الیاف

فعالیت‌های ضدمیکروب و ضد سرطان کامپوزیت‌های نانولیفی PLGA/silver تهیه‌شده توسط الکتروریسی

مسعود هاشمی

چکیده

در مطالعهٔ پیش‌رو، نانوالیاف کوپلیمریِ پلی‌لاکتیک-گلیکولیک اسید (PLGA) تلفیق‌شده با صفر، ۱ و ۷ درصد وزنی نانوذرات نقره (Ag NPs) بوسیلهٔ فرایند الکتروریسی سنتز شدند. ورقه‌های نانوالیافِ PLGA/Ag با استفاده از تجزیه و تحلیل‌های SEM، TEM و DSC بررسی شدند. هر سه کامپوزیت نانولیفی PLGA/Ag سنتزشده، برای فعالیت ضدسرطانی در مقابل خط سلولیِ سرطان کبد با استفاده از سنجش‌های MTT و LDH، تحت بررسی قرار گرفتند. فعالیت ضد سرطان نانوالیاف PLGA، به دلیل افزایش غلظت نانوذرات نقره، بهبود قابل‌توجهی نشان داد. علاوه بر نتایج ارائه‌شده، نانوالیاف PLGA هیچگونه اثر سیتوتوکسیک (مسموم‌کنندهٔ سلول) از خود نشان ندادند. هرچند نانوالیاف PLGA که حاوی ۱ درصد نانو نقره بودند، فعالیت ضدسرطانی از خود نشان دادند، از طریق افزایش غلظت نانوذرات نقره تا ۷ درصد بر روی نانوالیاف PLGA، فعالیت ضدسرطانی تا ٦٧/٦ درصد بهبود یافت. علاوه بر این، فعایت‌های ضد باکتری این ۳ نانوالیاف، در برابر ۵ نوع باکتریِ E.coli o 157:H7 ATCC 51659، Staphylococcus aureus ATCC 13565، Bacillus cereus EMCC 1080، Listeria monocytogenes EMCC 1875 و Salmonella typhimurium ATCC25566 با استفاده از روش انتشار دیسک، بررسی شدند. نمونهٔ با اثر بازدارندگیِ بهبودیافته، نمونهٔ PLGA/AgNPs (۷ درصد) بود، که از همهٔ نژادهای باکتری مذکور جلوگیری کرد (قطر ناحیهٔ بازدارندگی ۱۰ میلی‌متر)؛ نمونهٔ PLGA/Ag (۱ درصد) تنها مانع از یک نوع باکتری (B. cereus) با قطر ناحیهٔ ۸ میلی‌متر شد. نمونهٔ نانوالیاف PLGA هیچگونه فعالیت ضدباکتری را از خود نشان نداد. بر اساس نتایج ضدسرطان و همچنین نتایج ضدباکتری در این مطالعه می‌توان ادعا کرد که: نانوالیاف PLGA حاویِ ۷ درصد نانونقره، به عنوان سیستم‌های داروسانی یا حامل داروی ضدسرطان و آنتی‌بیوتیک مناسب می‌باشند، بطوریکه این نانوالیاف، قدرت داروی ضدسرطان و آنتی‌بیوتیک را بدون هیچگونه اثر مسموم‌کنندگی روی سلول‌های معمولی، افزایش خواهند داد. این اکتشافات همچنین نشان می‌دهد که نانوذرات نقره با اندازهٔ ۵ تا ۱۰ نانومتر که در این مطالعه بررسی شدند، برای کاربرد درمانی از نقطه نظر سلامت مناسب هستند.

مقدمه

سیستم‌های دارورسانی کنترل‌شده در چند دههٔ گذشته توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. این امر به دلیل مزایای آنها، مثل بهبود بازدهٔ درمانی و کاهش سمّیت بواسطهٔ حمل یا رهایش آنها با نرخ کنترل‌شده، در مقایسه با شکل‌های مرسوم میزان مصرف می‌باشد. پلیمرهای حاوی نانوذرات فلزی که به عنوان ضدمیکروب یا سیستم دارورسانی استفاده می‌شوند، به دلیل نوظهوری آنها در مواد ضدمیکروب و ضد باکتری با دوام بالا و همچنین پایداری حرارتی بالا و فراریت کم، توجه زیادی را به خود جذب کرده‌اند. افزایش عظیم در تعداد و پیدایش نژادهای باکتری مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک، علاقهٔ زیادی را به استفاده از نانوذرات فلزی (NPs) به عنوان عوامل ضدباکتری ایجاد کرده است.

امروزه معرفی پلیمرهای ضدمیکروب برپایهٔ نانوذرات نقره (AgNPs) چالش عظیمی را هم برای صنعت و هم برای دنیای علم به ارمغان آورده است. کامپوزیت‌های پلیمری ترموپلاستیک بر پایهٔ نقره، فرایندپذیری حرارتی بسیار خوب ترموپلاستیک‌ها را با خاصیت ضدمیکروبی ذاتی نقره تلفیق می‌کنند. یون‌های نقره، بنا به خواص ضدعفونی‌کنندهٔ خود ضدمیکروب‌های قابل‌توجهی هستند و تنها تعداد اندکی از باکتری‌ها بطور ذاتی در برابر این فلز مقاوم هستند. نقره به دلیل خواص ضدمیکروبی سودمند خود در تجهیزات پزشکی، به عنوان منبعی قابل‌توجه برای درمان موضعی شناخته می‌شود.

اخیراً، الیاف پلیمریِ فوق‌ظریف به عنوان ابزارهای جدید برای دارورسانی کشف شده بودند. مزایای اصلی این حاملان لیف‌مانند این است که آنها انتقالِ دارو به مکان مخصوص در بدن را عرضه می‌کنند. علاوه بر این، بیشتر از یک دارو می‌تواند بطور مستقیم در الیاف کپسوله شود. به دلیل مساحت سطح و ساختار متخلخل بالای الیاف الکتروریسی‌شده، این الیاف در زمینه‌های بسیاری از جمله دارو، سنسورهای زیستی، سلول‌های خورشیدی حساس‌شده، مهندسی بافت، فتونیک‌ها، نانوکامپوزیت‌ها، کاتالیست‌ها، مواد ضدمیکروب و غشاها بکار رفته‌اند. تکنیک‌های متعددی برای تولید الیاف فوق‌ظریف پلیمری (UFs)، از جمله تکنیک الکتروریسی وجود دارد. این تکنیک به دلیل تطبیق‌پذیری و پتانسیل آن برای کاربرد در زمینه‌های متفاوت علاقهٔ زیادی را در سال‌های اخیر برانگیخته است. این روش بواسطهٔ عملکرد فرایند ساده، کارایی بالا در تولید نانوالیاف و هزینهٔ کم معروف می‌باشد. کوپلیمرهای پلی‌لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید (PLGA) یکی از رایج‌ترین پلیمرهای مورد استفاده برای تهیهٔ ابزار رهایش دارو هستند. PLGA توسط برهم‌کنش‌های متابولیسمی تجزیه می‌شود و بنابراین بعد از تکمیل رهایش دارو پس از تزریق، کاشت یا الحاق آن، نیاز به عمل جراحی برداشت ندارد. فرمولاسیون‌های برپایهٔ میکروذرات و ایمپلنت‌های PLGA می‌توانند رهایش یا آزادسازی مداوم طولانی مدتِ دارو را فراهم کنند. آنها برای درمان‌های موضعی مثل عفونت در استخوان‌ها و بافت‌های نرم، یا تحویل و انتقال داخل بدنیِ داروهای ناپایدار مثل پپتایدها، هورمون‌ها یا واکسن‌ها مفید هستند. به دلیل این خواص؛ PLGA به عنوان یکی از رایج‌ترین پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر می‌باشد که توسط ادارهٔ غذا و داروی آمریکا تأیید شده است. بنابراین PLGA بطور وسیعی در کاربردهای دارورسانی یا تحویل دارو و داربست‌ها یا اسکلت‌های مهندسی بافت استفاده شده بود.

در پژوهش قبلی، ما کلاس جدیدی از نانوالیاف پلی‌لاکتیک-کو-گلیکولیک اسیدِ حاویِ نانوذرات نقره را به عنوانِ سیستم‌های دارورسانی برپایهٔ کامپوزیت نانوالیافی الکتروریسی‌شده معرفی کردیم. هرچند، اثربخشیِ ضدسرطانی و ضدباکتریِ آن نانوالیاف PLGA/Ag NPs تحت بررسی قرار نگرفته بود. بنابراین، در این مطالعه، در ادامهٔ کار قبلی خود، ما فعالیت ضدسرطانیِ نانوالیاف PLGA حاوی درصدهای مختلف نانوذرات نقره در برابر خط سلولی سرطان کبد با استفاده از معرف‌ها یا سنجش‌های ۳- [۵,۴- دی‌متیل-۲- تیازولیل] - ۵,۲- دی‌فنیل - H۲ -تتراآزولیوم بromید (MTT) و لاکتات دی‌هیدروژناز (LDH) بررسی کردیم. در نهایت، اثربخشیِ نانوالیاف PLGA/Ag NPs در برابر انواع مختلف باکتری‌ها نیز تحت بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

پلیمر زیست‌تخریب‌پذیری که در این مطالعه استفاده شده است، کوپولیمرِ پلی (D، L-لاکتید-کو-گلیکولید) (PLGA) با نسبت لاکتید به گلیکولیدِ (L/G) (۲۵/۷۵ مول/ مول) می‌باشد. PLGA که از کمپانی NaBond چین تهیه شد، ویسکوزیتهٔ درونی یا ذاتیِ ۰/۵۹ (dl/g)، وزن مولکولی متوسطِ ۷۰۰۰۰ و دانیستهٔ ۱/۲۵ تا ۱/۳ گرم بر سانتیمتر مکعب داشت. حلّال‌های تتراهیدروفوران (THF)، دی‌متیل‌فرم‌آمید (DMF) و قرص‌های بافر نمکی فسفات (PBS) که در آزمایشات استفاده شدند از سیگما آلدریچ تهیه شدند.

واسطهٔ RPMI) Roswell Park Memorial Institute 1640) و واسطهٔ (DMEM) Dulbecco's Modified Eagle Medium از کپانی مواد شیمیایی سیگما تهیه شدند. سرم جنین گاو (FBS) و سرم جنین گوساله (FCS) از کمپانی Gibco انگلستان تهیه شدند. دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) و متانول با درجهٔ خلوص HPLC و دیگر معرف‌ها و مواد شیمیایی در درجهٔ معرف‌های شیمیایی بودند. میکروارگانیسم‌های مورد استفاده برای آزمایش از دانشکدهٔ کشاورزیِ مرکز تحقیقات میکروبیولوژیکی دانشگاه Ain Shams بودند: Staphylococcus aureus ATCC 13565، Bacillus cereus EMCC 1080، E.coli o 157:H7 ATCC 51659، Salmonella typhimurium ATCC25566 و Listeria monocytogenes EMCC 1875

الکتروریسی نانوالیاف PLGA و PLGA/Ag NPs:

نانوالیاف الکتروریسی‌شدهٔ PLGA و PLGA/Ag NPs حاوی ۱ و ۷ درصد نانوذرات نقره، توسط الکتروریسی محلول PLGA (۱۰ درصد وزنی) در مخلوط DMF/THF (۹۰ درصد وزنی) تهیه شدند و همانطور که در مقاله قبلی ما شرح داده شد، با استفاده از آنالیزهای SEM ، TEM و DSC تحت بررسی قرار گرفتند. نانوالیاف روی جمع‌کنندهٔ دوّار جمع‌آوری شدند. محدودهٔ ولتاژی از ۱۰ تا ۲۰ کیلوولت، توسط منبع تغذیهٔ ولتاژ بالا بر روی جمع‌کنندهٔ دَوّار بکار گرفته شد و نرخ جریانِ محلول در محدودهٔ ۰/۱ تا ۰/۱۵ میلی‌لیتر بر ساعت بود. در خصوص تهیه نانوالیاف PLGA/Ag NP، نیترات نقره ($AgNO_3$) در نسبت‌های مختلف در محلول DMF/THF حل شد، و سپس ۰/۰۱ گرم پلی‌اتیلن گلایکول به عنوان پایدارکننده و عامل احیاء اضافه شد. محلول، قبل از تجزیه و تحلیل با استفاده از طیف‌های UV، برای مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد و سپس PLGA به محلول اضافه شد. محلول حاوی نمک نقره برای مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق هم زده شد. احیای یون‌های Ag^+ به شکل نانوذرات نقره از طریق یک سری از مراحل به وقوع می‌پیوندد: هسته‌زایی اولیه، هسته‌زایی ثانویه، یا رشد بلور از طریق مکانیزم انتشار برای دستیابی

بـه ذرات اولیـه، و خوشـه‌های تجمع‌یافتـه یـا متراکـم (یعنـی ذرات ثانویـه). نانوالیـاف الکتروریسی‌شـدهٔ PLGA و PLGA/Ag NP توانسـتند بـه سـهولت از ورقـهٔ آلومینیومـی جدا شـوند و نانوالیـاف بدسـت‌آمده، قبـل از بررسـی‌های بعـدی، بـه مـدت ۷ روز در دمـای اتـاق ذخیـره شـدند.

روش‌های بررسی مشخصات

بررسی مورفولوژی:

میکروسـکوپ الکترونـی روبشـی (FE-SEM-JEOL GSM-6610LV) بـرای بررسـیِ مورفولـوژی سـطحی نانوالیـاف PLGA و PLGA/Ag NP استفاده شـد. نمونه‌هـا بـا پلاتیـن روکـش داده شـدند و در ولتـاژ شـتابدهٔ ۱۰ کیلوولـت بازرسـی شـدند.

تخلخل نانوالیاف

بـرای محاسـبهٔ تخلخـل ظاهـری، دانسـیتهٔ ظاهـریِ نانوالیـاف الکتروریسی‌شـده در ابتـدا محاسـبه شـد. دانسـیتهٔ ورقـهٔ نانوالیـاف توسـط اندازه‌گیـری حجـم و جـرم نمونه‌هـا (حداقـل ۸ نمونـه) طبـق رابطـهٔ (۱) محاسـبه شـد.

(۱) دانسیتهٔ ظاهری = جرم ورقهٔ نانوالیاف / حجم ورقه (g/cm^3)

تخلخـل ظاهـری داربسـت‌های الکتروریسی‌شـده سـپس بـا اسـتفاده از رابطـهٔ (۲) محاسـبه شـد.

$$\text{تخلخل ظاهری (٪)} = \left[1 - \frac{\rho}{\rho_0}\right] \times 100 \qquad (۲)$$

کـه در اینجـا ρ، دانسـیتهٔ ظاهـری محاسبه‌شـدهٔ ورقـهٔ الکتروریسی‌شـده و ρ_0، دانسـیتهٔ ظاهـری PLGA (۱/۲۵–۱/۳ گـرم بـر سـانتیمتر مکعب) می‌باشـد.

آنالیز گرماوزن‌سنجی (TGA)

تجزیـه و تحلیـل گرماوزن‌سـنجی نانوالیـاف PLGA و PLGA/Ag NP بـا اسـتفاده از دسـتگاه TGA (Q500 TGA) انجـام شـد. ورقه‌هـای نانوالیـاف قبـل از آزمایـش تحـت خـلاء نـگاه داشـته شـدند. نمونـه از ۲۵ تـا ۴۰۰ درجـهٔ سـانتیگراد بـا نـرخ گرمایـش ۱۵ سـانتیگراد بـر دقیقـه تحت جریـان نیتـروژن حـرارت داده شـد.

خواص حرارتی (DSC)

مشـخصات حرارتـی نانوالیـاف PLGA و PLGA/Ag NP بـا اسـتفاده گرماسـنج پویشـی تفاضلـی (DSC) ارزیابـی شـد. گرماسـنج پویشـی تفاضلـی (Shimadzu-60) بـرای اندازه‌گیـری دمـای گـذار شیشـه‌ایِ (T_g) نانوالیـافِ PLGA و PLGA/Ag NP اسـتفاده شـد. نمونه‌هـا (تقریبـا ۵ میلی‌گـرم) در ظـرف آلومینیومـی مخصـوص مهـر و مـوم شـدند و از ۲۵ تـا ۸۰ درجـهٔ سـانتیگراد در نـرخ ۲ سـانتیگراد بـر دقیقـه حـرارت داده شـد و سـپس تـا ۲۰ درجـهٔ سـانتیگراد سـرد شـد.

تست ضد میکروب با استفاده از روش انتشار دیسک

تسـت سـه نمونـهٔ مختلـف (۳ نمونـهٔ دیسـک در قطـر ۵ میلی‌متـر) توسـط روش انتشـار دیسـک انجـام شـد. هرکـدام از نمونه‌هـا (بـا قطـر ۵ میلی‌متـر) روی آگارِ Tryptose Soy تکمیـل شـده بـا عصـارهٔ مُخمّـر (TSAYE) در ظـرف پتری‌دیـش اسـتاندارد از ۱۶ تـا ۱۸ سـاعت زمـان رشـد باکتـری در مایـع تلقیـحِ TSAYE، تلقیـح شـدند و سـپس در ۳۷ درجـهٔ سـانتیگراد تحـت کشـت قـرار گرفتنـد.

غلظـت باکتـریِ تلقیح‌شـده در TSAYE، ۲×۱۰^۶ cfu/ml بـود. همـهٔ آزمایشـات ۳ مرتبـه انجـام شـدند. قطـر ناحیـهٔ بازدارندگـی اندازه‌گیـری شـد و برحسـب میلی‌متـر گـزارش شـد.

فعالیت ضد سرطان در محیط آزمایش

کشت سلولی

خـط سـلولی سـرطان کبـد انسـان (Hep-G2) از مجموعـهٔ کشـت تایـپ آمریـکا تهیـه شـد و در واسـطهٔ RPMI-1640 نگهـداری شـد. خـط سـلولی طبیعـی غشـای دور جنیـن انسـان (WISH) توسـط بخـش تحقیقـات علمـی VACSERA مصـر تأمیـن شـد و در واسـطهٔ DMEM نگهـداری شـد. هـر دو واسـطه بـا ۱۰ درصـد FBS مقـاوم در برابـر دمـا، ۱۰۰ U/ml پنیسـیلین و ۱۰۰ U/ml آنتی‌بیوتیـکِ استرپتومایسـین تکمیـل شـدند. سـلول‌ها در ۳۷ درجـهٔ سـانتیگراد در اتمسـفر مرطوب‌شـدهٔ CO_2 ۵درصـد رشـد کردنـد. همـهٔ آزمایشـات ۳ مرتبـه تکـرار شـد (n = ۳). همـهٔ مقادیـر بصـورت میانگیـن ± انحـراف معیـار گـزارش شـدند.

فعالیت‌های ضد تومور در محیط آزمایش: سنجش سمیت سلولی MTT

فعالیـت مسـموم‌کنندگی سـلولی یـا سیتوتوکسـیک در برابـر خـط سـلولی انسـانیِ Hep-G2 و WISH بـا اسـتفاده از تسـتِ ۳-[۵,۴-دی‌متیـل-۲-تیازولیل]-۵,۲-دی‌فنیـل -۲H-تتراآزولیـوم بروميـد (MTT) ارزیابـی شـد، کـه بـر اسـاسِ شـکافت نمـک تتراآزولیـوم توسـط دی‌هیدروژنازهای موجـود در میتوکندری‌هـا، در سـلول‌های زیسـت‌پذیر می‌باشـد. سـلول‌ها در میکروپلیـت اسـتریل ۹۶ خانـه توزیـع شـدند و قبـل از تسـت MTT، بـا دیسـک‌های بـا قطـر ۵ میلی‌متـر از هرکـدام از ورقه‌هـای تست‌شـده یـا دوکسوربیسـین (کنتـرل مثبـت) بـه مـدت ۴۸ سـاعت در یـک واسـطه در ۳۷ درجـهٔ سـانتیگراد در انکوباتـور تحـت رشـد یـا کشـت قـرار گرفتنـد. پـس از انکوباسـیون یـا دورهٔ کمـون، واسـطه و دیسـک‌ها بـا احتیـاط خـارج شـدند و ۴۰ میکرولیتـر MTT (۵ میلی‌گـرم بـر میلی‌لیتـر) بـه هرکـدام از خانه‌هـای میکروپلیـت اضافـه شـد و سـپس

برای ۴ ساعت دیگر در انکوباتور قرار گرفت. کریستال‌های بنفش رنگ فرمازان، بواسطهٔ افزودن ۲۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانولِ اسیدی‌شده، حل شدند. مقدار جذب با استفاده از دستگاه ELISA Microplate Reader، در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. قابلیت زیستِ نسبی سلولی، به صورت درصد متوسطِ سلول‌های زیست‌پذیر در مقایسه با سلول‌های مرجع عمل‌آوری‌نشده شرح داده شد.

تست LDH

برای تعیین اثر هر ورقه روی نفوذپذیری غشاء در هر دو خط سلولیِ Hep-G2 و WISH، تستِ رهایشِ LDH مورد استفاده قرار گرفت. سلولها در پلیت‌های کشت ۹۶ خانه‌ای با دانسیتهٔ ۲×۱۰^{۴} سلول بر خانه در ۱۰۰ میکرولیتر حجم کاشته شدند و اجازه داده شد که قبل از عملیات به مدت ۱۸ ساعت رشد کنند. بعد از عملیات، به همراهِ دیسک‌های با قطر ۰/۵ سانتیمتری از هرکدام از ورقه‌های تحتِ آزمایش، به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. دیسک‌ها خارج شدند و سپس مایع در رو قرارگرفته یا شناور (۴۰ میکرولیتر) برای تعیین رهایش LDH، به یک پلیت ۹۶ جدید منتقل شد و ۶ درصد تریتون X-100 (۴۰ میکرولیتر) به پلیت اصلی برای تعیینِ LDH مجموع یا کُل اضافه شد. بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (۱۰۰ میکرولیتر، pH = ۷/۵) حاوی اسید پیرورویک۴/۶ میلی‌مولار، با استفاده از پیپت در مایع شناور (سوپرناتانت) به آرامی مخلوط شد.

سپس بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (۱۰۰ میکرولیتر، pH = ۷/۵) حاوی ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر β-NADH به محفظه‌ها یا خانه‌های پلیت اضافه شد. تغییرات جنبشی یا سینتیک، با استفاده از ELISA microplate redaer در مقدار جذب در طول‌موج ۳۴۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه قرائت شد. این شیوه با ۴۰ میکرولیتر لیزات سلولی کل برای تعیین LDH مجموع تکرار شد. درصد رهایش LDH، توسط تقسیمِ LDH رهاشده درون واسطه از LDH مجموع بدست‌آمده از تجزیهٔ سلولی در همان خانه (در میکروپلیت) تعیین شد.

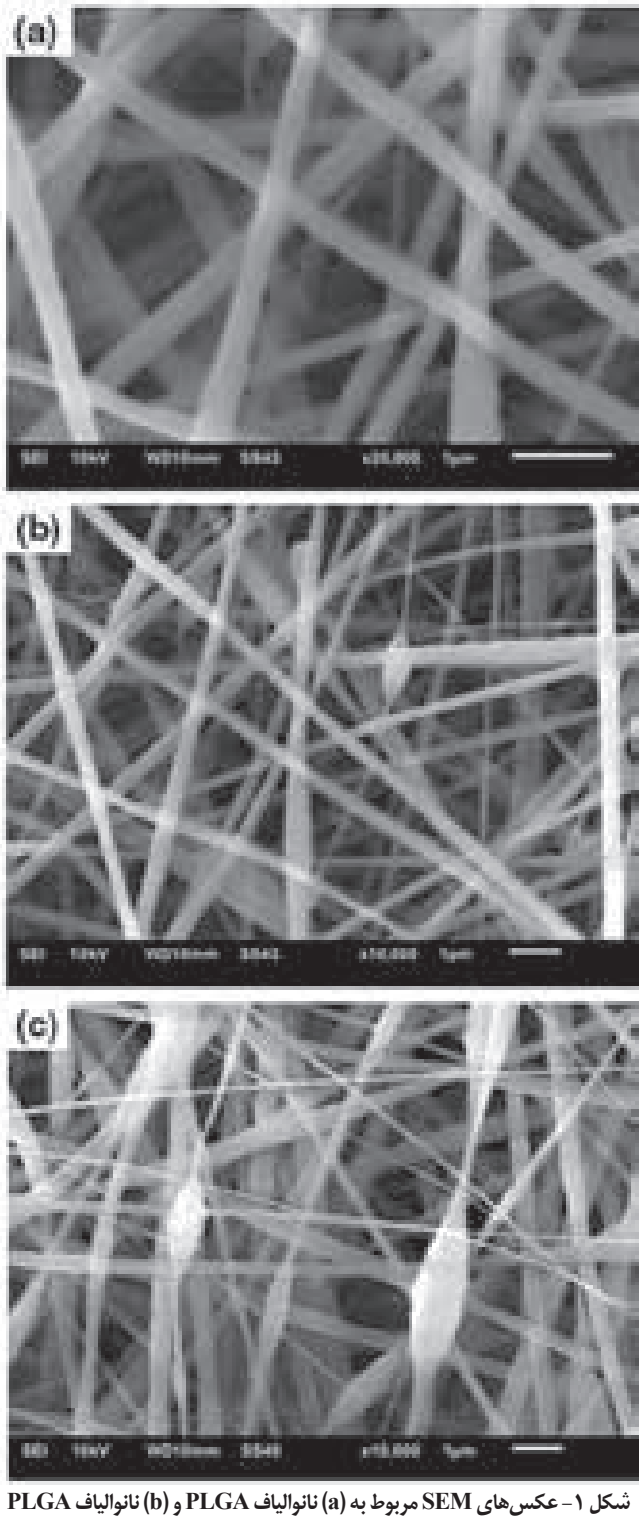
آنالیز آماری

همهٔ آزمایشات حداقل ۳ مرتبه تکرار شدند، و در ۳ مرحله انجام شدند (n = ۳) و نمودارهای میله‌ای خطا، انحراف معیار را نشان دادند. همهٔ مقادیر بصورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شدند.

نتایج و بحث

تولید نانوالیاف PLGA/Ag NPs:

نانوالیاف الکتروریسی‌شدهٔ PLGA و PLGA/Ag NPs به دلیل حضور نیروی بار الکتریکی بین بارهای روی سطح جت، نیروی میدان الکتریکی خارجی، نیروی ویسکوالاستیک محلول، نیروی کشش سطحی، نیروی گرانشی، و نیروی اصطکاک بواسطهٔ کشش هوا کنترل شدند. نانوالیاف الکتروریسی‌شده بصورت یک پارچهٔ بی‌بافت با مشخصات فوق‌العاده مثل نسبت مساحت سطح به حجم بالا، تخلخل بالا و اندازهٔ خلل و فرج قابل‌قبول، روی یک غلتک چرخنده یا دوّار جمع‌آوری شدند.



شکل ۱- عکس‌های SEM مربوط به (a) نانوالیاف PLGA و (b) نانوالیاف PLGA حاوی ۱ درصد نانوذرات نقره و (c) حاوی ۷ درصد نانوذرات نقره.

مورفولوژی نانوالیاف PLGA

چسبندگی و تکثیرِ سلولی روی داربست‌های نانوالیافی، تحت تأثیر خواص داربست، مثل مورفولوژی سطحی، تخلخل و ترکیب شیمیایی بود. مورفولوژیِ سطحی نانوالیاف الکتروریسی‌شدهٔ PLGA و PLGA/ Ag Np (۱ و ۷ درصد) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (JEOL GSM-6610V) بررسی شد. نتایج SEM (شکل ۱) نشان داد که نانوالیاف الکتروریسی‌شدهٔ PLGA و PLGA/Ag NP دارای مورفولوژی صاف و یکنواخت بودند. همهٔ الیاف قطرهای یکنواختی با چند میکرومتر طول از خود نشان دادند. همچنین مشاهده شد که اغلب نانوالیاف تازه الکتروریسی‌شده در سرتاسر طول خود گرد و یکنواخت هستند.

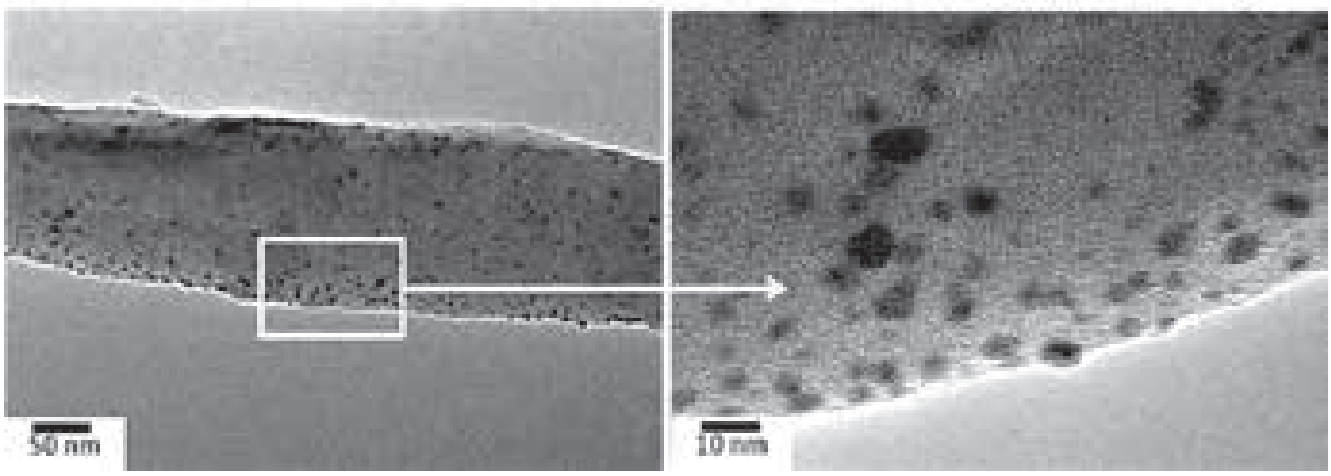
همانطور که در شکل a.۱ و b.۱ دیده می‌شود، نانوالیاف PLGA خالص و PLGA/Ag NP (۱ درصد) نانوالیاف صاف و بدون بید را تولید کردند. در مقادیر بیشتر نیترات نقره (شکل c.۱)، بیدهای آشکاری می‌توانند مشاهده شود. این امر می‌توانست مربوط به رسانایی بالا و یا ویسکوزیتهٔ کم محلول به دلیل تغییرات میزان نقره باشد. آزمایشات زیادی نشان داده است که برای تولید الیاف بدون بید برای هر محلول پلیمری، ویسکوزیتهٔ بهینه مورد نیاز است. قطر نانوالیاف الکتروریسی‌شده با افزایش ویسکوزیته، افزایش می‌یابد. شکل ۲ عکس TEM مربوط به نانوالیاف PLGA/Ag NP (۷درصد) نشان می‌دهد. این شکل نشان می‌دهد که نانوذرات نقره (Ag NPs) با شکل تقریباً کروی و اندازهٔ یکسان، درون و روی نانوالیاف قرار گرفته‌اند. قطر نانوالیاف درمحدودهٔ ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر می‌باشد، درحالیکه اندازهٔ نانوذرات نقره در محدودهٔ ۵ تا ۱۰ نانومتر بود.

تخلخل نانوالیاف

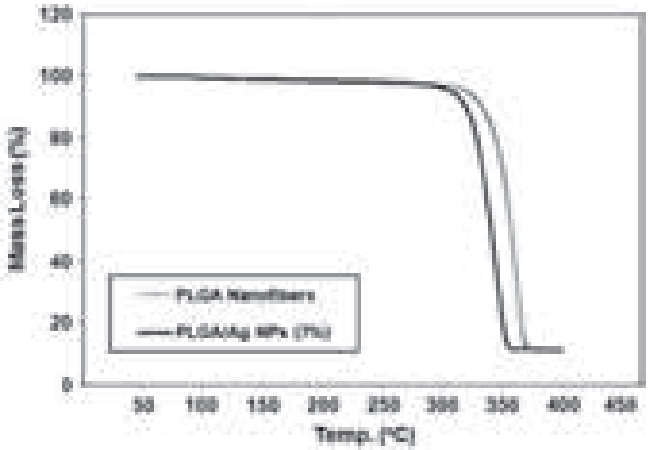
در کاربردهای مهندسی بافت، تخلخل داربست یا اسکلت، پارامتر ضروری برای موفقیت آزمایشات کشت سلولی می‌باشد. داربست‌های با تخلخل بالا، اتصال، تکثیر، تفکیک سلولی و انتقال کافی برای مواد مغذی و حذف ضایعات را تأمین می‌کنند. بنابراین، این امر بسیار مهم است که داربست‌هایی دوبعدی و سه‌بعدی با تخلخل کافی و قابل‌قبول تهیه شود. در مطالعهٔ پیشِ رو، دانسیتهٔ ظاهری داربست‌های متخلخل و تخلخل نانوالیاف الکتروریسی‌شدهٔ PLGA و ورقه‌های PLGA/Ag NPs با استفاده از رابطهٔ (۱) و (۲) محاسبه شدند. دانسیته و تخلخل ورقهٔ نانوالیاف PLGA که توسط تکنیک الکتروریسی تولید شده بود، به ترتیب برابر ۰/۴۰۶۵ g/cm^3 و ۳ ٪ ± ۶۳ بود. دانسیتهٔ ظاهری محاسبه‌شده برای ورقه‌های نانولیفی PLGA/Ag NP (۱ و ۷ درصد نانوذرات نقره) به ترتیب برابر ۰/۴۸ و ۰/۵۳ گرم بر سانتیمتر مکعب، و تخلخل به ترتیب برابر ۴ ٪ ± ۶۱ و ۳ ٪ ± ۵۸ بدست آمد. این داربست‌های با تخلخل بالا برای چسبندگی و تکثیر سلول‌ها مفید بودند. هنگامی که از تکنیک الکتروریسی برای تولید نانوالیاف استفاده شده بود، مقادیر مشابهی برای تخلخل نانوالیاف PLGA (۶۴ تا ۷۰ درصد) بدست آمده بود.

آنالیز TGA و DSC

منحنیِ TGA ورقه‌های نانوالیافی PLGA و PLGA/Ag NPs (۷ درصد) در نرخ گرمایش ۱۵ درجهٔ سانتیگراد بر دقیقه و از دمای اتاق تا ۴۰۰ درجهٔ سانتیگراد در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که هیچ اُفت وزنی تا حدود ۲۵۰ درجهٔ سانتیگراد وجود ندارد. افت وزن اساساً در محدودهٔ دمایی از ۲۶۰ تا ۳۶۰ درجهٔ سانتیگراد با تغییر جزئی در دمای بالاتر از ۳۶۰ درجهٔ سانتیگراد به وقوع پیوست. این کاهش یا افت وزن دلالت بر تجزیهٔ حرارتی یا تبخیر در ماده دارد. از این شکل، این امر نیز آشکار می‌شود که افت وزن نمونه‌ها اساساً به دلیل احتراق ماتریس یا قالب آلیِ PLGA رخ می‌دهد. نتایج شکل ۳ همچنین نشان داد که دمای تخریبِ PLGA/Ag NP کاهش یافت و افت وزن با حضور (افزایش)



شکل ۲- عکس‌های TEM مربوط به نانوالیاف PLGA حاوی ۷ درصد نانوذرات نقره (Ag NPs).



شکل ۳- TGA مربوط به نانوالیاف PLGA و PLGA/Ag NPs (۷ درصد).

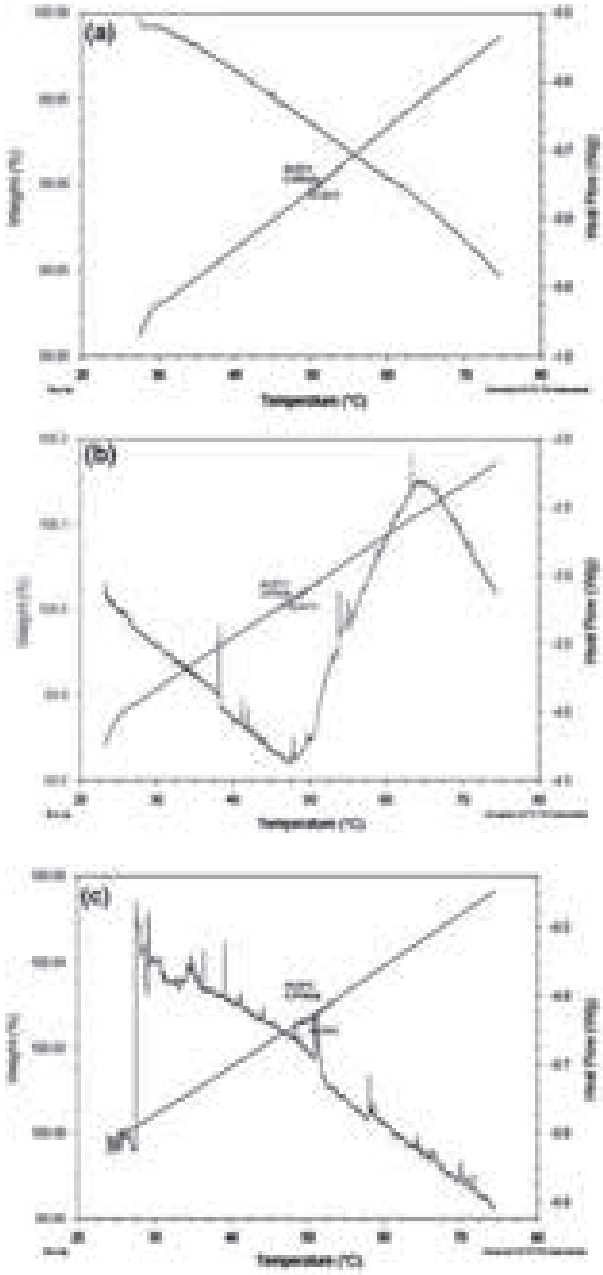
نانـوذرات نقـره (AG NPs) افزایـش یافـت. ایـن امـر بدیـن معنـی اسـت کـه پایـداری حرارتـیِ ورقه‌هـای نانولیفـیِ PLGA بـه دلیـل حضـور نانـوذرات نقـره در نانوالیـاف PLGA کاهـش یافتـه اسـت. ایـن نتایـج می‌توانـد مربـوط بـه رسـانایی حرارتـی بـالای نانـوذرات نقـره در مقایسـه بـا الیـاف پلیمـری باشـد.

ترموگـراف یـا منحنی‌هـای DSC مربـوط بـه داربسـت‌های PLGA و PLGA/AG NPs (۱ و ۷ درصـد) کـه در محـدودهٔ دمایـی از ۲۵ تـا ۸۰ درجـهٔ سـانتیگراد بدسـت آمـده بودنـد، در شـکل ۴ نشـان داده شـده‌اند. نتایـج منحنی‌هـای DSC نشـان دادنـد کـه همـهٔ مـواد آزمایش‌شـده، دمـای گـذار یـا انتقـال شیشـه‌ای کمـی (۵۰ درجـهٔ سـانتیگراد، بیشـتر از دمـای فیزیولوژیکـی بـدن انسـان) داشـتند. نتایـج DSC قبلـی اشـاره بـر ایـن داشـتند کـه هیـچ نقطـهٔ ذوبـی بـرای نانوالیـاف PLGA و PLGA/ Ag NPs (۱ و ۷ درصـد) وجـود نداشـت و ایـن امـر دلالـت بـر ایـن دارد کـه پلیمـر در اصـل آمـورف می‌باشـد. نتایـج شـکل ۴ همچنیـن نشـان داد کـه Tg نانوالیـاف PLGA بـه دلیـل افـزودن نانـوذرات نقـره بـه مقـدار اندکـی کاهـش یافتـه اسـت.

فعالیت ضد باکتری

پلیمرهـای گوناگونـی از جملـه پلی‌وینیل‌پیرولیـدون و کیتوسـان، بـه منظـور پایدارسـازی نانـوذرات نقـره اسـتفاده شـده بودنـد. خصلـت هسته‌دوسـتیِ ایـن پلیمرهـا می‌توانـد بـرای اتصـال بـا ذرات فلـزی توسـط بخشـیدن الکتـرون کافـی باشـد. پلیمـر زیسـت‌تجزیه‌پذیر و زیست‌سـازگار PLGA بـه دلیـل اتصـالات اسـتری قابـل هیدرولیـز آن در ایـن مطالعـه انتخـاب شـد، کـه تحـت برهمکنـش هسته‌دوسـتی بـا نانـوذرات نقـره قـرار می‌گیـرد. فعالیـت ضـد باکتـری یکـی از مهمتریـن مشـخصات هـر مـادّه‌ای می‌باشـد کـه بـرای کاربردهـای زیست‌پزشـکی بـکار مـی‌رود.

بنابرایـن، نانوالیـاف PLGA و همچنیـن نانوالیـاف PLGA/Ag NPs (۱



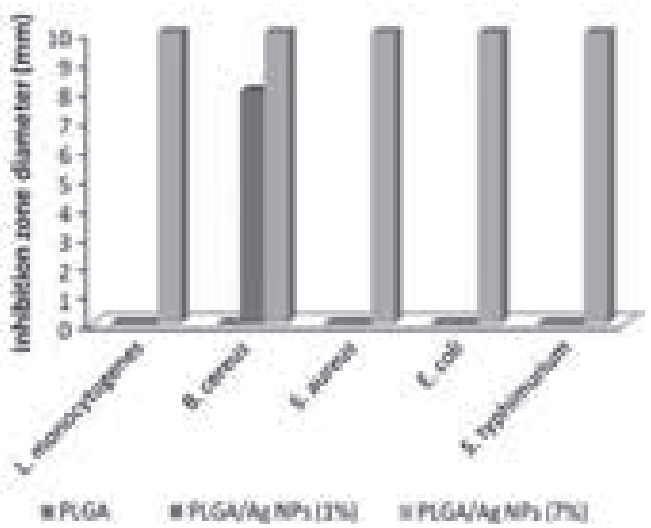
شکل ٤- DSC مربوط به نانوذرات PLGA/AgNPs (a)، PLGA (b) (۱ درصد)، PLGA/AgNPs (c) (۷ درصد).

درصـد) و PLGA/Ag NPs (۷ درصـد) بـرای فعالیت‌هـای ضـد باکتـریِ خـود در برابـر ۳ باکتـری گرم‌مثبـت (S. aureus ATCC 13565، B. cereus EMCC 1080 و L. monocytogenus EMCC 1875) و دو باکتـری گرم‌منفـیِ (E.coli o157:H7 ATCC 51659 و S. typhimurium ATCC25566) تحـت بررسـی قـرار گرفتنـد.

نمونه‌هـای نانوالیـاف PLGA (۰، ۱ و ۷ درصـد نانـوذرات نقـره Ag NPs)، همانطـور کـه در شـکل ۵ نشـان داده شـده اسـت، درجـات مختلفـی از بـازداری یـا جلوگیـری در برابـر ۵ نـژاد باکتـری بـا اسـتفاده از روش انتشـار دیسـک از خـود نشـان دادنـد. نمونـهٔ بـا اثـر بازدارندگـیِ بهبودیافتـه، نمونهٔ

PLGA/Ag NPs (۷ درصد) بود که از همهٔ ۵ نژاد، با قطر ناحیهٔ بازداریِ ۱/۲۷ ± ۱۰ میلی‌متر، جلوگیری کرد؛ نمونهٔ PLGA/Ag NPs (۱ درصد) فقط از یک نوع نژاد (B. cereus) با قطر ناحیهٔ بازدارندگیِ ۰/۱۴ ± ۸ میلی‌متر جلوگیری کرد. نمونهٔ نانولیفی PLGA فعالیت آنتی‌باکتریِ خاصی از خود نشان نداد. این نتایج نشان دادند که فعالیت ضدباکتری نانوالیاف PLGA با افزایش غلظت نانوذرات نقرهٔ قرارگرفته در درون پلیمر، افزایش یافت. این نتایج با داده‌های گزارش‌شده قبلی در توافق بودند. یکی از مطالعات، مطالعات میکروبیولوژیکی در محیط آزمایشِ الیاف فوق‌ظریف PLGA، با استفاده از S. aureus، Ps. aeruginosa، تشکیل سریع کلنی‌های باکتری روی الیاف فوق‌ظریف و تشکیل فیلم زیستی متراکم را نشان داد.

در مطالعهٔ دیگر، نتایج بدست‌آمده از سنجش در محل آزمایش نشان داد که روکش ۲ درصد Ag NP/PLGA بطور مؤثری از چسبندگی باکتریایی جلوگیری کرد و از تشکیل فیلم زیستی، از باکتری گرم مثبت S.aureus Mu50 یا گرم منفی P. aeruginosa PAO-1 روی ایمپلنت‌های آلیاژی فولاد ضدزنگ جلوگیری کرد. هرچند، درصدهای کمتر از ۲ درصد نانوذرات نقره/PLGA فعالیت ضد باکتریِ مناسبی نشان ندادند. اینگونه دریافت شد که در برابر نانوذرات نقره، گونه‌های Bacillus، حساس‌تر از E. coli هستند. با استفاده از نانوکریستال‌های نقرهٔ کپسوله‌شده در نانوذرات سیلیکا، B. subtilis حساسیت کمتری در مقایسه با E. coli نشان داد. علاوه بر این Bacillus همچنین بیشترین حساسیت را نسبت به نانوذرات نقره و مس نشان داده بود. نوسان در درجهٔ فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره سابقاً گزارش شده بود. بیشتر مطالعات نشان دادند که ذرات



شکل ۵- فعالیت ضدباکتری ۳ ورقهٔ نانولیفی PLGA، حاوی درصدهای مختلف نانوذرات نقره، در برابر ۵ نژاد باکتری. قطر هر دیسک نمونه (۵ میلی‌لیتر) نیز به حساب آورده شد.

کوچکتر دارای مساحت سطح بزرگتر هستند و برای باکتری سمّی‌تر هستند. عوامل دیگری مثل مورفولوژی نانوذرات، خواص فیزیکی و شیمیایی نیز روی فعالیت ضدمیکروبی دارای تأثیر هستند.

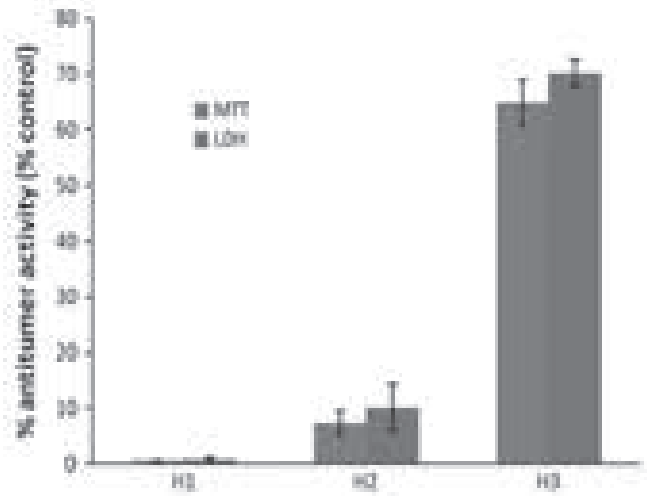
یافته‌های این مطالعه می‌تواند توسط این امر شرح داده شود که، نقره از تقسیم سلولی توسط اتصال با آن و از هم گسیختگیِ اجزاء چندگانهٔ ساختار باکتری و متابولیسم، به انضمامِ انتقال سلولی، سیستم‌های آنزیم ضروری مثل سیتوکروم‌های تنفسی و سنتز اجزاء دیواره سلولی، DNA و RNA جلوگیری می‌کند. حالت‌های یونی نقره مثل نیترات نقره ($AgNO_3$) و سولفات نقره (Ag_2SO_4) برای محافظت در برابر عفونت‌های باکتریایی استفاده شده بود. هرچند، با وجود فعالیت ضد باکتری مؤثر کوتاه‌مدت، اثراتِ نگاهداری یا دوام موضعی ناکافی و سمیت سلولی سخت نقرهٔ یونی (+Ag)، آن را برای جلوگیری مداوم کلنی‌سازی باکتری روی ایمپلنت‌ها نامطلوب می‌سازد. گزارشات اخیر نشان دادند که نانوذرات نقرهٔ ۲۰ تا ۲۵ نانومتری، بدون هیچگونه اثر مسموم‌کنندگی‌سلولی یا سیتوتوکسیک، بطور مؤثری از میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌کنند و اینکه نانوذرات نقرهٔ ۱۰ تا ۲۰ نانومتری در موش‌ها و خوکچه‌های هندی وقتی که بوسیلهٔ روش‌های دهانی و چشمی و پوستی بکار رفتند، غیرسمّی هستند. در این مطالعه، اندازهٔ نانوذرات نقره ۵ تا ۱۰ نانومتر بود، که همانطور که فعالیت بازدارندگی نشان داد، در غلظت‌های کمتر (۱ درصد نانوذرات نقره) از غلظت‌های گزارش‌شده در مقالات قبلی، در برابر B. cereus، می‌تواند حتی بهتر باشد.

فعالیت ضد سرطان در محل آزمایش

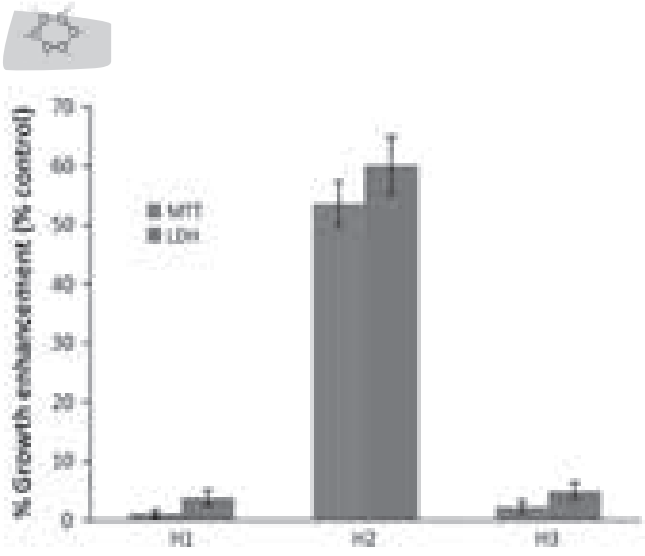
به دلیل تخریب PLGA بر پایهٔ تفکیک آبکافتی یا هیدرولیتیکی پیکرهٔ پلیمر به صورتِ الیگومرها، و آزادسازی اسید لاکتیک و اسید گلیکولیک، که دو محصول جانبیِ مسیرهای متابولیک مختلف در بدن تحت شرایط فیزیولوژیکی طبیعی هستند، نانوالیاف پلیمر زیست‌سازگار PLGA در این مطالعه به عنوان سیستم دارورسانی انتخاب شدند. بنابراین، بعد از تکمیل رهایشِ دارو، نیاز به عمل جراحی برای خارج‌کردنِ آن از بدن نیست. علاوه‌براین، مشارکت نانوذرات زیست‌سازگار نقرهٔ پراکنده‌شده در ماتریس پلیمری PLGA می‌تواند یک سیستم مهم را در زمینه‌های پزشکی‌درمانی، نانودارویی، داروسازی و دارورسانیِ کنترل‌شده و به خصوص برای غلبه بر مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها ارائه دهد. هرچند ماتریس پلیمریِ نانوالیاف PLGA زیست‌تجزیه‌پذیر حاویِ نانوذرات نقره، فعالیت ضدمیکروبیِ آن قبلا اثبات شده بود، امّا مطالاعات زیادی در مورد کیفیت بالقوهٔ آنها به عنوان عوامل ضد سرطان صورت نگرفته است.

در این مطالعه نانوالیاف PLGA، PLGA/Ag NPs با ۱ و ۷ درصد

نانـوذرات نقـره بـه منظـور فعالیت‌هـای ضـد سـرطان آنهـا در برابـر خـط سـلولی سـرطان کبـد انسـان Hep-G2 و فعالیت‌هـای سیتوتوکسـیک (مسـموم‌کنندگی سـلولی) در برابـر خـط سـلولی غشـای جنینـی انسـان (WISH) بـا اسـتفاده از تسـتِ MTT آزمـوده شـدند. هـدف ایـن تسـت، اندازه‌گیـری درصـد سـلول‌های سـالم در مقایسـه بـا مرجـع می‌-باشـد و همچنیـن تسـت LDH بـرای اندازه‌گیـری نفوذپذیـری غشـای سـلولی (گسـیختگی) و آسـیب سـلولی شـدید بازگشـت‌ناپذیر (شـکل ۶) می‌باشـد. نتایـج نشـان می‌دهـد کـه، فعالیـت ضـد سـرطانی نانوالیـاف PLGA بـا افزایـش غلظـت نانـوذرات نقـره افزایـش می‌یابـد. نانوالیـاف PLGA حـاوی ۱ درصـد نانـوذرات نقـره فعالیـت ضـد سـرطان ۸/۸ درصـد از خـود نشـان دادنـد و بـا افزایـش غلظـت نانـوذرات نقـره بـه ۷ درصـد روی نانوالیـاف PLGA، فعالیـت ضـد سـرطان، بـه ۶۷/۶ درصـد بهبـود یافـت. همـهٔ ورقه‌هـای نانوالیـافِ PLGA بررسی‌شـده، هیچگونـه فعالیـت سـمّی در برابـر سـلول‌های طبیعـی انسـان (WISH) از خـود نشـان ندادنـد. بالعکـس، همـهٔ آنهـا سـبب فعالیت‌هـای محافـظِ سـمّیت شـدند و بهبـود رشـد در محـدودهٔ از ۲/۵ تـا ۵۶/۷ درصـد بـود (شـکل ۷). نانوالیـاف PLGA اثـر بهبـود رشـد خیلـی کمـی برابـرِ تنهـا ۲/۵ درصـد از خـود نشـان دادنـد. امّـا نانوالیـاف PLGA حـاوی ۱ درصـد نانـوذرات نقـره اثـر بهبـود رشـد ۵۶/۹ درصـد نشـان دادنـد و بـا افزایـش غلظـت نانـوذرات نقـره بـه ۷ درصـد روی نانوالیـاف PLGA، بهبـود رشـد دوبـاره بـه ۳/۷ درصـد کاهـش یافـت. تفسـیر آشـکاری بـرای ایـن اکتشـافات وجـود نـدارد. ایـن امـر می‌توانـد بـه دلیـل افـزودنِ نانـوذرات نقـره در درصـد پاییـن (۱ درصـد) باشـد کـه خـواص سـطحیِ نانوالیـاف PLGA را تغییـر می‌دهـد و چسـبندگی سـلول‌ها را بهبـود می‌بخشـد. دانسـیتهٔ ظاهـری و تخلخـلِ محاسبه‌شـدهٔ ورقه‌هـای نانوالیـاف PLGA/Ag NPs



شکل ٦- فعالیت‌های ضدسرطانی ۳ ورقهٔ نانوالیافی PLGA در برابر خط سلولی سرطان کبد (HepG-2) با استفاده از تست‌های MTT و LDH. (H_1) نانوالیاف PLGA خالص، (H_2) PLGA/AgNPs (۱ درصد)، (H_3) PLGA/AgNPs (۷ درصد).



شکل ۷- فعالیت‌های بهبود رشدِ ۳ ورقهٔ نانوالیاف PLGA روی خط سلولی طبیعی انسان (WISH) با استفاده از تست‌های MTT و LDH. (H_1) نانوالیاف PLGA خالص، (H_2) PLGA/AgNPs (۱ درصد)، (H_3) PLGA/AgNPs (۷ درصد).

در مقایسـه بـا نانوالیـاف PLGA خالـص افزایـش یافتـه بـود. این داربسـتها یـا اسـکلت‌های بـا تخلخـل بـالا، همچنیـن بـرای چسـبندگی و تکثیـر سـلول‌ها مفیـد هسـتند. نانوالیـاف PLGA حـاوی ۷ درصـد نانـوذرات نقـره، کاهـش در بهبـود رشـد را بـه عنـوان نتیجـهٔ مسـموم‌کنندگی سـلولی نانـوذرات نقـره بـرای سـلول‌ها نشـان دادنـد.

فعالیـت ضـد سـرطان نانوالیـاف PLGA/Ag NP (۷ درصـد) می‌توانـد مربـوط بـه ایـن امـر باشـد کـه نانـوذرات نقـره، اساسـاً از طریـق تنـش اکسایشـی توسـط ایجـاد گونه‌هـای اکسـیژن فعـال (ROS)، سـمّیت را القـا می‌کننـد، کـه اثـرات ویـژه‌ای در سـلولها، بـه انضمـام آسـیب بـه DNA، پروتئیـن و چربـی دارنـد. ایـن امـر می‌توانـد همچنیـن کاهـش در بهبـود رشـدِ PLGA/Ag NP (۷ درصـد) را در برابـر سـلول‌های طبیعـی انسـان شـرح دهـد.

نتیجه‌گیری

بـر اسـاس نتایـج مقدماتـی ضـد سـرطان و ضـد میکروبـی در ایـن مطالعه، می‌تـوان ادعـا کـرد کـه نانوالیـاف PLGA حـاوی ۷ درصـد نانـوذرات نقـره (AgNPs) می‌تواننـد بـه عنـوان سیسـتم دارورسـانی آنتی‌بیوتیـک و ضـد سـرطان مناسـب باشـند، نظـر بـه اینکـه آنهـا می‌-تواننـد قـدرت داروی ضـد سـرطان و همچنیـن آنتی‌بیوتیـک را بـدون اثـر مسـموم‌کنندگی یـا سیتوتوکسـیک روی سـلول‌های طبیعـی افزایـش دهنـد. ایـن یافته‌هـا همچنیـن مبیـن ایـن اسـت کـه نانـوذرات نقـره، بـا انـدازهٔ ۵ تـا ۱۰ نانومتر کـه در ایـن مطالعـه مـورد ارزیابـی قـرار گرفتنـد، می‌تواننـد بـرای کاربـرد درمانـی از نقطه‌نظـر سـلامت مناسـب باشـند. امّـا بـرای ارزیابـی سـهم ایـن نانـوذرات در مزایـای سـلامتی ویـژه در سیسـتم‌های بیولوژیکـی، مطالعـات بیشـتری در محیـط آزمایـش و همچنیـن در محیـط یـا بافـت زنـده مـورد نیـاز اسـت.