

استفاده از نانوالیاف حاصل از الکتروریسی زئین به عنوان نانوحامل وانکومایسین: بررسی ویژگیها، آزادسازی و خاصیت ضد میکروبی

جبرائیل موفق^۱، نفیسه امیری^۲، سجاد ابراهیمی^۳، بی بی فاطمه کلالی نیا^۴،
بی بی صدیقه فضلای بزاز^۵، محمد عزیززاده^۶، سپیده عربزاده^۷، محمد امین میری^{۸*}

۱- استادیار، مرکز تحقیقات دارو رسانی هدفمند، پژوهشکده علوم نوین دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

۲- دانشجوی دکتری تخصصی نانو تکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

۳- دانشجوی دکتری عمومی داروسازی، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

۴- استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

۵- استاد، گروه کنترل دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

۶- استادیار، گروه آمار حیاتی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۷- کارشناس، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

۸- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل.

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۵/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۰۲)

چکیده

حامل های انتقال که بر پایه پروتئین ساخته شده اند، مزایای متعددی را نسبت به حامل های لیپیدی، کربوهیدراتی و پلیمرهای سنتزی از نظر زیست تخریب پذیری، در دسترس بودن، ظرفیت بالای پیوند با جزء فعال را دارا می باشند. الکتروریسی تکنیکی ساده برای ایجاد الیاف فوق ریز به شکل شبکه ای بافته نشده است. الیاف الکتروریسی شده می توانند به عنوان حامل های نوین و ابتکاری برای دارورسانی هدفمند و انکپسولاسیون ترکیبات حساس عمل کنند. زئین پروتئین ذخیره ای اصلی ذرت است. وانکومایسین یک آنتی بیوتیک طیف گسترده است که بر علیه باکتری های گرم مثبت مؤثر است. هدف از مطالعه حاضر، تهیه و ارزیابی خواص غشا نانوالیاف زئین حاوی آنتی بیوتیک وانکومایسین به روش الکتروریسی، مطالعه آزادسازی و خاصیت ضد میکروبی بود. با استفاده از دستگاه الکتروریسی، ماتریکس پلیمری از محلول زئین حاوی آنتی بیوتیک وانکومایسین تهیه و خصوصیات فیزیکی الیاف، نحوه آزادسازی دارو و میزان فعالیت ضد میکروبی الیاف بارگذاری شده با وانکومایسین بررسی شد. مورفولوژی لایه های بدست آمده با استفاده از SEM بررسی و شکل گیری الیاف یکنواخت تایید شد. نتایج FTIR نشان دهنده عدم برقراری پیوند شیمیایی بین عوامل زئین با وانکومایسین بود. نتایج DSC بیانگر حالت آمورف وانکومایسین در غشاء می باشد. حالت آزمون جذب رطوبت نشان دهنده افزایش جذب رطوبت غشا پس از فرآیند بارگذاری بود. نتایج نشان داد که در مدت زمان ۱۶۸ ساعت از انجام آزمایش، حدود ۵۵ درصد از وانکومایسین بارگذاری شده، آزاد شده است و اختلاف آماری معنی داری از نظر میانگین میزان رهایش دارو در زمان های مختلف وجود داشت ($p < 0.05$). همچنین کاهش تعداد باکتری ها در مواجهه با الیاف زئین بارگذاری شده با وانکومایسین در مقایسه با زئین و کنترل مشاهده شد.

کلید واژگان: نانوالیاف، زئین، وانکومایسین، الکتروریسی، دارورسانی

* مسئول مکاتبات: ma.miri@uoz.ac.ir

۱- مقدمه

گیاهان به عنوان منابعی مطمئن و فراوان، تجدید پذیر و ارزان در صنایع مختلف دارویی، پزشکی و غذایی پیوسته مورد توجه محققین بوده اند. استفاده از نانوحاملهای پروتئینی گیاهی، رویکرد جدیدی در صنایع غذایی و دارورسانی است [۱ و ۲]. بر خلاف نانوحاملهای پروتئینی حیوانی، پروتئینهای گیاهی به علت ماهیت هیدروفوبی، توانایی رهایش طولانی تری از دارو دارند [۲]. همچنین به واسطه آگزیزی بالا، ممکن است نانوذرات پایدار پروتئین های گیاهی بدون نیاز به تیمار های شیمیایی و فیزیکی و استفاده از مولکول های اتصال دهنده شیمیایی، که اغلب در ساخت نانوحامل های پروتئینی حیوانی استفاده می شود، تولید شوند [۳ و ۱]. پروتئین های گیاهی به فراوانی در دسترس بوده و بسیار ارزان تر از پروتئین های حیوانی هستند. همچنین خطر انتقال بیماری های حیوانی به انسان، مانند جنون گاوی را ندارند [۴]. وجود گروه های عاملی مختلف در این پروتئین ها، امکان تغییر سطح نانوذرات حاصله جهت تنظیم خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و اتصال عامل هدفمندسازی را فراهم می آورد [۱ و ۲]. از پروتئین های گیاهی که تاکنون به عنوان حامل دارویی مورد بررسی قرار گرفته است، می توان گلیادین، گلوتن، گلوتئین گندم، گلاسیسین سویا و زئین ذرت را نام برد [۵ و ۱ و ۲].

زئین حدود ۵۰-۴۵ درصد محتوای پروتئینی ذرت را تشکیل می دهد [۶]. از آنجائیکه زئین یک پروتئین طبیعی بوده و زیست تخریب پذیری مناسبی دارد، عموماً به عنوان یک ماده غذایی ایمن (GRAS) جهت استفاده در صنایع غذایی و دارویی شناخته شده است [۷ و ۸]. زئین به واسطه میزان کم جذب آب، مقاومت حرارتی بالا و ویژگی های مناسب دیگر، امروزه به عنوان پوشش زیست تخریب پذیر در غذاها و داروها استفاده میشود. در حال حاضر زئین ذرت به علت دارا بودن ویژگیهای استثنایی تشکیل فیلم، مقاومت حرارتی بالا و خواص ممانعت کنندگی بالا در برابر اکسیژن، پتانسیل خوبی برای صنایع غذایی، دارو و پلاستیک های زیست تخریب پذیر دارد [۹ و ۱۰].

زئین به دلیل حضور اسیدهای آمینه غیرقطبی همچون لوسین، پرولین و آلانین، زئین یکی از آب گریزترین پروتئین ها می باشد و

بنابراین در صنایع غذایی به عنوان یک ماده پوشش دهنده در شکلات، برنج، خشکبار و آجیل مورد استفاده قرار گرفته است [۱۱]. کاربرد زئین به عنوان یک ماده ساختاری در مصارف بسته بندی به دلیل ویژگی های تولید فیلم آن، مورد بررسی قرار گرفته است [۱۰ و ۶].

از زئین در صنعت داروسازی برای پوشش کپسول ها، ایجاد حفاظت، آزادسازی کنترل شده و پنهان کردن طعم و بوی دارو استفاده شده است [۱۱]. زئین به آسانی به تنهایی یا با سایر پلیمرها توانایی تولید ژل را داشته و به همین دلیل می تواند برای انتقال کنترل شده بیومولکول های بارگذاری شده استفاده گردد. با توجه به مطالعات انجام شده، ملکول زئین به طور نسبی دارای ساختارهای آجری شکل است که می تواند فضای کافی برای دام انداختن ترکیبات را فراهم کند [۹]. زئین خاصیت ممانعت کنندگی در برابر آب، برای گویچه های پکتین ایجاد کرده و از تخریب ترکیبات در محیط معده نیز جلوگیری می کند [۱۲]. سامانه های جدید دارورسانی بر پایه زئین، مورد توجه گروه های تحقیقاتی زیادی واقع شده است.

زئین برای آزادسازی کنترل شده اسانس ها، رنگ ها، مواد ضد میکروبی، داروهای ضد سرطان، هدف گذاری ماکروفاژها، دارورسانی از طریق دهان با حفاظت در مقابل شرایط محیط معده و انتقال ژن به صورت میکرو و نانو ذرات استفاده شده است [۱۳]. شکل مخصوص آجر مانند این پروتئین توانایی حمل ترکیبات آبدوست مانند هپارین، ۵-فلوئورئوراسیل، دوکسوروبیسین و کنترل رهایش و بهبود اثر آن ها را امکان پذیر می سازد [۹].

وانکومایسین یک آنتی بیوتیک گلیکوپپتیدی است که اولین بار در سال ۱۹۵۸ برای درمان باکتری های گرم مثبت به ویژه /ستافیلو کوکوس اورئوس معرفی شد ولی بعدها مشخص شد که علیه غالب باکتری های گرم مثبت هوازی و بی هوازی مؤثر است [۱۴]. این آنتی بیوتیک با مهار تشکیل پلیمر پپتیدوگلیکان، ساخت دیواره سلولی در باکتری ها را مهار نموده و متعاقب آن غشای سلول نیز آسیب می بیند و در نهایت سلول باکتری لیز می شود (اثر باکتریسیدی بر روی باکتری ها).

آنتی بیوتیک ها و ترکیبات ضد باکتریایی مختلفی برای استفاده از خصوصیات آنتی باکتریال در نافیبرها بارگذاری شده اند. از جمله آنتی بیوتیک ها می توان به تتراسیکلین هیدروکلراید،

1. Generally recognized as safe

۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد اولیه

زئین ذرت (گرید Z3625) از شرکت سیگما-آلد ریچ (آلمان) خریداری گردید و به محض دریافت بدون تخلیص بیشتر مورد استفاده قرار گرفت. اسید استیک گلاسیال با خلوص ۹۹/۷ درصد از شرکت مرک (انگلستان)، اتانول ۹۶ درصد از شرکت هامون طب (ایران)، وانکومایسین از شرکت اکسیر (ایران)، رده سلولی L929 از انستیتو پاستور ایران (ایران) و آب مقطر دو بار تقطیر یافته از سرم سازی ثامن (ایران) تأمین شد.

۲-۲- تهیه محلول الکتروریسی

محلول الکتروریسی از افزودن وانکومایسین (۱۰٪) به محلول زئین (۲۴/۵٪) تهیه شد. برای تهیه ۲۵ میلی لیتر محلول زئین با حجم غلظت ۱۸/۵٪ وزنی/حجمی، مقدار ۶/۱۲۵ گرم از پودر زئین توزین شد و در بالن ژوژه با اسید استیک گلاسیال حل گردید و به حجم رسانده شد. برای حل شدن پودر، مخلوط با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شد تا زئین حل شده و محلول یکنواخت تشکیل شود. محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد تا حباب‌های موجود خارج شده و پیوندهای بین مولکولی در زئین تشکیل شده و محلولی یکدست بدست آید [۲۲].

۲-۳- اندازه‌گیری ویسکوزیته

جهت اندازه‌گیری ویسکوزیته محلول‌های پلی مری از ویسکومتر چرخشی مدل Brookfield RV DVIII Ultra (ساخت شرکت بروکفیلد، کشور آمریکا) استفاده شد. اندازه‌گیری در دمای اتاق (۲۵ °C) با استفاده از اسپیندل مدل SC4-31 در محدوده سرعت برش $1-150 \text{ S}^{-1}$ صورت گرفت.

۲-۴- فرایند الکتروریسی

جهت تهیه الیاف زئین حاوی وانکومایسین، از دستگاه الکتروریسی تک محوره مجهز به یک منبع تغذیه با ولتاژ بالا در دامنه ۰ تا ۳۵ کیلو ولت استفاده شد. به عنوان رشته ساز از سر سوزن فولادی ضد زنگ با قطر ۰/۹ میلی متر (۱۸ G) استفاده شد. محلول پلیمری را درون سرنگ‌های ۵ میلی لیتری وارد کرده و از طریق یک لوله باریک به سر سوزن منتقل شد. سرنگ در وضعیت

سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین، موکسی فلوکساسین و از داروهای ضد میکروب دیگر به مشتقات ۸- هیدروکسی کینولون ها، ایتراکونازول، بنزالکونیوم کلراید، فوسیدیک اسید و نانوپارتيكل های نقره اشاره نمود [۱۶ و ۱۵]. وانکومایسین آنتی بیوتیک مهم دیگری است که در متون علمی در اشکال مختلف موضعی، گویچه، میکروسفر، نانوپارتيكل، لیپوزوم و نانوالیاف ذکر شده است.

الکتروریسی تکنیکی ساده برای ایجاد نانوالیاف به شکل شبکه ای بی بافت است. الیاف الکتروریسی شده می‌توانند به عنوان حامل های نوین و ابتکاری برای انکپسولاسیون ترکیبات حساس عمل کنند [۱۷ و ۱۸]. الکتروریسی در سال ۱۹۳۴ توسط فرمهالس به ثبت رسید. هدف وی تولید رشته های پلیمری با استفاده از نیروی الکترواستاتیکی بود. الیاف الکتروریسی شده دارای ویژگی‌های برجسته‌ای مانند نسبت بالای سطح به حجم، اندازه منافذ کوچک با تخلخل زیاد می‌باشد. این ویژگیها باعث شده است که از الیاف الکتروریسی شده برای دارو رسانی، فیلتراسیون، مهندسی بافت و پوشش زخم و ... استفاده گردد [۱۳]. استفاده از الیاف الکتروریسی شده با اهداف انکپسولاسیون در مواد غذایی، نسبتاً جدید است. به عنوان مثال لی و همکاران (۲۰۰۹) و فرناندز و همکاران (۲۰۰۹) از الیاف الکتروریسی شده زئین برای افزایش پایداری اپی گالوکاتچین و بتا کاروتن استفاده نمودند [۱۹ و ۲۰]. تورس- گینر و همکاران (۲۰۱۰) همچنین با استفاده از الیاف زئین، ترکیب داکوزا هگزانوئیک اسید (DHA)^۲ را انکپسوله نمودند تا بدین صورت واکنشهای تخریبی به تاخیر افتد و پایداری شیمیایی آن افزایش یابد [۲۱].

در این تحقیق با توجه به ویژگی‌های مطلوب سطح به حجم نانوالیاف الکتروریسی شده و نیز خصوصیات مطلوب زئین، غشاء نانوالیاف از زئین تولید گردید و وانکومایسین در آن بارگذاری شد. سپس ویژگی‌های این نانوحامل، از جمله قطر و مورفولوژی نانو الیاف، تخلخل، آبدوستی، میزان بارگیری و پروفایل آزادسازی وانکومایسین مطالعه شد.

2. Docosahexaenoic acid

۲-۱۱- مطالعه آزاد سازی وانکومایسین

از الیاف بارگذاری شده با وانکومایسین، ۳۳ قطعه به شکل مربع در ابعاد ۲ در ۲ سانتی متر برش داده شد. این مربع‌ها چسبیده به فویلی هستند که الیاف بر روی آن‌ها ریسیده شده بود، لذا وزن قطعات مربع به همراه فویل اندازه گیری شد، سپس با استفاده از پنس استریل و با دقت بالا فویل را از الیاف جدا کرده و وزن فویل خالی هم توزین شد. با کم کردن وزن فویل خالی هر قطعه از وزن فویل باضافه قطعه، وزن الیاف مشخص شد. سپس هر کدام از مربع‌ها به طور مجزا داخل ارلن های حاوی ۲۰۰ میلی لیتر بافر PBS با pH 7.4 ریخته و در شیکر انکوباتور در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی گراد) گرمخانه گذاری شد. در زمان‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت، یک سی سی از محلول بافر فسفات را برداشته، جذب وانکومایسین آزاد شده با استفاده از اسپکتروفتومتر UV visible در طول موج ۲۸۱ نانومتر اندازه‌گیری گردید و مقدار دارو با استفاده از منحنی استاندارد وانکومایسین اندازه‌گیری و نمودار آزادسازی دارو (نمودار رهایش) در برابر زمان رسم شد. این کار برای هر نمونه سه بار تکرار گردید.

۲-۱۲- بررسی فعالیت آنتی‌بیوتیکی الیاف با روش MIC^۳

به منظور بدست آوردن حداقل غلظت مهاري MIC الیاف زئین خالی و الیاف زئین حاوی وانکومایسین بر روی سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC1112 (استافیلوکوک طلایی) از روش MIC در محیط مایع استفاده شد.

از الیاف زئین خالی و الیاف بارگذاری شده با وانکومایسین، هرکدام ۱۶ قطعه به شکل مربع در ابعاد ۲ در ۲ سانتی متر برش داده شد. این مربع‌ها چسبیده به فویلی هستند که نانوالیاف بر روی آن‌ها ریسیده شده بود، لذا وزن قطعات مربع به همراه فویل اندازه گیری شد، سپس با استفاده از پنس استریل و با دقت بالا فویل را از غشاء الیاف جدا کرده و وزن فویل خالی هم توزین شد. با کم کردن وزن فویل خالی هر قطعه از وزن فویل باضافه قطعه، وزن الیاف مشخص شد. هر کدام از ۳۲ قطعه را داخل یک

پلیت استریل قرار داده و مشخصات آن‌ها پشت پلیت نوشته شد. پلیت‌ها جهت استریل شدن الیاف، زیر هود به مدت نیم ساعت (۳۰ دقیقه) در معرض نور UV قرار داده شد. پس از نیم ساعت طرف دیگر الیاف هم مجدداً زیر نور UV قرار داده شد تا استریل شود.

جهت انجام آزمایش، محیط جامد TSA (Tryptic Soy Agar)، محیط مایع TSB (Tryptic Soy Broth)، تعداد مورد نیاز لوله حاوی محلول نرمال سالین با حجم ۹ ml ساخته و به همراه ۳۴ عدد ارلن پنبه گذاری شده با حجم ۲۵۰ میلی لیتر داخل اتوکلاو استریل شد. همچنین سوسپانسیون (شیرابه) میکروبی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از اضافه کردن کلنی‌های باکتری استاندارد به محلول نرمال سالین بدست آمد. غلظت آن طوری تنظیم شد که حاوی تعداد 10^8 CFU/ml ~ باکتری (محلول نیم مک فارلند) باشد.

طراحی آزمایش بدین صورت بود که فعالیت آنتی بیوتیکی الیاف در حجم‌های ۲۵ و ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت TSB و در زمان‌های صفر، ۱، ۲ و ۴ ساعت و به صورت دو تکرار بررسی شود. بنابراین برای حجم ۲۵ میلی لیتری (گروه یک)، تعداد ۸ ارلن برای زئین، ۸ ارلن برای زئین/وانکومایسین و یک ارلن به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد و به صورت مشابه برای حجم ۵۰ میلی لیتری (گروه دو) هم تعداد ۸ ارلن برای زئین، ۸ ارلن برای زئین/وانکومایسین و یک ارلن به عنوان گروه کنترل تعیین شد. بنابراین برای گروه یک، ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده ریخته شد. سپس، به هر ارلن ۲۵ میلی لیتر محیط کشت مایع TSB اضافه و بعد بر اساس ترتیب شماره گذاری و نام گذاری، قطعه‌ای از الیاف داخل ارلن مربوطه با استفاده از یک پنس استریل اضافه شد. در ارلن کنترل، فقط محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی ریخته شد و هیچ الیافی اضافه نشد. مشابه با همین روش، برای گروه دو نیز انجام شد. اطلاعات مربوط به هر الیاف و زمان مورد نظر هم بر روی ارلن‌ها نوشته شد. سپس همه ارلن‌ها در دستگاه شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه انکوبه گذاری شد تا الیاف به طور یکنواخت در مجاورت باکتری‌های موجود در محیط کشت قرار گیرند. در ادامه به ترتیب ارلن‌های مربوط به هر زمان را در ساعت‌های مشخص از شیکر انکوباتور خارج کرده، ۱

3. Minimum inhibition concentration

نواری شکل دیده نمی‌شود. نتایج نشان دهنده آن است که با شرایط الکتروریسی شده، الیاف تولید شده وضعیت مطلوبی دارا می‌باشند. با محاسبه میانگین قطر الیاف تشکیل شده با استفاده از نرم‌افزار uImage J 1.43 از روی میکروگراف‌های SEM، محاسبه شد و داده‌ها از نظر آماری آنالیز گردید. داده‌های بدست آمده مشخص شد که در ولتاژ اعمال شده در این تحقیق، الیافی یکنواخت فاقد گویچه شکل گرفته است که از نظر قطر الیاف، یکنواختی و شبکه‌ای شدن قابل قبول است.

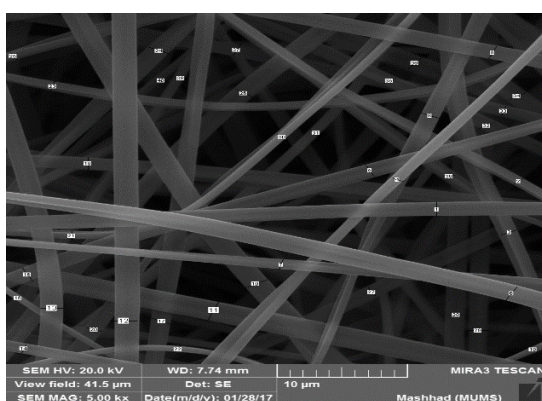
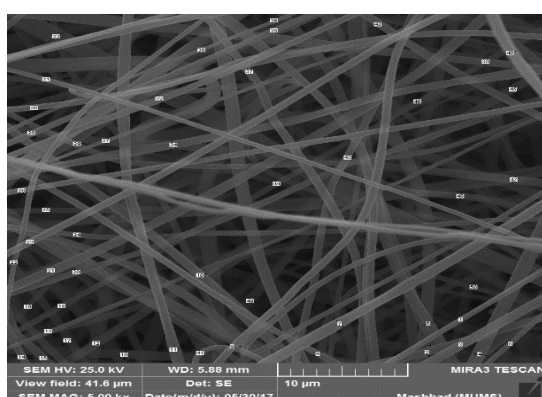


Fig 1 SEM images of zein fibers electrospun at a constant zein concentration of 24.5 w/v %, applied voltage of 20 kV, flow rate of 8 ml/h, and distance between needle tip and collector of 15 cm: (a) free vancomycin, (b) loaded with vancomycin.

جهت مقایسه میانگین قطر الیاف در دو گروه زئین تنها و زئین/وانکومایسین، از آزمون آماری Independent Samples t-test استفاده گردید. نتایج نشان داد که اختلاف آماری

میلی لیتر از محلول داخل ارلن برداشته و در یک لوله آزمایش که حاوی ۹ ml نرمال سالین استریل بود تلقیح و سپس سری رقت 10^{-1} ، 10^{-2} و 10^{-3} تهیه شد. از هریک از رقت‌ها، مقدار ۱ میلی لیتر را برداشته و کف پلیت‌های استریل ریخته شد (سه تکرار). بعد محیط کشت جامد TSA (با دمای حدود ۳۵ درجه، به طوری که پشت دست را نسوزاند) به آرامی بر روی آن ریخته شد و به صورت ضربدری پخش شد (روش پورپلیت). سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت تعداد کلنی‌های رشد کرده بر روی پلیت‌ها با کمک دستگاه کلنی کانتر شمارش شده و تعداد بین ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی به عنوان حد قابل قبول در نظر گرفته شد.

۲-۱۳- طرح آماری

بررسی میزان رهایش طی زمان (۱۶۰ ساعت) در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. آنالیز واریانس با استفاده از نرم‌افزار Minitab v.16 صورت گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار EXCEL استفاده شد. برای مقایسه میانگین قطر الیاف در دو گروه زئین و زئین/وانکومایسین، از آزمون آماری Independent Samples t-test در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده گردید. تاثیر انکپسولاسیون وانکومایسین بر ظرفیت جذب آب غشاها طی زمان و بررسی فعالیت ضد میکروبی الیاف با استفاده از آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و آنالیز واریانس یک طرفه توسط نرم‌افزار آماری Minitab v.16 بررسی شد. در این مطالعه، آزمون توکی برای مقایسه میانگین و $P < 0.05$ سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد و نتایج به صورت جداول مدون و نمودارهای مربوطه ارائه گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- قطر و مورفولوژی الیاف الکتروریسی شده

شکل ۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نمونه‌های الکتروریسی شده الیاف زئین پیش از بارگذاری (الف) و پس از بارگذاری وانکومایسین (ب) را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، ساختار الیاف تولید شده از محلول زئین و محلول زئین/وانکومایسین، ساختار شبکه‌ای از الیاف میله‌ای شکل بافته نشده و فاقد گویچه را نشان می‌دهد. هیچ گونه الیاف

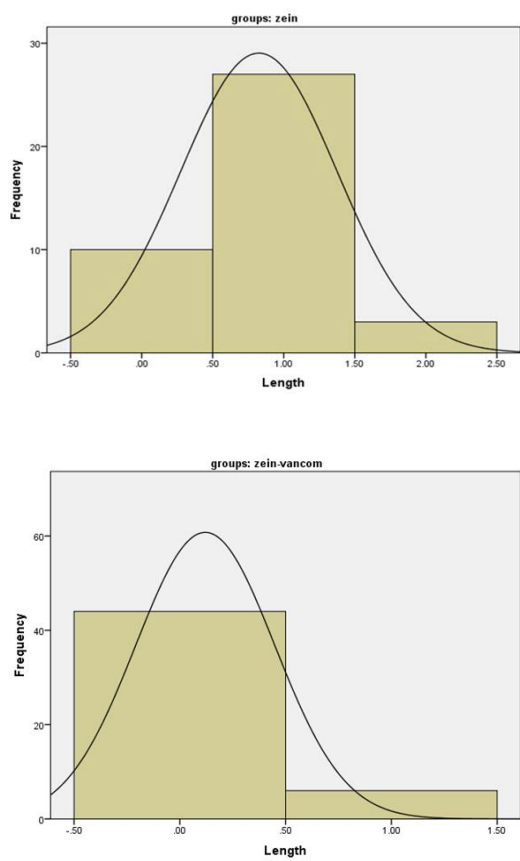
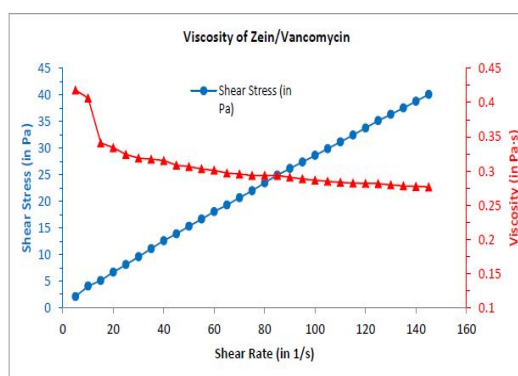


Fig 2 Diameter distributions of electrospun (a) zein fibers, (b) zein/vancomycin fibers.

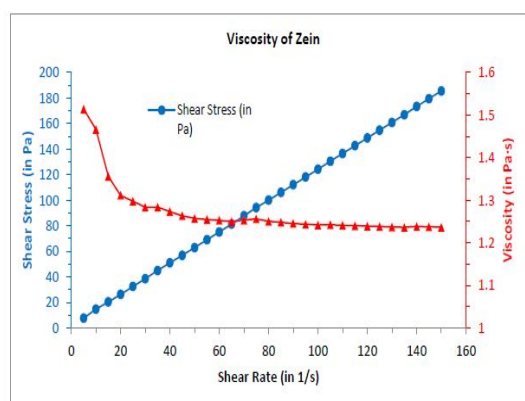
معنی داری از نظر میانگین قطر الیاف در دو گروه وجود دارد ($P < 0.05$) (جدول ۱). همچنین نتایج نشان می دهد که افزودن وانکومایسین به محلول زئین باعث کاهش قطر نانو الیاف شده است ($P < 0.05$) (شکل ۲). رابطه قوی بین ویسکوزیته محلول و قابلیت رسیدن شدن و مورفولوژی نانو الیاف نیز وجود دارد. یعنی هرچه ویسکوزیته محلول پلیمری بالاتر باشد، موجب تولید نانو الیاف ضخیم تر می شود و ویسکوزیته کمتر می تواند موجب باریکتر شدن قطر نانو الیاف شود. اندازه گیری ویسکوزیته در دو حالت صورت گرفت. در حالت اول ویسکوزیته محلول زئین تنها و در حالت دوم ویسکوزیته محلول زئین حاوی وانکومایسین اندازه گیری شد. نمودارهای شکل ۳ ویسکوزیته محلول الکتروروسی قبل و بعد از اضافه کردن داروی وانکومایسین را نشان می دهد. نتایج نشان داد که میزان ویسکوزیته در زئین خالی حدود $1/237 \text{ Pa}$ تا $1/514 \text{ Pa}$ می باشد در حالیکه این مقدار در مخلوط زئین/وانکومایسین به حدود $0/277 \text{ Pa}$ تا $0/418 \text{ Pa}$ کاهش می یابد.

Table 1 t-test analysis of electrospun zein and zein/vancomycin fibers according to average fiber diameter

	Zein	Zein/Vancomycin	P-value
Average fiber diameter (nm) Mean $\pm$ SD	914 $\pm$ 428	454 $\pm$ 167	0.001



(b)



(a)

Fig 3 Rheogram and viscosity of (a) zein and (b) zein/vancomycin solution.

۳-۲- بررسی واکنش بین زئین و وانکومایسین

طیف‌سنجی مادون قرمز به منظور شناسایی گروه‌های عاملی و تعیین نوع واکنش یا پیوندهای برقرار شده بین زئین و وانکومایسین در الیاف الکتروریسی شده انجام گرفت. شکل ۴ طیف‌های ارائه شده از الیاف زئین، وانکومایسین و زئین/وانکومایسین را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، پیک‌های شاخص زئین بترتیب از فرکانس زیاد به سمت کم، به صورت پیک پهن در 3282 cm^{-1} (نوارهای کششی مربوط به پیوند N-H)، نوارهای جذبی کششی C-H آلیفاتیک در 2960 و 2937 و 2873 ، نوار جذبی کششی کربونیل آمیدی (پیک آمید I) در 1660 cm^{-1} و نوار جذبی کششی (پیک آمید II) در 1532 cm^{-1} ظاهر شده است. پیک آمید I مربوط به نوارهای ارتعاشی کششی گروه‌های کربونیل (C=O) است و پیک آمید II، مربوط به ارتعاشات خمشی جفت شده با ارتعاشات کششی C-N زنجیره پپتیدی می‌باشد که گاهی اوقات نیز خود را بصورت یک شانه در کنار آن نشان می‌دهد (۲۴). پیک‌های مربوط به طیف سنجی وانکومایسین در شکل ۴ نشان داده شده است. ارتعاشات کششی NH_2 آمیدی و آمین به صورت پیک دو شاخه در 3400 و 3370 cm^{-1} که با پهنای طیف پوشانده شده است، ارتعاشات کششی OH اسیدی در ناحیه $3500-2500\text{ cm}^{-1}$ ، ارتعاشات کششی NH آمیدی و آمین و OH الکل و فنول با پهنای پیک از ناحیه $3500-2500\text{ cm}^{-1}$ پوشیده شده، ارتعاشات کششی CHهای آروماتیک در ناحیه $3100-3000\text{ cm}^{-1}$ ، ارتعاشات کششی متقارن و نامتقارن C-Hهای آلیفاتیک CH_2 و CH_3 در 2900 و 2800 cm^{-1} ، ارتعاشات کششی گروه‌های کربونیل آمید در 1655 و 1504 cm^{-1} ، ارتعاشات کششی C=C حلقه آروماتیک در 1427 cm^{-1} و 1599 cm^{-1} ، ارتعاشات کششی گروه‌های کربونیل آمید در 1655 cm^{-1} و 1504 cm^{-1} و ارتعاشات کششی C=C حلقه آروماتیک در 1655 cm^{-1} و 1504 cm^{-1} ، ارتعاشات خمشی خارج صفحه CH_2 در 1427 و 1599 cm^{-1} ، ارتعاشات خمشی خارج صفحه CH_3 در 1375 cm^{-1} ، ارتعاشات کششی C-O اتري در 1228 و 1022 cm^{-1} و کششی C-O الکل نوع اول در 1022 cm^{-1} ظاهر شده‌اند. همانگونه که در شکل ۴ ملاحظه می‌گردد پهنای پیک از ناحیه $3500-2500\text{ cm}^{-1}$ در طیف FTIR مربوط به ساختار زئین بدلیل پیوند هیدروژنی بین مولکولی می‌باشد.

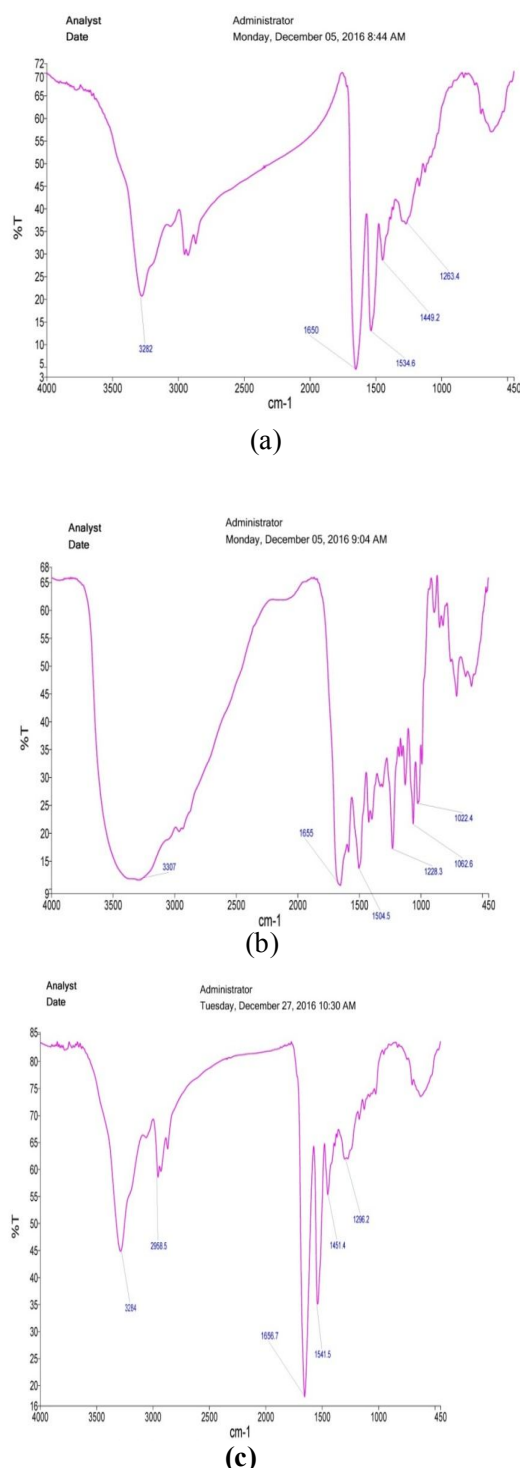


Fig 4 FTIR spectra of (a) zein, (b) vancomycin, (c) zein/vancomycin.

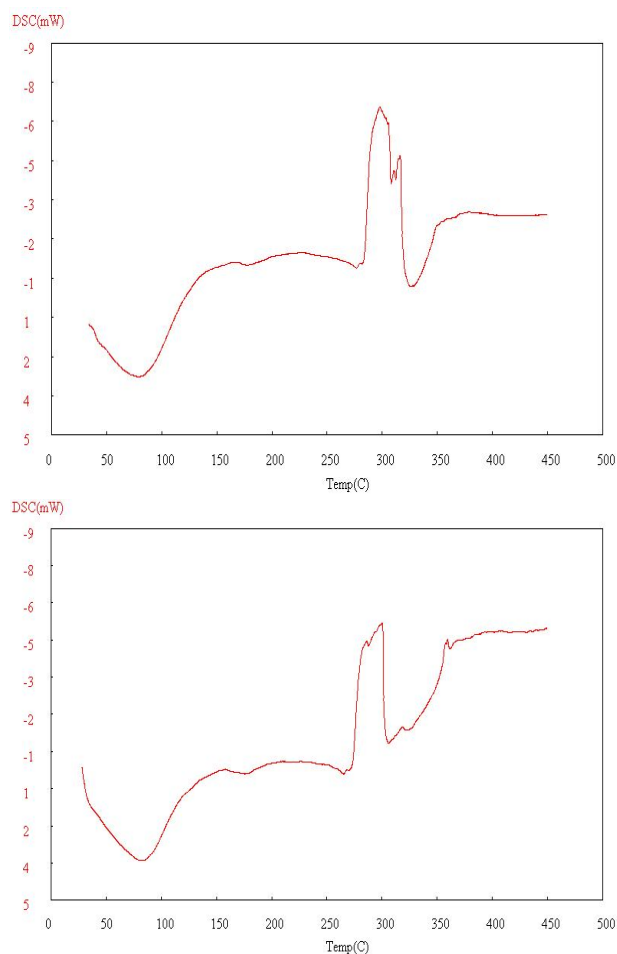


Fig 5 DSC thermograms of (a) zein, (b) zein/vancomycin electrospun fibers.

۳-۴- ظرفیت جذب آب

نتایج به دست آمده از آزمون جذب آب (جدول ۲) نشان دهنده افزایش جذب رطوبت نمونه ژئین پس از فرایند بارگذاری است. این مقدار افزایش را می‌توان به وجود گروه‌های آبدوست نسبت داد، زیرا بخش عمده‌ای از آمینو اسیدهای تشکیل دهنده وانکومایسین حاوی گروه‌های آبدوست هستند.

این پهن‌شدگی در طیف FTIR مربوط به ژئین/ وانکومایسین خیلی کمتر شده که نشان می‌دهد با قرار گرفتن وانکومایسین در بین ساختار پلیمری ژئین، این پیوند هیدروژنی بین مولکولی در ساختار ژئین کمتر شده است (با قرار گرفتن مولکول‌های وانکومایسین در بین ساختار پلیمری ژئین، باعث از هم گسیختن و دور شدن مولکول‌های پلیمری ژئین و در نتیجه کمتر شدن پیوند هیدروژنی بین مولکولی آن می‌شوند). نتایج نشان می‌دهد که تغییری در پیک‌های شاخص بستر پلیمری ژئین شامل حذف پیک و یا ظاهر شدن پیک جدید مشاهده نمی‌شود. در واقع این پدیده نشان دهنده این واقعیت است که هیچ نوع واکنشی بین وانکومایسین و بستر پلیمری ژئین که منجر به تولید ترکیبات جدید شود، رخ نداده است.

۳-۳- بررسی حالت فیزیکی وانکومایسین در

غشاء الیاف

به منظور بررسی حالت فیزیکی وانکومایسین در غشاء الیاف ژئین از DSC استفاده شد. ترموگرام‌های ژئین و ژئین/ وانکومایسین در شکل ۵ نشان داده شده است. الیاف ژئین دو پیک گرماگیر بزرگ در ۷۵ و ۲۹۸ دارد که پیک اول مربوط به تبخیر آب از ساختار ژئین و پیک دوم مربوط به تخریب گرمایی زنجیرهای پروتئینی ژئین است. همانطور که مشاهده می‌شود با اضافه شدن وانکومایسین به ژئین، دمای ذوب، جوش و تصعید آن‌ها معمولاً به دماهای متفاوتی جابه‌جا شده است. دمای انتقال شیشه‌ای (Tg)^۴ نیز در سه ماده متفاوت است به این صورت که در وانکومایسین ۲۵۳/۳ °C در ژئین ۱۵۱/۸ °C و در نمونه ژئین/ وانکومایسین ۱۶۱/۳ °C می‌باشد. با توجه به عدم حضور پیک کریستالینیتی، در فاصله بین دمای انتقال شیشه‌ای (Tg) و دمای ذوب (Tm)، آمورف بودن ترکیب مشهود است.

Table 2 Water absorption of zein fibers and zein/vancomycin fibers.

Time (h)	Zein fibers	Zein/Vancomycin fibers
	Water absorption (%)	Water absorption (%)
0.5	0.78	5.2
1	1.09	0.29
2	0.6	1.52
3	0.35	1.25
6	0.36	5.7
12	1.68	0.72
24	1.04	0.4

فرمول ۲-۳

$$\text{کارایی بارگیری} = \frac{\text{وزن اولیه}}{\text{وزن ثانویه}} \times 100$$

۳-۶- مطالعه رهائش وانکومایسین

شکل ۶ پروفایل آزادسازی دارو از الیاف ژئین حاوی وانکومایسین را نشان می دهد، رهش دارو از الیاف در دمای محیط (فاز گیرنده بافر فسفات با pH ۷/۴)، در ۲۴ ساعت اول، قدری سریعتر بوده و لی با گذشت زمان سرعت رهش آهسته تر شده است. به نظر نمی رسد که آزادسازی اولیه دارو نشان دهنده آزاد سازی انفجاری اولیه (burst release) باشد، بلکه می توان آن را به وجود مولکول های دارو در سطح الیاف، بدون برقراری اتصال با ساختار الیاف مرتبط دانست. نتایج نشان داد که در مدت زمان ۱۶۸ ساعت از انجام آزمایش، حدود ۵۵ درصد از وانکومایسین بارگذاری شده بر روی الیاف آزاد شده است. نتایج نشان داد که اختلاف آماری معنی داری از نظر میانگین میزان رهائش دارو در زمان های مختلف وجود دارد ($P < 0.05$). با توجه به اینکه آزادسازی در سیستم بسته (in vitro) انجام می شود، روند آزاد سازی از واکنش درجه اول تبعیت می کند که معادلات سرعت و مقدار آن به ترتیب $\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = -k_1 t$ می باشد. اگر آزاد سازی دارو از نوع درجه صفر بود، می بایستی نموداری به صورت خط مستقیم با شیب مثبت از مبدا مختصات

۳-۵- کارایی بارگیری الیاف

با توجه به این که ۲/۵ mL از محلول ژئین/وانکومایسین (حاوی ۰/۴۹ گرم وانکومایسین) مقدار داروی موجود در محلول الکتروریسی شده ۰/۲۴۵ mg وانکومایسین می باشد. الکتروریسی این حجم از محلول، در نهایت ۰/۵۳ g غشاء تولید نمود. بنابراین مقدار داروی موجود در این غشاء، برابر با ۰/۲۴۵ mg می باشد. برای آزمایش بارگیری دارو، مقدار کل ۰/۰۰۸۸۴ گرم از غشاء، (در سه آزمایش جداگانه با وزن های ۰/۰۰۲۳۱، ۰/۰۰۳۰۳ و ۰/۰۰۳۵ گرم) بایستی از نظر تنوریک حاوی ۴/۰۸ میلی گرم وانکومایسین باشد. مقدار وانکومایسین اندازه گیری شده پس از حل کردن سه نمونه فوق در DMSO و تعیین جذب UV آنها با استفاده از معادله ۳-۱ حاصل از منحنی استاندارد محاسبه گردید:

فرمول ۳-۱

$$Y = 26.313 X - 0.0713$$

مقدار دارو در هر نمونه و کل وزن سه نمونه اندازه گیری شد که به ترتیب ۱/۰۶ mg، ۱/۴ mg و ۱/۶ mg و جمع آنها ۴/۰۶ mg شد. با استفاده از معادله ۳-۲ کارایی بارگیری محاسبه شد که برابر با ۹۹/۵٪ بوده است که نشان دهنده بارگیری مطلوبی است.

۷-۳- بررسی فعالیت آنتی بیوتیکی الیاف با روش MIC

به منظور بدست آوردن حداقل غلظت مهاري MIC الیاف زئین و الیاف زئین/وانکومایسین بر روی سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC1112 (استافیلوکوک طلایی) از روش MIC در محیط مایع استفاده شد. نمودارهای شکل ۷ نتایج مربوط به شمارش تعداد باکتری‌های هدف در مقابل الیاف زئین و الیاف حاوی وانکومایسین در مقایسه با گروه کنترل را در دو حجم ۲۵ و ۵۰ میلی‌لیتری نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، تعداد باکتری‌ها در مواجهه با الیاف زئین/ وانکومایسین در مقایسه با زئین و کنترل، بیشتر کاهش می‌یابد در حالی که تعداد باکتری‌ها برای هر دو نمونه زئین و کنترل، مشابه و نزدیک بهم است. میزان MIC استاندارد رای وانکومایسین $2 \mu\text{g/mL}$ گزارش شده است. میزان MIC بدست آمده در تحقیق حاضر $11 \mu\text{g/mL}$ بود. آزمون‌های آماری نشان داد که در هر دو حجم، زمان بر تکثیر میکروبی، تأثیر آماری معنی‌داری ($P < 0.05$) دارد.

عبور می‌کرد. ولی شکل ۶ نشان می‌دهد که با گذشت زمان از شیب نمودار کاسته شده و نمودار به حالت خمیده در آمده است. اگر نمونه‌برداری تا زمان آزاد شدن تمام ترکیب انجام می‌شد، نمودار به صورت خط صاف موازی با محور زمان، در می‌آمد.

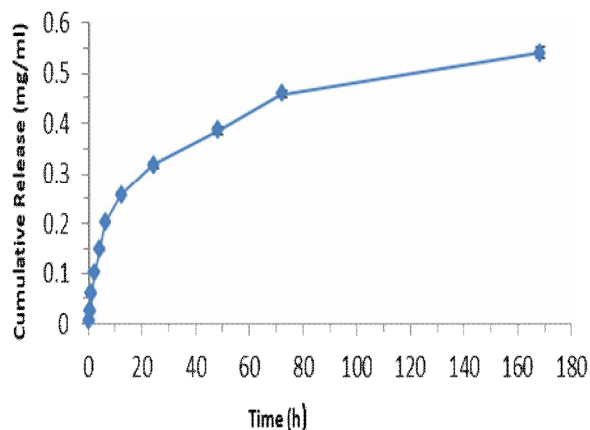
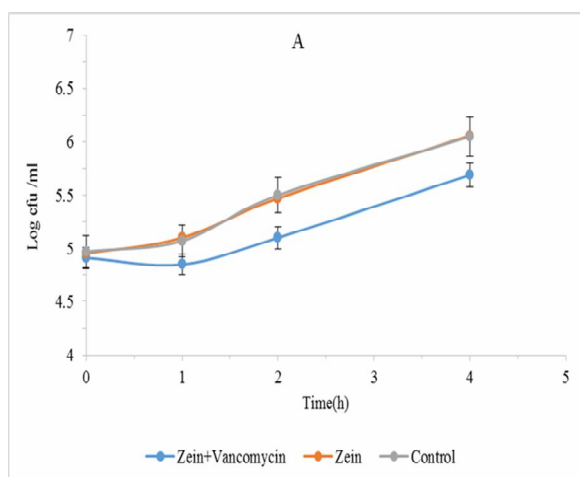
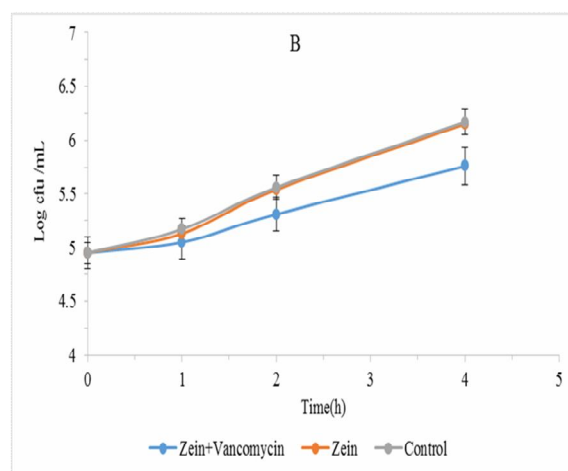


Fig 6 Release profile of vancomycin from electrospun zein/vancomycin fibers

خمیدگی نمودار خود نشان دهنده درجه اول بودن آزاد سازی دارو می‌باشد و نشان می‌دهد در ابتدا که مقدار دارو در غشاء الیاف زیاد می‌باشد، آزادسازی سریعتر (و بیشتر) است ولی با گذشت زمان سرعت آهسته‌تر شده و نمودار تجمعی وانکومایسین آزاد شده نیز خمیده می‌شود.



(a)



(b)

Fig 7 Antibacterial effect of control, electrospun zein fibers and electrospun zein/vancomycin fibers in microbial suspension of volume (a) 25 mL, (b) 50mL.

۴- نتیجه گیری

در این تحقیق الیاف زئین بارگذاری شده با وانکومایسین به روش الکترورسی تهیه شد. مورفولوژی لایه‌های بدست آمده با استفاده از SEM بررسی و شکل‌گیری الیاف رشته‌ای یکنواخت تایید شد. نتایج FTIR نشان داد که بین عوامل زئین با وانکومایسین پیوند شیمیایی برقرار نگردید. نتایج DSC بیانگر حالت آمورف وانکومایسین در غشاء می‌باشد. آزمون جذب رطوبت نشان دهنده افزایش جذب رطوبت نمونه زئین پس از فرآیند بارگذاری است. نتایج نشان داد که در مدت زمان ۱۶۸ ساعت از انجام آزمایش، حدود ۵۵ درصد از وانکومایسین بارگذاری شده، آزاد گردید و اختلاف آماری معنی‌داری از نظر میانگین میزان رهایش وانکومایسین در زمان‌های مختلف وجود دارد ($P < 0.05$). همچنین کاهش تعداد باکتری‌ها در مواجهه با الیاف زئین بارگذاری شده با وانکومایسین در مقایسه با زئین خالی و کنترل مشاهده شد.

۵- منابع

- [6] Shukla, R., &Cheryan, M. 2001. Zein: The industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, 13, 171-192.
- [7] Bai J, Alleyne V, Hagenmaier RD, Mattheis JP, Baldwin EA. 2003. Formulation of zein coatings for apples (*Malus domestica* Borkh). *Postharvest Biology and Technology*. 28(2):259-68.
- [8] Zhang Y, Cui L, Che X, Zhang H, Shi N, Li C, et al. 2015. Zein-based films and their usage for controlled delivery: Origin, classes and current landscape. *Journal of Controlled Release*. 206:206-19.
- [9] Lai L, Guo H. 2011. Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting. *International journal of pharmaceutics*. 404(1):317-23.
- [10] Corradini E, Souto de Medeiros E, Carvalho AJ, Curvelo AA, Mattoso LH. 2006. Mechanical and morphological characterization of starch/zein blends plasticized with glycerol. *Journal of Applied Polymer Science*. 101(6):4133-9.
- [11] Torres-Giner S, Gimenez E, Lagaron JM. 2008. Characterization of the morphology and thermal properties of Zein Prolamine nanostructures obtained by electrospinning. *Food Hydrocolloids*. 22(4):601-14.
- [12] Liu X, Sun Q, Wang H, Zhang L, Wang J-Y. 2005. Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system. *Biomaterials*. 26(1):109-15.
- [13] Ramakrishna S. ; 2005. An introduction to electrospinning and nanofibers: World Scientific.
- [14] Bruniera F, Ferreira F, Saviolli L, Bacci M, Feder D, da Luz Goncalves Pedreira M, et al. 2015. The use of vancomycin with its therapeutic and adverse effects: a review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 19(4):694-700.
- [15] Gardete S, Tomasz A. 2014. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*. 124(7):2836-40.
- [16] CLSI C. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. CLSI/NCCLS Document M100-S22 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- [1] Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA. 2012. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 161(1):38-49.
- [2] Reddy N, Yang Y. 2011. Potential of plant proteins for medical applications. *Trends in Biotechnology*. 29(10):490-8.
- [3] Ezpeleta I, Irache JM, Stainmesse S, Chabenat C, Gueguen J, Popineau Y, et al. 1996. Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans-retinoic acid. *International Journal of Pharmaceutics*. 131(2):191-200.
- [4] Peng YY, Glattauer V, Ramshaw JA, Werkmeister JA. 2010. Evaluation of the immunogenicity and cell compatibility of avian collagen for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 93(4):1235-44.
- [5] Chen L, Remondetto GE, Subirade M. 2006. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*. 17(5):272-83.

- encapsulation in ultrathin electrosprayed zein prolamin. *Journal of food science*, 75: N69-N79.
- [22] Tseng Y-Y, Kao Y-C, Liao J-Y, Chen W-A, Liu S-J. 2013. Biodegradable drug-eluting poly [lactic-co-glycol acid] nanofibers for the sustainable delivery of vancomycin to brain tissue: in vitro and in vivo studies. *ACS chemical neuroscience*. 4(9):1314-21.
- [23] Zhang L, Yan J, Yin Z, Tang C, Guo Y, Li D, et al. 2014. Electrospun vancomycin-loaded coating on titanium implants for the prevention of implant-associated infections. *International Journal of Nanomedicine*. 9:3027-36.
- [24] Miri MA. 2017. Zein Electrospun Nanofibers as Nanocarrier of Vitamin C: Characterisation and Kinetic stability Study. Ph.D. Thesis. Ferdowsi University of Mashhad.
- [17] Sill TJ, von Recum HA. 2008. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 29(13):1989-2006.
- [18] Cui W, Zhou Y, Chang J. 2010. Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery. *Science and Technology of Advanced Materials*. 11(1):014108.
- [19] Li Y, Lim LT, and Kakuda Y. 2009. Electrospun Zein Fibers as Carriers to Stabilize Epigallocatechin Gallate. *Journal of Food Science*, 74: 233-240.
- [20] Fernandez A, Torres-Giner S, and Lagaron, JM. 2009. Novel route to stabilization of bioactive antioxidants by encapsulation in electrospun fibers of zein prolamine. *Food Hydrocolloids*, 23:1427-1432.
- [21] Torres-Giner S, Martinez-Abad A, Ocio, MJ., and Lagaron, J. M. 2010. Stabilization of a neuraceutical omega-3 fatty acid

Electrospun zein nanofibers as nanocarrier of vancomycin: Characterization, release and antibacterial properties

Movaffagh, J. ¹, Amiri, N. ², Ebrahimi, S. ³, Kalalinia, B. F. ⁴, Fazli Bazaz, B. S. ⁵, Azizzadeh, M. ⁶, Arabzadeh, S. ⁷, Miri, M. A. ^{8*}

1. Ph.D. Targeted Drug Delivery Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
2. Student of drug nanotechnology, faculty of Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
3. student of pharmacy science, Department of Pharmaceutics, faculty of pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
4. Ph.D. Avicenna Research Institute, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
5. Ph.D. Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
6. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad. E-Mail: m-azizzadeh@um.ac.ir
7. Bachelor of microbiology, Avicenna Research Institute, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
8. Ph.D. Department of Food Science and Technology, Zabol University, Zabol, Iran. E-mail: ma.miri@uoaz.ac.ir

(Received: 2017/08/20 Accepted:2018/05/23)

Protein-based carriers have several advantages over lipid, carbohydrate, synthetic polymers and inorganic colloidal carriers in terms of biodegradability, availability, high capacity of drug transplantation. Electrospinning is a process that uses electric fields to spin fibers with diameters ranging from hundreds to tens of nanometers. Zein is the major storage protein of maize. Vancomycin is a broad spectrum antibiotic that acts against gram-positive bacteria. The purpose of the present study was to evaluate the properties of nano-fibrous membrane containing vancomycin antibiotics and to study release and antibacterial properties. Electrospinning method was used to prepare a polymer matrix of a zein nanofiber containing vancomycin antibiotic. The physical properties of the fibers, the method of drug release and the antimicrobial activity of vancomycin loaded fiber were investigated. The morphology of the nanofiber was confirmed using scanning electron microscopy and the formation of uniform filamentary fibers was confirmed. The results of Fourier transform infrared indicated no interaction between zein and vancomycin. The DSC results indicated that vancomycin was physically in amorphous state. The moisture absorption test showed an increase of absorption of zein samples after the loading process. The results showed that after 168 h, about 55% of the loaded vancomycin on the fibers was released. A significant difference was observed between the rate of drug release at different times ($p < 0.05$). There was also a decrease in the number of bacteria encountered with vancomycin loaded zein fibers compared to non-loaded zein fiber and control samples.

Keywords: Nanofiber, Zein, Vancomycin, Electrospinning, Drug delivery

* Corresponding Author E-Mail Address: ma.miri@uoaz.ac.ir