخم با آنتی بیوتیک‌ها روند ترمیم زخم را تسریع می‌کند

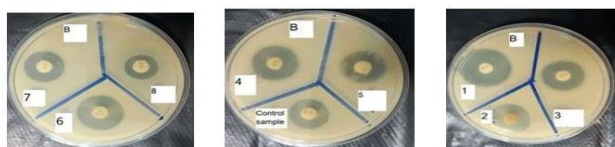
کاغذی (تعیین قطر هاله عدم رشد) بررسی شد (شکل های ۵ و ۶). این تست توانایی دارو در جلوگیری از رشد باکتری را اندازه گیری می نماید و نتایج حاصل از آن به خوبی با پاسخ های درمانی در بیماری هایی که دفاع بدن غالباً قادر به حذف میکروارگانیسم عفونی است، تطبیق دارد [۳۸]. نتایج فعالیت ضد باکتریایی عصاره اتانولی بره موم در جدول ۲ نشان داده شده است. ارزیابی نتایج به خوبی نشان می دهد که عصاره بره موم در نمونه ها از رشد باکتری های بیماری زا جلوگیری نمودند، اما میزان این بازدارندگی در نمونه های مختلف متفاوت بوده است. بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین فعالیت قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* در نمونه با بره موم ۴۰ درصد (۲۵ میلی متر)، خاصیت ضد میکروبی آن را تأیید می کند.

قطر هاله عدم رشد ایجاد شده برای نمونه SF/PVA/B/ Nce با ۴۰ درصد B و ۱,۵ درصد Nce در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۲۵ میلی - متر اندازه گیری شد که بیشتر از قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط نمونه های حاوی عصاره بره موم با درصدهای وزنی - وزنی کمتر از ۴۰ درصد (۲۲/۵ - ۲۳/۳ میلی متر) است (شکل ۵). در حالی که در مورد اثر این نمونه بر روی باکتری *باسیلوس سرئوس*، قطر هاله عدم رشد (۱۸ میلی متر) کمتر از نمونه های حاوی عصاره بوده است (شکل ۶) که به علت وسیع بودن طیف ضد باکتریایی نانو سریم اکسید است و به عبارت دیگر طبق مطالعات صورت گرفته، عصاره بره موم به صورت انتخابی دارای خاصیت ضد میکروبی است؛ به طوری که بر باکتری های گرم مثبت اثر بیشتری دارد. همانگونه که مورد انتظار است، با افزایش غلظت عصاره بره موم از ۰ به ۴۰ درصد وزنی - وزنی قطر هاله عدم رشد افزایش یافته است و حتی در حضور ۱ تا ۱/۵ درصد از Nce، قطر هاله عدم رشد، افزایش بیشتری نشان داده است.



(الف) SF/PVA/B(0-20)% (ب) SF/PVA/B(20-40)% (ج) SF/PVA/B(40)Nce(1-1.5)%

شکل ۵ میانگین قطر هاله عدم رشد دیسک های حاوی محلول SF/PVA/B/Nce بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*؛



(الف) SF/PVA/B(0-20)% (ب) SF/PVA/B(20-40)% (ج) SF/PVA/B(40)Nce(1-1.5)%

شکل ۶ میانگین قطر هاله عدم رشد دیسک های حاوی محلول SF/PVA/B/Nce بر باکتری *باسیلوس سرئوس*

[۳۷]. بر اساس تحقیقات، B و Nce دارای اثرات ضد میکروبی هستند [۱۲] که می توانند خاصیت میکروب کشی روی باکتری هایی از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* داشته باشند که مهمترین عوامل عفونت زخم می باشند. لذا، ممکن است این سیستم با پیشگیری از ایجاد عفونت و رشد میکروارگانیسم ها موجب تسریع روند بهبودی زخم شود. بنابراین، می توان استنباط کرد که سیستم حاوی داروی A احتمالاً از طریق کاهش التهاب، جمع کردن رادیکال های آزاد و مواد اکسیدان، روند ترمیم زخم را بهبود بخشیده است.

جدول ۱ تعداد روزهای بهبود زخم در گروه های طراحی شده

گروه	نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	نمونه ۴
کنترل	۱۸	۱۷	۱۷	۱۹
داروی آنژی پارس	۱۴	۱۵	۱۴	۱۴
سیستم کامل A ⁻	۱۱	۱۲	۱۱	۱۳
سیستم کامل A ⁺	۱۰	۱۱	۹	۱۰



شکل ۴ روند بهبود زخم در بازه های زمانی متفاوت در موش های دیابتی با تزریق نمونه A⁺/SF/PVA/B/Nce

۳-۳ بررسی فعالیت ضد باکتریایی

برابر تحقیقات صورت گرفته، عصاره بره موم به عنوان ترکیب ضد میکروبی در مقابل باکتری ها شناخته شده است. هدف از افزایش این ماده، تقویت خاصیت ضد باکتری سیستم طراحی شده است. از آنجاکه باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* از مهم ترین عوامل عفونت زا برای انسان هستند، برای بررسی اثر ضد باکتری نانوالیاف طراحی شده از استفاده شد. در مطالعات انجام شده مشخص شد که بره موم علیه باکتری های گرم مثبت فعالیت بیشتری را نشان می دهد که علت آن تفاوت در دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی است. باکتری های گرم منفی دارای یک غشاء خارجی اضافی شامل لیپو پلی ساکاریدها، پروتئین ها و فسفولیپیدها هستند که باعث نفوذ ناپذیر شدن غشاء این باکتری ها نسبت به برخی از مولکول ها و مقاومت بیشتر آنها نسبت به باکتری های گرم مثبت می شود. در نتیجه باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) در مقایسه با باکتری گرم منفی اشریشیا کلی حساسیت بیشتری دارد [۳۱].

فعالیت ضد باکتریایی عصاره الکلی بره موم در برابر باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* در سه تکرار، از روش دیسک

جدول ۲ قطر هاله رشد بر حسب میلی‌متر بر اساس درصد‌های مختلف افزایش بره موم (B) در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس

ردیف	نمونه	میانگین قطر هاله بر حسب (mm) در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس	میانگین قطر هاله بر حسب (mm) در برابر باکتری باسیلوس سرئوس
۱	Control	۱۹	۱۶
۲	SF/PVA/B(10)%	۲۱	۲۵
۳	SF/PVA/B(20)%	۲۲٫۵	۱۹
۴	SF/PVA/B(30)%	۲۳	۱۸
۵	SF/PVA/B(40)%	۲۳٫۳	۱۸
۶	SF/PVA/B(40)NCe(1)%	۲۵	۱۷
۷	SF/PVA/B(40)NCe(1.5)%	۲۵	۱۸
۸	SF/PVA/B(40)NCe(1.5)A(10)%	۲۳	۱۷
۹	SF/PVA/B(40)NCe(1.5)A(15)%	۲۲	۱۳

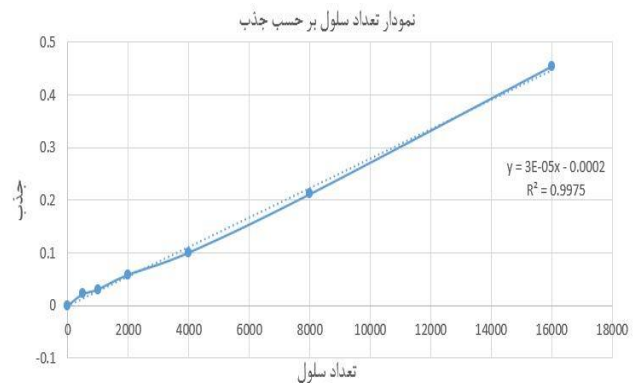
جدول ۳ نمودار استاندارد تعداد سلول بر حسب جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر

تعداد سلول	جذب
۵۰۰	۰/۰۲۲
۱۰۰۰	۰/۰۳۱
۲۰۰۰	۰/۰۵۹
۴۰۰۰	۰/۱۰۱
۸۰۰۰	۰/۲۱۲
۱۶۰۰۰	۰/۴۵۵

۳-۴ نتایج آزمون سمیت سلولی

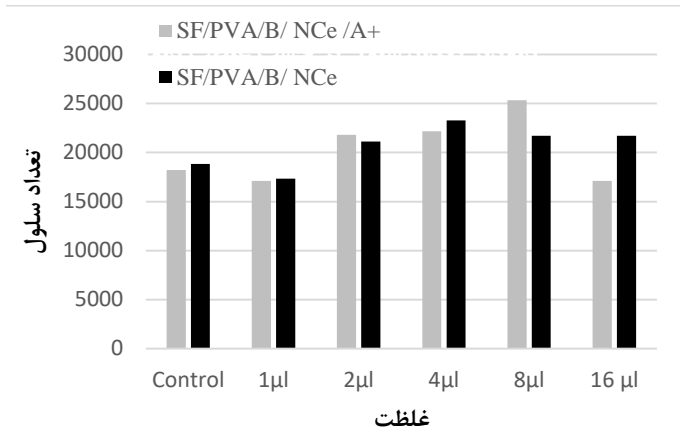
نتایج آزمون MTT نانوالیاف‌های طراحی شده بدون داروی آنژی پارس و همراه با دارو بر روی سلول‌های MCF-7 در جدول‌های ۳ تا ۷ ارائه شده است.

شکل ۷، نمودار استاندارد تعداد سلول بر حسب جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر را نشان می‌دهد. در پلیت ابتدایی غلظت‌های مشخصی از سلول بارگذاری شد. با توجه به نمودار، تعداد سلولی که بهترین شرایط را دارا بودند، در سایر چاهک‌ها به همان میزان تعداد سلول در ظرف‌های کشت سلول (چاهک‌ها) قرار داده شد. سپس نمونه SF/PVA/B/NCe/A⁺ بر آن تاثیر داده شد و تست MTT ارزیابی گردید و پس از ۲۴ ساعت میزان جذب ثبت و تعداد سلول‌ها برابر جدول ۳ بررسی گردید.

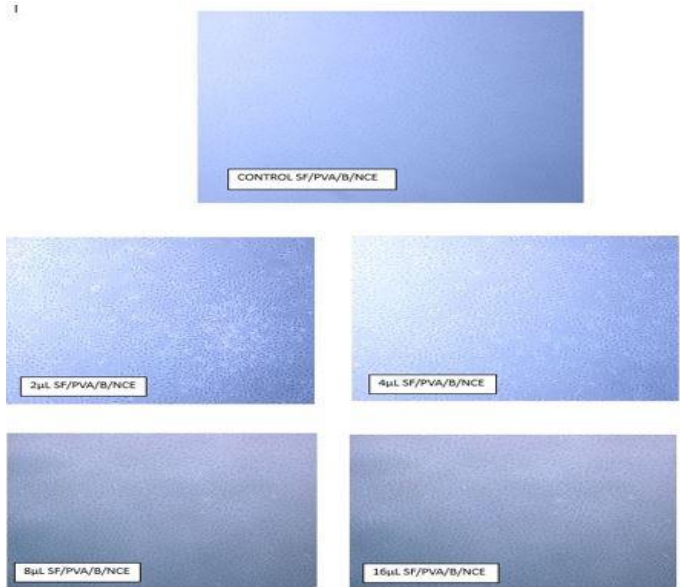


شکل ۷ نمودار استاندارد تعداد سلول بر حسب جذب در ۵۷۰ نانومتر

نتایج حاصل از بررسی زیست‌سازگاری نانوالیاف طراحی شده نشان داده است که نمونه SF/PVA/B/NCe در غلظت یک میکرولیتر نسبت به نمونه کنترل (دویست میکرولیتر)، کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی MCF-7 را به همراه داشته است (شکل ۸، جدول‌های ۴ و ۵). اما در غلظت‌های ۲ و ۴ و ۸ و ۱۶ میکرولیتر باعث افزایش تکثیر سلول‌ها گردیده است؛ در واقع رشد سلول‌های سرطانی را تسریع و اثر سمیت بر این رده سلولی را تأیید می‌نماید (شکل ۹). نتایج فوق با داده‌های جدول ۶ تطبیق دارد به طوری که با افزایش غلظت نمونه ۲، ۴، ۸ و ۱۶ میکرولیتر مقدار جذب افزایش یافته است (شکل ۱۰). در نانوالیاف بدون داروی آنژی پارس فقط غلظت یک میکرولیتر باعث از بین بردن سلول‌های سرطانی MCF-7 گردیده است؛ ولی کاهش آن در مقایسه با سلول‌های کنترل، کاهش معنی‌داری نمی‌باشد؛ لذا نمی‌توان از غلظت یک میکرولیتر به عنوان نمونه ضد سرطانی یاد کرد. سایر غلظت‌ها باعث افزایش و تکثیر سلول‌های سرطانی گردیده است. نتایج حاصل از این داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل واقع شده و مشاهده شد که نتایج مربوطه به غلظت مزبور نسبت به نمونه کنترل (شامل نمونه سلولی به‌تنهایی) معنی‌دار نبوده که این خود تأییدکننده نتیجه گرفته شده از نمودارها است.



شکل ۹ مقادیر تعداد سلول بر حسب غلظت نمونه های SF/PVA/B/Nc و SF/PVA/B/Nc/A+



شکل ۱۰ سلول های سرطانی MCF-7 با غلظت های مختلف نمونه SF/PVA/B/Nc بر حسب میکرولیتر

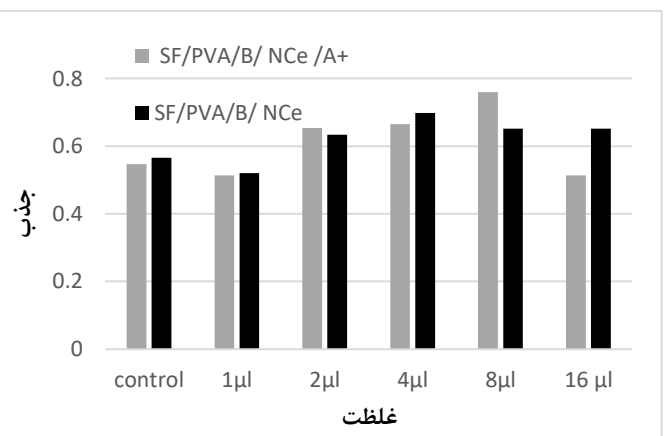
نتایج آزمون MTT نانوالیاف حاوی داروی آنژی پارس (SF/PVA/B/Nc/A+) به خوبی نشان می دهد (شکل ۱۱، جدول ۶ و نمودار ۸) که با افزایش غلظت در مقدار ۱۶ میکرولیتر نمونه، ضمن کاهش اثر سمیت، سبب ممانعت از رشد تکثیر سلولی گردیده و کاهش معنی داری نسبت به نمونه کنترل رخ داده است؛ بطوری که می توان گفت غلظت یک میکرولیتر از این نمونه، خاصیت ضد سرطانی را دارد. این نتایج با داده های جدول ۷ (غلظت نمونه بر حسب جذب) و نمودار ۵ همخوانی و تطبیق دارد. نتایج حاصل از این داده ها توسط نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل واقع شد و مشاهده گردید که نتایج مربوط به غلظت مزبور نسبت به نمونه کنترل (حاوی نمونه سلولی به تنهایی) معنی دار بوده که این خود تأییدکننده نتایج به دست آمده می باشد.

جدول ۴ مقادیر جذب بر حسب غلظت های مختلف نمونه SF/PVA/B/Nc

Control	µl ۱	µl ۲	µl ۴	µl ۸	µl ۱۶
۰/۵۳	۰/۱۶۲	۰/۱۶	۰/۱۷۲	۰/۱۷۶	۰/۵۳
۰/۱۵	۰/۱۵۹	۰/۱۶	۰/۱۶۵۷	۰/۱۶۵	۰/۱۶۹
۰/۱۵۱	۰/۱۵۱۴	۰/۱۵۶۴	۰/۱۵۹۶	۰/۱۶۸۹	۰/۱۶۴
۰/۴۸	۰/۱۵۵	۰/۱۶۸	۰/۱۹۴۲	۰/۱۵۹۴۹	۰/۱۶۵
۰/۵۳	۰/۱۵۱	۰/۱۶۱۸	۰/۱۷۱۳	۰/۱۶۸	۰/۱۶۶
۰/۱۹۵۲	۰/۱۵۱	۰/۱۷۲	۰/۱۶۱۸	۰/۱۵۹۳	۰/۱۶۷
۰/۱۵۱	۰/۴	۰/۱۶۲	۰/۱۶۷	۰/۱۶۹۶	۰/۱۶۷۲
۰/۱۵۴۶	۰/۱۵۳۹	۰/۱۶۹	۰/۱۷۰۷	۰/۱۷۱	۰/۱۶۵
۰/۱۵۳	۰/۴۵	۰/۱۶۱	۰/۱۶۶	۰/۱۶	۰/۱۷
۰/۱۵۶۵۳۳۳	۰/۱۵۲۰۳۳۳	۰/۱۶۳۳۵۵۶	۰/۱۶۹۸۱۱۱	۰/۱۶۵۱۶۱۳	۰/۱۶۵۱۳۳۳
Control	µl ۱	µl ۲	µl ۴	µl ۸	µl ۱۶
۰/۱۵۶۵۳۳۳	۰/۱۵۲۰۳۳۳	۰/۱۶۳۳۵۵۶	۰/۱۶۹۸۱۱۱	۰/۱۶۵۱۶۱۳	۰/۱۶۵۱۳۳۳

جدول ۵ مقادیر تعداد سلول بر حسب غلظت نمونه SF/PVA/B/Nc

Control	µl ۱	µl ۲	µl ۴	µl ۸	µl ۱۶
۱۷۶۷۳/۳۳	۲۰۶۷۳/۳۳	۲۰۰۶/۶۷	۲۴۰۰۶/۶۷	۲۴۳۲۶/۷	۱۷۶۷۳/۳۳
۱۶۶۷۳/۳۳	۱۹۶۷۳/۳۳	۲۰۰۶/۶۷	۲۱۹۰۶/۶۷	۲۱۶۷۳/۳۳	۲۳۰۰۶/۶۷
۱۷۰۰۶/۶۷	۱۷۱۴۰	۱۸۸۰۶/۶۷	۱۹۸۷۳/۳۳	۲۲۹۷۳/۳۳	۲۱۳۴۰
۱۶۰۰۶/۶۷	۱۸۳۴۰	۲۲۶۷۳/۳۳	۳۱۴۰۶/۶۷	۱۹۸۳۶/۶۷	۲۱۶۷۳/۳۳
۱۷۶۷۳/۳۳	۱۷۰۰۶/۶۷	۲۰۶۰۶/۶۷	۲۳۷۷۳/۳۳	۲۲۶۷۳/۳۳	۲۲۰۰۶/۶۷
۳۱۷۴۰	۱۷۰۰۶/۶۷	۲۴۰۰۶/۶۷	۲۰۶۰۶/۶۷	۱۹۷۷۳/۳۳	۲۲۳۴۰
۱۷۰۰۶/۶۷	۱۳۳۴۰	۲۰۶۷۳/۳۳	۲۲۳۴۰	۲۳۲۰۶/۶۷	۲۲۴۰۶/۶۷
۱۸۲۰۶/۶۷	۱۷۹۷۳/۳۳	۲۳۰۰۶/۶۷	۲۳۵۷۳/۳۳	۲۳۶۷۳/۳۳	۲۱۶۷۳/۳۳
۱۷۶۷۳/۳۳	۱۵۰۰۶/۶۷	۲۰۳۴۰	۲۲۰۰۶/۶۷	۲۰۰۰۶/۶۷	۲۳۳۴۰
۱۸۸۵۱/۱۱	۱۷۳۵۱/۱۱	۲۱۱۲۵/۱۹	۲۳۲۷۷/۰۴	۲۱۷۲۷/۰۸	۲۱۷۱۷/۷۸
Control	µl ۱	µl ۲	µl ۴	µl ۸	µl ۱۶
۱۸۸۵۱/۱۱	۱۷۳۵۱/۱۱	۲۱۱۲۵/۱۹	۲۳۲۷۷/۰۴	۲۱۷۲۷/۰۸	۲۱۷۱۷/۷۸



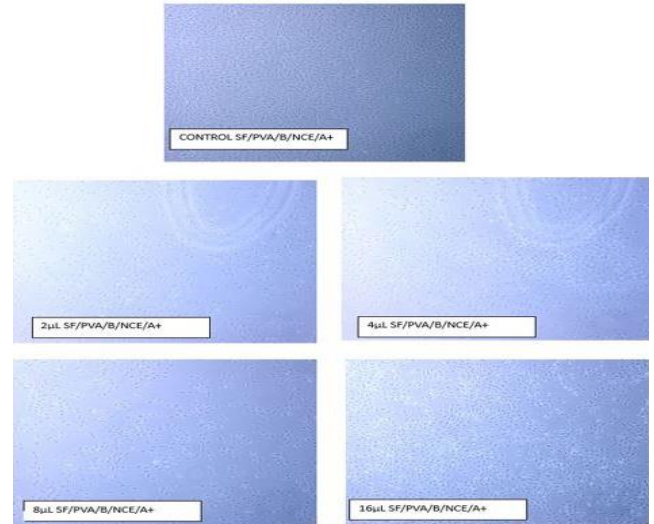
شکل ۸ نمودار جذب بر حسب غلظت نمونه های SF/PVA/B/Nc و SF/PVA/B/Nc/A+

الکترورسی شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM) مشاهده شد. قطر نانوالیاف به دست آمده با افزایش برهموم و نانوذره کاهش یافت. توانایی های ضد میکروبی و سازگاری سلولی با روش اندازه گیری از روش دیسک کاغذی (تعیین قطر هاله عدم رشد) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی قطر هاله عدم رشد در برابر باکتری گرم مثبت /استافیلوکوکوس اورئوس و گرم منفی /باسیلوس سرئوس نشان داد که اثر ضد باکتریایی نانوالیاف با افزایش برهموم ۴۰ درصد و نانوذره اکسید سریم ۱/۵ درصد در برابر باکتری /استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با نمونه اولیه افزایش یافته است. علاوه بر این، سنجش سمیت مولکولی (MTT) در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد، نمونه نهایی (SF PVA B40 NCe1.5A15%) در بیشترین غلظت (۱۶ میکرولیتر) فاقد سمیت مولکولی است. این نتایج نشان می دهد که نانوالیاف طراحی شده فیبروئین ابریشم و پلی وینیل الکل (PVA/SF) آماده شده می تواند کاندیدای امیدوار کننده ای برای کاربردهای ترمیم زخم باشند.

از طرف دیگر مهم ترین ویژگی های یک زخم بند جهت ترمیم زخم، علاوه بر شرایط زیستی و عملکرد ماتریکس خارج سلولی چه از لحاظ ترکیب شیمیایی و چه از نظر ساختار فیزیکی، چسبیدن به زخم، زیست سازگار بودن، کنترل فقدان رطوبت و عفونت، عدم ایجاد سمیت، قیمت مناسب و در دسترس بودن آن هست که با توجه به مطالعات انجام شده در این تحقیق زخم بند تولید شده کلیه ویژگی های مربوطه را داشته و می تواند در روند ترمیم زخم، بسیار مؤثر واقع شود.

مراجع

- [1] A. Mokhtar Zadeh, A. Alabaster, M. Hejazi, Y. Omid, and J. Ezzati Nezhad Dolatabad, "Bacterial-Derived Biopolymers: Advanced Natural Nanomaterials for Drug Delivery and Tissue Engineering", *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 82, pp. 367-384, 2016.
- [2] A. Repines and B. Glassmaker, "Dipyridamole Embedded in Polycaprolactone Fibers Prepared by Coaxial Electrospinning as a Novel Drug Delivery System", *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 29, pp. 132-142, 2015.
- [3] S.C. Kundu, "Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine", Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Number 74, UK, 2014.
- [4] M. Mori, P.V. Almeida, M. Cola, G. Anselmi, E. Mäkilä, A. Correia, J. Salonen, J. Hirvonen, C. Caramella, and H.A. Santos, "In Vitro assessment of biopolymer-modified porous silicon microparticles for wound healing applications", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 88, pp. 635-642, 2014.
- [5] Hakimi, O., et al., "Spider and mulberry silkworm silks as compatible biomaterials", *Composites Part B: Engineering*, vol. 38, no. 3, pp. 324-337, 2007.
- [6] E. B. de Almeida, J. Cordeiro Cardoso, A. Karla de Lima, N. L. de Oliveira, N. T. de Pontes-Filho, S. Oliveira Lima, I. C. Leal Souza, and R. L. C. de Albuquerque-Júnior, "The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 147, pp. 419-425, 2013.



شکل ۱۱ سلول های سرطانی MCF-7 با غلظت های مختلف نمونه SF/PVA/B/NCE/A+ بر حسب میکرولیتر

جدول ۶ مقادیر جذب بر حسب غلظت های مختلف نمونه SF/PVA/B/NCE/A+

Control	µl ۱	µl ۲	µl ۴	µl ۸	µl ۱۶
۰/۵۲۱	۰/۵۶	۰/۶۳	۰/۶۱۷	۰/۸۱۵	۰/۵۶
۰/۵۳	۰/۵	۰/۵۴	۰/۷۳	۰/۷۵	۰/۵
۰/۵۶	۰/۶	۰/۵۹۱	۰/۶۱۷	۰/۸۱	۰/۶
۰/۵۵۲	۰/۴۸۶	۰/۶۹	۰/۵۷	۰/۷۴	۰/۴۸۶
۰/۶۰۳	۰/۴۸۵	۰/۶۷۴	۰/۷۰۵	۰/۷۲۱	۰/۴۸۵
۰/۵۶	۰/۴۹۵	۰/۶۹	۰/۶۷	۰/۷۳۴	۰/۴۹۵
۰/۴۸۹	۰/۴۹۲	۰/۶۷۸	۰/۷۱۳	۰/۸۱	۰/۴۹۲
۰/۵۳۲	۰/۴۹۶	۰/۶۸	۰/۶۸۱	۰/۷۲۹	۰/۴۹۶
۰/۵۷۲	۰/۵۰۷	۰/۷۱	۰/۶۸۵	۰/۷۳	۰/۵۰۷
۰/۵۴۶۵۵۶	۰/۵۱۳۴۴۴	۰/۶۵۳۶۶۷	۰/۶۶۵۳۳۳	۰/۷۵۹۸۸۹	۰/۵۱۳۴۴۴
Control	µl ۱	µl ۲	µl ۴	µl ۸	µl ۱۶
۰/۵۴۶۵۵۶	۰/۵۱۳۴۴۴	۰/۶۵۳۶۶۷	۰/۶۶۵۳۳۳	۰/۷۵۹۸۸۹	۰/۵۱۳۴۴۴

جدول ۷ مقادیر تعداد سلول بر حسب غلظت نمونه SF/PVA/B/NCE/A+

Control	µl ۱	µl ۲	µl ۴	µl ۸	µl ۱۶
۱۷۳۷۳/۳۳	۱۸۶۷۳/۳۳	۲۱۰۰۶/۶۷	۲۰۵۷۳/۳۳	۲۷۱۷۳/۳۳	۱۸۶۷۳/۳۳
۱۷۶۷۳/۳۳	۱۶۶۷۳/۳۳	۱۸۰۰۶/۶۷	۲۴۴۴۰	۲۵۰۰۶/۶۷	۱۶۶۷۳/۳۳
۱۸۶۷۳/۳۳	۲۰۰۰۶/۶۷	۱۹۷۰۶/۶۷	۲۰۵۷۳/۳۳	۲۷۰۰۶/۶۷	۲۰۰۰۶/۶۷
۱۸۴۰۶/۶۷	۱۶۲۰۶/۶۷	۲۳۰۰۶/۶۷	۱۹۰۰۶/۶۷	۲۴۶۷۳/۳۳	۱۶۲۰۶/۶۷
۲۰۱۰۶/۶۷	۱۶۱۷۳/۳۳	۲۲۴۷۳/۳۳	۲۳۵۰۶/۶۷	۲۴۰۴۰	۱۶۱۷۳/۳۳
۱۸۶۷۳/۳۳	۱۶۵۰۶/۶۷	۲۳۰۰۶/۶۷	۲۲۳۴۰	۲۴۴۷۳/۳۳	۱۶۵۰۶/۶۷
۱۶۳۰۶/۶۷	۱۶۴۰۶/۶۷	۲۲۶۰۶/۶۷	۲۳۷۷۳/۳۳	۲۷۰۰۶/۶۷	۱۶۴۰۶/۶۷
۱۷۷۴۰	۱۶۵۴۰	۲۲۶۷۳/۳۳	۲۲۷۰۶/۶۷	۲۴۳۰۶/۶۷	۱۶۵۴۰
۱۹۰۷۳/۳۳	۱۶۹۰۶/۶۷	۲۲۶۷۳/۳۳	۲۲۸۴۰	۲۴۳۴۰	۱۶۹۰۶/۶۷
۱۸۲۲۵/۱۹	۱۷۱۲۱/۴۸	۲۱۷۹۵/۵۶	۲۲۱۸۴/۴۴	۲۵۳۳۶/۳	۱۷۱۲۱/۴۸
Control	µl ۱	µl ۲	µl ۴	µl ۸	µl ۱۶
۱۸۲۲۵/۱۹	۱۷۱۲۱/۴۸	۲۱۷۹۵/۵۶	۲۲۱۸۴/۴۴	۲۵۳۳۶/۳	۱۷۱۲۱/۴۸

۴ نتیجه گیری

در این پژوهش نانوالیاف فیبروئین ابریشم (SF) و پلی وینیل الکل (PVA) با موفقیت الکترورسی شد. خصوصیات ساختار و مورفولوژی نانوالیاف مخلوط

- [7] S. Vujanovic and J. Vujanovic, "Bioresources in the pharmacotherapy and healing of burns: a mini-review," *Burns*, vol. 39, pp. 1031-1038, 2013.
- [8] P. Olczyk, P. Ramos, K. Komosinska-Vassev, J. Stojko, and B. Pilawa, "Positive Effect of Propolis on Free Radicals in Burn Wounds," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, pp. 1-18, 2013.
- [9] A.K. Kuropatnicki, E. Szliszka, and W. Krol, "Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, pp. 1-11, 2013.
- [10] J.I. Kim, H.R. Pant, H.J. Sim, K.M. Lee, and C.S. Kim, "Electrospun Propolis/Polyurethane Composite Nanofibers for Biomedical Applications", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 44, pp. 52-57, 2014.
- [11] M.I. Ismail, A. Roslan, N.S. Saari, K.H. Hashim, and M.R. Kalamullah, "Ethanolic Extract of Propolis for Biodegradable Films Packaging Enhanced with Chitosan," *AIP Conference Proceedings*, vol. 1885, no.1, 2017.
- [12] C. Sun, H. Li, and L. Chen "Nanostructured ceria-based materials: Synthesis, properties, and applications", *Energy Environ. Sci.*, vol. 5, no. 9, pp. 8475-8505, 2012.
- [13] R.W. Tarnuzzer, J. Colon, S. Patil, and S. Seal. "Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage", *Nano Letters*, vol. 5, pp. 2573-2577, 2005.
- [14] Y.Y. Tsai, J. Oca-Cossio, K. Agering, N.E. Simpson, M.A. Atkinson, C.H. Wasserfall, L. Constantinidis, and W. Sigmund, "Novel synthesis of cerium oxide nanoparticles for free radical scavenging", *Nanomedicine*, vol. 2, pp. 325-332, 2007.
- [15] B. Park, K. Donaldson, R. Duffin, L. Tran, F. Kelly, L. Mudway, J.P. Morin, R. Guest, P. Jenkinson, Z. Samaras, M. Giannouli, H. Kouridis, and P. Martin, "Hazard and risk assessment of a nanoparticulate cerium oxide-based diesel fuel additive- A case study", *Inhalation Toxicology*, vol. 20, pp. 547-566, 2009.
- [16] L. De Marzi, A. Monaco, J. De Lapuente, D. Ramos, M. Borras, M. Gioacchino, S. Santucci, and A. Poma, "Cytotoxicity and genotoxicity of ceria nanoparticles on different cell lines in vitro", *International Journal Molecular Sciences*, vol. 14, pp. 3065-3077, 2013.
- [17] Y. Kuang, X. He, Z. Zhang, Y. Li, H. Zhang, Y. Ma, Z. Wu, and Z. Chai, "Comparison study on the antibacterial activity of nano- or bulk-cerium oxide", *J Nanoscience Nanotechnology*, vol. 11, pp. 4103-4108, 2011.
- [18] B.H. Chen, K. Suresh Babu, M. Anandkumar, T.Y. Tsai, T.H. Kao, and B.S. Inbaraj, "Cytotoxicity and antibacterial activity of gold-supported cerium oxide nanoparticles", *International Journal Nanomedicine*, vol. 9, pp. 5515-5531, 2014.
- [19] S.B. Aziz, E.M.A. Dannoun, D.A. Tahir, S.A. Hussien, R.T. Abdulwahid, M.M. Nofal, R.M. Abdullah, A.M. Hussein, and I. Brevik, "Synthesis of PVA/CeO₂ Based Nanocomposites with Tuned Refractive Index and Reduced Absorption Edge: Structural and Optical Studies", *Materials*, vol. 14, no. 6, pp. 1570-1588, 2021.
- [20] Sh. Cui, X. Zhu, D. Xu, W. Liu, H. Yi, and J. Yan, "Novel design and combination strategy of minocycline and OECs-loaded CeO₂ nanoparticles with SF for the treatment of spinal cord injury: In vitro and in vivo evaluations", *Green Processing and Synthesis*, vol. 10, no. 1, pp. 614-627, 2021.
- [21] S.C. Kundu, "Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine", Woodhead Publishing Series in Biomaterials: Number 74, UK, pp. 547-555, 2014.
- [22] M. Asadi-Shekaari, H.E. Vaghefi, A. Talakoub, and H.K. Khorshid, "Effects of Semelil (ANGIPARS™) on focal cerebral ischemia in male rats", *Daru: Journal of Faculty of Pharmacy. Tehran University of Medical Sciences*. Vol. 18, no. 4, pp. 265-269, 2010.
- [23] B.M. Min, G. Lee, S.H. Kim, Y.S. Nam, T.S. Lee, and W.H. Park, "Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro", *Biomaterials*, vol. 25, pp. 1289-1297, 2004.
- [24] N. Amiraliyan, M. Nouri, and M. Haghghat Kish, "electrospinning of silk nanofibers. i. an investigation of nanofiber morphology and process optimization using response surface methodology", *Fiber Polymers*, vol. 10, pp. 167-176, 2009.
- [25] Y. Bian, R. Wang, S. Hang Ting, Ch. Chen, and L. Zhang, "Electrospun SF/PVA nanofiber filters for highly efficient PM_{2.5} capture", *Transactions on Nanno Technology*, vol. 17, no. 5, pp. 1-6, 2018.
- [26] L. Dai, J. Li, and E. Yamada, "Effect of glycerin on structure transition of PVA/SF blends" *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 86, no. 9, pp. 2342-2347, 2002.
- [27] A. Raksa, R. Utke, Ch. Ruksakulpiwat, P. Numpaisal, and Y. Ruksakulpiwat, "Morphological and chemical characterization of electrospun silk fibroin/polyvinyl alcohol", *Nanofibers*, vol. 2279, pp. 080004(1-5), 2020.
- [28] F. Zeighampour, E. Shams, and N. S. Naghavi, "Antibacterial activity of propolis ethanol extract against antibiotic resistance bacteria isolated from burn wound infections," *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, vol. 16, no. 3, pp. 25-30, 2013.
- [29] M.A.M. Hussein, O. Gunduz, A. Sahin, M. Grinholc, I. Mohamed El-Sherbiny, and M. Megahed, "Dual spinneret electrospun polyurethane/ PVA -gelatin nanofibrous scaffolds containing cinnamon essential oil and nanoceria for- chronic diabetic wound healing preparation physicochemical characterization and in-vitro", *Evaluation Molecules*, vol. 27, no. 7, pp. 2146-2165, 2022.
- [30] M. Ranjbar-Mohammadi, and F. Tajdar, "Gelatin/Polycaprolactone and Poly(vinylalcohol)/Chitosan Hybrid Nanofibers: Determining Factors on Their Morphology", *Iran Journal of Polymer Science Technology*, vol. 35, no.3, pp. 201-214, 2022.
- [31] A.G. Legazpi, F.K.A. El-Hady, and F.A.M. Abd Allah, "Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis", *Z Caterforce*, vol. 55C, pp. 70 -75, 2000.
- [32] P.O. Rujitanaroj, N. Pimpha, and P. Supaphol, "Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun gelatin fiber mats containing silver nanoparticles," *Polymer*, vol. 49, pp. 4723-4732, 2008.

- [33] K.Z. Gumargalieva and G.E. Zaikov, "Burn dressings sorption and desorption kinetics and mechanism," *Key Engineering Materials: Interdisciplinary Concepts and Research*, vol. 2, pp. 257-305, 2014.
- [34] S. Ramakrishna, "An introduction to electrospinning and nanofibers", World Scientific, 2005.
- [35] Z.M. Huang, Y.Z. Zhang, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites", *Composites Science and Technology*, vol. 63, no. 15, pp. 2223-2253, 2003.
- [36] M. Asadi-Shekaari, H.E. Vaghefi, A. Talakoub, and H.K. Khorshid, "Effects of Semelil (ANGIPARSTTM) on focal cerebral ischemia in male rats", *Daru: Journal of Faculty of Pharmacy. Tehran University of Medical Sciences*. Vol. 18, no. 4, pp. 265-269, 2010.
- [37] M. Allahtavakoli, M. Khaksari Haddad, and Sh. Assar, "Comparison of topical application of Mummify and Phenytoin cream on skin wound healing in rat", *Journal of Babol University of Medical Sciences*, vol. 5, no. 18, pp. 7-13, 2003.
- [38] J.C. Stockert, A. Basques-Castro, M. Cañete, R.W. Horobin, and A. Villanueva, "MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets", *Acta Histochemica*, vol. 114, no. 8, pp. 785-96, 2012.