

مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران

سال ۶ شماره ۹، پاییز ۱۳۹۱، صفحات ۳۶-۳۱

## تهیه نانوالیاف پلیمری کیتوسان/PEO و افزودنی موپیروسین با استفاده از روش الکتروریسی جهت استفاده در پوشش زخم های سطحی

سید حسن حسینی<sup>۱</sup>، مینو صدری<sup>۲</sup>، مهدی فصیحی<sup>۳</sup>، رضا رنجبر\*

۱) مرکز نانوبیوتکنولوژی، پژوهشگاه طب رزم، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

۲) مرکز فناوری زیستی، دانشگاه مالک اشتر

۳) مرکز فناوری زیستی، دانشگاه بقیه الله (عج)

نویسنده رابط: دکتر رضا رنجبر، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشگاه طب رزم، دانشگاه بقیه الله (عج)

[h\\_hoseini1@yahoo.com](mailto:h_hoseini1@yahoo.com)

همراه: ۰۹۳۵۲۱۷۸۵۷۹

### چکیده:

زمینه و اهداف: یک پوشش مناسب برای زخم باید زیست سازگار، زیست تخریب پذیر، تسریع کننده ترمیم و بهبودی زخم و ... باشد. در این مطالعه برای یافتن و ارتقاء روش جدید با استفاده از فناوری نانو تلاش گردید و از پلیمرهای کیتوسان و PEO و آنتی بیوتیک موپیروسین، استفاده شد. هدف، در این مطالعه، تلاش برای تهیه الیاف از مخلوط پلیمری و موپیروسین در اندازه نانو و بررسی تأثیرات آنها بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و روند ترمیم زخم های سطحی بود.

روش بررسی: نسبت های مختلفی از مخلوط کیتوسان و PEO تهیه شد و پس از تهیه الیاف با استفاده از دستگاه پرتابل الکتروریسی، از هرکدام تصاویر SEM گرفته شد. در مرحله بعد پس از افزودن موپیروسین به مخلوط مجدداً الیاف و تصاویر تهیه شد. در مرحله سوم تست های باکتریولوژیکی برای بررسی تأثیرات عوامل دخیل در مخلوط ها انجام شد. نهایتاً تست های حیوانی بر روی رت انجام شد.

یافته ها: بهترین نتایج از مخلوط های ۲۰/۸۰ و ۱۰/۹۰ کیتوسان/PEO برای تهیه نانو الیاف حاصل شد که الیافی یکدست با کمترین گره را تولید کردند. با حذف دی متیل سولفوکسید، شکل مناسبی از الیاف بدست نمی آمد. با افزودن موپیروسین، الیاف ماندگاری بدست نیامد و تنها پوششی بسیار نازکی بر روی سطح مورد نظر ایجاد شد. در تست های باکتریولوژیکی، حساسیت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به عوامل دخیل از جمله کیتوسان و مخلوط آن با PEO و موپیروسین تأیید گردید. در تست های حیوانی، تأثیر مفید عوامل فوق بر روند ترمیم زخم نیز مشخص شد.

نتیجه گیری: از مخلوط کیتوسان/PEO و موپیروسین به دلیل داشتن اشاره شده در بالا می توان برای تهیه پوشش زخم های سطحی استفاده نمود. از این پلیمرها میتوان بخوبی نانوالیاف و پوشش های بسیار نازک بر روی سطوح مورد نظر از جمله زخم های سطحی تهیه نمود.

کلید واژه ها: کیتوسان، PEO، الکتروریسی، موپیروسین و زخم های سطحی

**مقدمه:**

تاکنون برای پوشانیدن انواع زخم از روش های متنوعی استفاده شده است که هر یک دارای ویژگی هایی بوده اند. برای داشتن یک پوشش مناسب زخم باید ویژگی هایی را در نظر داشت، از جمله می توان به زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، تسریع کننده روند بهبود و ترمیم زخم، جلوگیری از ایجاد عفونت های ثانویه به ضربه وزخم، جلوگیری از ایجاد نشانگاه زخم (اسکار) و ... اشاره نمود. روش های قدیمی و حتی رایج دارای کاستی هایی بوده و هستند و اغلب حداقل یکی از ویژگی های فوق را ندارند. در روش های جدید و آینده تلاش برای داشتن پوشش هایی برای زخم صورت خواهد گرفت که دارای بهینه ترین ویژگی ها باشند. در این مطالعه، با استفاده از علم نانویوتکنولوژی، برای دست یافتن به هدف فوق تلاش گردید و در این راستا از پلیمرهای کیتوسان و پلی اتیلن اکساید و آنتی بیوتیک موپیروسین نانوالیافی را با استفاده از یک دستگاه الکترورسی پرتابل تهیه گردید (۳،۲،۱). پلیمر طبیعی اصلاح شده کیتوسان و پلیمر سنتزی پلی اتیلن اکساید دارای اغلب خواص فوق بوده و در بسیاری از صنایع دارویی، غذایی و ... کاربرد روزافزونی یافته اند. به دلیل ویسکوزیته بالای محلول پلیمری کیتوسان، الکترورسی آن به خوبی صورت نمی گیرد، برای کاهش ویسکوزیته آن پلیمر پلی اتیلن اکساید به آن افزوده می شود (۹-۴).

داروی موپیروسین، علیه محدوده وسیعی از عفونت های باکتریائی، که مهمترین آنها ابتلاء به زرد زخم و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم در برابر متی سیلین است، مؤثر است. با این حال، در برابر همه انواع این باکتری مؤثر نیست و اثر آن در برخی مناطق کاهش یافته است. موپیروسین در غلظت های کم باکتریواستاتیک و در غلظت های بالا باکتری سیدال است. این دارو به صورت موضعی استفاده می شود و بر علیه باکتری های گرم مثبت از جمله MRSA مؤثر است (۱۰، ۱۱، ۱۲)

از تریتون X-100 به عنوان یک سورفکتانت غیر یونی برای کاهش کشش سطحی محلول ها و از دی متیل

سولفوکساید (DMSO)، به عنوان کمک حلال استفاده می شود. برای داشتن نانوالیاف یک دست و با حداقل گره از این مواد استفاده می شود (۱۴ و ۱۳).

**مواد و روش ها:**

مواد و ابزار: پلیمر کیتوسان با وزن ملکولی متوسط  $1.0 \times 10^6 \text{ g/mol}$ ، پلیمر پلی اتیلن اکساید با وزن ملکولی متوسط  $90,000 \text{ g/mol}$ ، استیک اسید گلاسیال با درجه خلوص ۹۹/۸٪ و وزن ملکولی  $60,050 \text{ g/mol}$ ، آبمقطر دوبار تقطیر دیونیزه، تریتون X-100، دی متیل سولفوکساید (DMSO)، پودر آنتی بیوتیک موپیروسین، محیط کشت آنتی بیوگرام مولر هیتون آگار (MHA) و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* گونه ATCC6538، دستگاه الکترورسی پرتابل و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM).

تهیه محلول ها: پس از تهیه استیک اسید ۰/۵ مولار، با استفاده از پودر پلیمرهای کیتوسان و PEO و استیک اسید تهیه شده، به ترتیب محلول های ۲٪ و ۳٪ وزنی حجمی را تهیه نموده و با استفاده از این محلول ها، نسبت های ۵۰/۵۰، ۴۰/۶۰، ۳۰/۷۰، ۲۰/۸۰ و ۱۰/۹۰ کیتوسان/PEO تهیه شد. در مرحله دوم، از تریتون X-100 نیز استفاده شد. به این ترتیب که برای تهیه نسبت ۱۰/۹۰ کیتوسان/PEO برابر با مقدار PEO، تریتون اضافه شد. در مرحله سوم از DMSO به نسبت ۱۰٪ در محلول پلیمری استفاده گردید. در مرحله آخر به محلول ها، پودر موپیروسین به نسبت های مختلف ۳-۲-۱-۰/۵٪ اضافه شد.

تهیه الیاف: با محلول های تهیه شده توسط دستگاه الکترورسی در ولتاژهای مختلف ۱۸-۲۰-۲۲-۲۴ kV-۱۶-۱۴ پاشش صورت گرفت. فواصل بین نوک نازل تا سطح جمع کننده ۲۵-۲۰-۱۵-۱۰-۵ cm بود. عمل پاشش بر روی سطوح مختلف مانند ورق آلومینیومی و سطح پوست انسان و سطح پوست رت انجام شد.

تهیه عکس: از الیاف جمع آوری شده بر روی سطوح مختلف، توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی، تصویر تهیه شد.

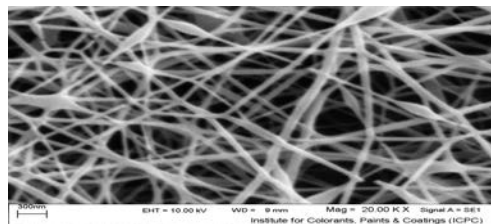
سوختگی درجه اول ایجاد شد. با استفاده از محلول های ۲۰/۸۰، ۱۰/۹۰ حاوی و فاقد مویروسین و DMSO با روش الکترورسی پاشش انجام شد. از یک حیوان، بدون پاشش دهی به عنوان شاهد منفی و از یک حیوان با پماد سیلور سولفادیازین (پماد سوختگی) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

#### یافته ها:

پس از تکرار چند باره هر کدام از مراحل تهیه محلول ها، تولید الیاف، تهیه عکس های SEM، تست های باکتریولوژیکی و حیوانی نتایج زیر حاصل شد. بهترین نسبت محلول ها برای هدف مورد نظر، ۲۰/۸۰ و ۱۰/۹۰ کیتوسان/PEO بود. فاصله مناسب برای تهیه الیاف ۱۵cm-۱۰ و ولتاژ مناسب ۱۸-۲۴kV بود (شکل ۱).

تست های باکتریولوژیکی: برای بررسی تأثیر یا عدم تأثیر کلیه عوامل دخیل در محلول ها، با استفاده از باکتری مورد نظر بر روی محیط کشت به چند روش عمل شد. در روش اول پس از کشت دادن باکتری از هر کدام از محلول ها و تک تک عوامل دخیل به یک اندازه یکسان قرار داده شد. در روش دوم بر روی محیط کشت فوق توسط دستگاه الکترورسی از محلول های تهیه شده پاشش صورت گرفت. در روش سوم، چاهک هایی در محیط کشت تعبیه گردید و درون هر چاهک مقداری یکسان از هر محلول قرار داده شد. در روش چهارم به مدت ۳ ساعت هر ماده یا محلول را با باکتری مجاور نموده و سپس بر روی محیط کشت پاساژ داده شد. در روش آخر تست حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) انجام شد.

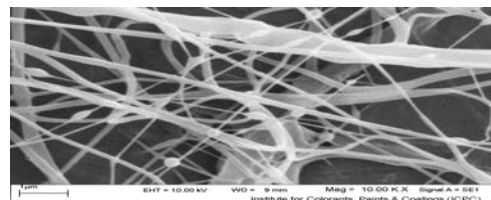
تست های حیوانی: بر روی ناحیه ای از پوست رت که موی آن تراشیده شده و توسط آب جوش به مدت ۵ ثانیه



شکل ۱- نانوالیاف تهیه شده از محلول ۱۰/۹۰ کیتوسان/PEO حاوی DMSO

شد. به دلیل سمیت آن در مراحل پوشش دهی بر روی زخم از آن نمی توان استفاده نمود (شکل ۲)

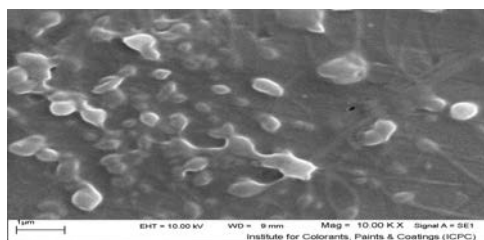
با حذف DMSO الیاف مناسبی نسبت به وقتی که از آن استفاده می شد، بدست نیامد. از این ماده فقط برای بررسی شکل الیاف و تعیین نسبت های بهینه از محلول ها استفاده



شکل ۲- نانوالیاف تهیه شده از محلول ۱۰/۹۰ کیتوسان/PEO بدون DMSO

خاصیت آنتی باکتریالی کیتوسان، محلول های کیتوسان/PEO، با نسبت های مختلف بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در تست های باکتریولوژیکی به اثبات رسید (شکل ۳).

با افزودن مویروسین به محلول های تهیه شده با نسبت های مختلف، تلاش برای تهیه الیاف موفقیت آمیز نبود. الیافی هم که تولید می شدند به سرعت به همدیگر ملحق شده و ایجاد یک لایه نازک بر روی سطح می کردند.



شکل ۳- لایه نازک ایجاد شده بر روی سطح مورد نظر از محلول پلیمری ۱۰/۹۰ کیتوسان/PEO حاوی مویروسین

مودار صورت می گرفت. در نواحی بدون مو الیاف به هم ملحق شده و ایجاد لایه نازک بر روی پوست می کردند. برای پوشش دهی بهتر است نواحی غیر زخمی توسط یک پارچه عایق غیر سلولزی پوشانده شود تا پوشش دهی فقط بر روی ناحیه زخمی صورت گیرد. نهایتاً این که بهترین مدت زمان برای ایجاد پوشش بر روی ناحیه زخمی مورد ۱۰-۵ دقیقه بود که به خوبی پوشش ایجاد می شد(جدول ۱).

تأثیر محلول های نهائی ۲۰/۸۰، ۱۰/۹۰ حاوی و فاقد مویروسین بر روی ترمیم زخم ناشی از سوختگی درجه یک به این صورت بود که سرعت ترمیم تقریباً برابر و یا حتی سریعتر از وقتی بود که از سیلور سولفادیازین استفاده شد. یافته های حاصل از استفاده از این روش برای ایجاد پوشش بر روی پوست انسان به این صورت بود که وقتی خود شخص اقدام به پاشش بر روی پوست خود می کرد، پوشش بهتر از وقتی صورت می گرفت که توسط شخص دیگر انجام می شد. نشست الیاف بیشتر بر روی نواحی

جدول ۱- نتایج تست های باکتری شناسی

ردیف	ماده مورد آزمایش	بعد از ۲۴ ساعت	بعد از ۴۸ ساعت	بعد از ۷۲ ساعت
۱	استیک اسید ۰/۵ مولار	بی اثر	بی اثر	بی اثر
۲	محلول کیتوسان ۲٪	کاهش رشد	کاهش رشد	کاهش رشد
۳	محلول PEO ۳٪	بی اثر	بی اثر	بی اثر
۴	تریئون X-100	بی اثر	بی اثر	بی اثر
۵	DMSO	بی اثر	بی اثر	بی اثر
۶	پودر مویروسین خالص	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
۷	محلول ۱۰/۹۰ کیتوسان/PEO	کاهش رشد	کاهش رشد	کاهش رشد
۸	محلول ۱۰/۹۰ کیتوسان/PEO+مویروسین ۲٪	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
۹	محلول ۱۰/۹۰ کیتوسان/PEO+مویروسین ۱٪	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
۱۰	محلول ۱۰/۹۰ کیتوسان/PEO+مویروسین ۰/۵٪	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد

تسریع کننده ترمیم زخم، تا حدودی ممانعت از خونریزی، عدم نیاز به تعویض چند باره پانسمان و عدم ایجاد نشانگاه زخم می باشد.

#### بحث:

یک پوشش مناسب برای زخم، دارای ویژگی های ممانعت از نفوذ عوامل عفونی بیرونی، عدم ممانعت از عبور اکسیژن و آب، زیست سازگار، زیست تخریب پذیر،

پوشش زخم گردد. روش الکتروریسی، به ما اجازه پوشش دهی بر روی زخم بدون نیاز به پانسما توسط گاز استریل و چسب زخم می دهد لذا از تازه شدن زخم به هنگام تعویض پانسما جلوگیری می شود و خود محلول پلیمری می تواند در ترمیم و جلوگیری از اسکار نقش مفید داشته باشد (۱۷).

### نتیجه گیری:

در روش الکتروریسی، با تهیه لیاف پلیمری از کیتوسان و پلی اتیلن اکساید و افزودنی موپیروسین در اندازه های نانو می توان پوشش مناسبی را بر روی زخم و ناحیه مصدوم ناشی از عوامل مختلف مانند سوختگی، خراشیدگی، بریدگی سطحی، زرد زخم و ... ایجاد کرد. این پوشش به دلیل ویژگی های مثبت از جمله زیست سازگاری و ترمیم کنندگی در روند ترمیم زخم تسریع نموده و از ایجاد عفونت باکتریائی جلوگیری می کند.

از این روش می توان در مراکز درمانی، سوانح و سوختگی، آمبولانس ها، گروه های امدادی، ورزشگاه ها، مناطق جنگی و ... استفاده نمود و به دلیل بهبود و ترمیم زخم و عدم نیاز به پانسما بیمار سریع تر به وضعیت عادی بر میگردد و از تحمیل هزینه های بعدی بر او و جامعه جلوگیری می گردد.

کیتوسان دارای خواص فوق بوده و در بسیاری از صنایع غذایی و دارویی از آن استفاده می شود. این محلول به دلیل ویسکوزیته بالا به تنهایی قابلیت ریسندگی ندارد. لذا برای کاهش ویسکوزیته از پلیمرهایی مانند PEO و PVA استفاده می شود. بهترین حالت زمانی است که نسبت وزنی حجمی ۲۰/۸۰ یا ۱۰/۹۰ از کیتوسان و پلیمر سنتزی تهیه گردد. کیتوسان در آب محلول است ولی بسیار کند این انحلال صورت می گیرد. برای تسریع در انحلال آن از استیک اسید استفاده می شود. در این مطالعه از استیک اسید ۰/۵ مولار استفاده شد. تأثیرات مثبت این پلیمر و حتی مواد حاصل از تجزیه آن در روند ترمیم زخم در تحقیقات مختلف به اثبات رسیده است و برای حالیت آن از نسبت های مختلفی از استیک اسید استفاده شده است (۱۵ و ۱۶).

آنتی بیوتیک موپیروسین که بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس پیوژنز مؤثر است، برای زخم های سطحی ناشی از سوختگی های درجه یک و تا حدودی درجه دو و زخم های ناشی از زرد زخم مفید می باشد (۱۰-۱۲).

پوشش ایجاد شده توسط محلول نهائی، بدلیل داشتن خواص مثبت عوامل دخیل در آن مانند کیتوسان، PEO و موپیروسین، از جمله، خاصیت آنتی باکتریالی، ترمیم کنندگی می تواند به خوبی جایگزین روش های قبلی

### منابع:

1-Jay P. Malmquist, DMD, Stephen C. Clemens, DMD, Hal J. Oien, DMD, and Sharon L. Wilson, RDA American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons J Oral Maxillofac Surg 66:1177-1183, 2008.  
2-Hua Xie, Yashodhan S. Khajanchee, Jeffrey S. Teach, Brian S. Shaffer Published 2007 in Wiley InterScience.  
3-www.zimmerdental.com  
4- Min, B. M; Lee, S. W; Lim, J. N; You, Y; Lee, T. S; Kang, P. H, Park, W.H, "Chitin and chitosan nanofibres: electrospinning of chitin and chitosan deacetylation of chitin nanofibers", Polymer 45:7137-7142, 2004.

5-Qin, Y; "Chitin and chitosan fibers as wound dressing materials", Innovative Technologies Ltd, 1991.  
6- Geng, X; Kwon, O. H; Jang, J; "Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution", Biomaterials 26:5427-5432, 2006.  
7-Rathke, T. D; Hudson, S. M; "Review of chitin and chitosan as fiber", J M.S-REV. Macromol. Chem. Phys C34(3), 375- 437, 1994.  
8- Subbiah, TH; Bhat, G. S; Tock, R. W; Parameswaran, S; Ramkumar, S. S; "Electrospinning of nanofibers", J Applied Polymer Sci, Vol 96, 557-569, 2005.

- 9- Bhattarai, N; Edmondson, D; Veiseh, O; Matsen, FA; Zhang, M; " Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility", *Biomaterials* 26: 6175-6184, 2005.
- 10-Fuller AT, Mellows G, Woolford M, Banks GT, Barrow KD, Chain EB . "Pseudomonic acid: an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*". *Nature* 234 (5329): 416-7, 1971.
- 11- Moodabe, Kate; Linda Bryant. "Topical antibiotics - more harm than good?". *Focus*: pp. 1, 2007.
- 12-Hughes J, Mellows G. "Inhibition of isoleucyl-transfer ribonucleic acid synthetase in *Escherichia coli* by pseudomonic acid". *Biochem. J.* , 1978.
- 13- Triton X-100 Product detail page from Sigma-Aldrich.
- 14- Novak, K. M., ed. *Drug Facts and Comparisons* (56th ed.). St. Louis, Missouri: Wolters Kluwer Health.. p. 619, 2002.
- 15- Zivanovic S., J.R., Draughon F.A., "Extention of Fresh Produce Shelf Life With Novel Chitosan coatings", Department of Food Science and Technology, University of Tennessee , 2005.
- 16- Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29(13): 1989-2006.
- 17- Agarwal S, Wendroff J, Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *J Polymer*; 49(3): 5603-21, 2008.