

بررسی خواص ضد میکروبی و زیست‌سازگاری داربست‌های نانولیفی بر پایه کراتین استخراج شده از ضایعات موی انسانی همراه با نانو ذرات نقره

مریم حاج ملکی^۱، رامین خواجوی^۲، طیبه تولیت^۳

^۱ کارشناس ارشد مهندسی شیمی نساجی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات
^۲ دانشیار، گروه مهندسی شیمی نساجی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران جنوب
^۳ دانشیار، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: از آنجایی که سمیت سلولی و خواص ضد میکروبی دو عامل ضروری در زخم بندهای پیشرفته محسوب میگردند، تحقیقات بسیاری جهت معرفی و کاربرد موادی با این خصوصیات انجام گرفته است. هدف این تحقیق، استخراج ماده ارزشمند کراتین از ضایعات موی انسان و تبدیل آن به داربستی نانولیفی جهت دستیابی به خصوصیات ضد میکروبی ارتقا یافته و حداقل سمیت سلولی بود.

روش بررسی: کراتین به وسیله روشی قلیایی استخراج و از طریق الکتروفورز (SDS-PAGE) مشخصه‌سازی گردید. کراتین استخراج شده با غلظت‌های مختلف به همراه پلیمر پلی‌وینیل‌الکل و نانوذرات نقره از طریق روش الکتروریسی به داربست‌های نانولیفی تبدیل شد. میکروسکوپ الکترونی پویشی، آزمون ضد میکروبی (AATCC100-2004) و آزمون MTT بصورت مستقیم (ISO10993-5) بترتیب جهت بررسی مورفولوژی، سنجش فعالیت ضد میکروبی و سازگاری سلولی داربست‌ها به کار رفتند.

یافته‌ها: کراتین استخراج شده با وزن مولکولی ۶۵-۵۶ kDa در ماده استخراج شده مشاهده گردید. داربست‌هایی سه‌بعدی از نانوالیاف با قطری در محدوده ۹۰-۱۸۰nm حاوی غلظت‌های متفاوت از کراتین با موفقیت تولید شدند. با افزایش غلظت کراتین در داربست‌های نانولیفی اثر ممانعتی در برابر باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli* (ATCC8793) و گرم مثبت *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) به مقدار قابل توجهی ارتقا یافت. با حضور کراتین عدم سمیت سلولی داربست‌ها در مقایسه با نمونه شاهد به مقدار ۲۱٪ افزایش نشان داد. نتیجه‌گیری: ماده ارزشمند کراتین با روش قلیایی از منبعی اقتصادی استخراج گردید. در کنار خصوصیات ذاتی و اثبات شده کراتین نظیر سازگاری با پوست انسان، داربست‌های حاوی این ماده خصوصیات ضد میکروبی و عدم سمیت سلولی ارتقا یافته‌ای از خود نشان دادند که باعث می‌شود بعنوان کاندیدی بالقوه جهت کاربری در زخم‌بندهای پیشرفته مطرح گردد.

واژگان کلیدی: داربست‌های نانولیفی، ضایعات موی انسانی، کراتین، الکتروریسی، زخم‌بند پیشرفته.

مقدمه

ویژه در مواد پایه زخم بندها بسیار مشهود است و تاکنون بسیاری از پلیمرهای طبیعی جهت تولید طیف گسترده‌ای از این گونه محصولات به کار رفته‌اند (۱-۳). علت این موضوع باز به خصوصیات ذاتی اینگونه پلیمرها برمی‌گردد، به عنوان مثال خواص آبدوستی آنها باعث جذب و نگهداری رطوبت و ترشحات زخم می‌گردد که می‌تواند شرایط ایده‌آلی از لحاظ دما و رطوبت برای درمان زخم ایجاد نمایند (۴-۶). در میان انواع مختلف پلیمرهای طبیعی مورد مصرف در پزشکی، پلی‌پپتایدها

خصوصیات ذاتی پلیمرهای طبیعی نظیر سازگاری آنها با بدن انسان باعث شده تا این گونه پلیمرها همواره به عنوان اولین گزینه‌ها جهت کاربردهای پزشکی مطرح باشند. این موضوع به

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، دانشکده فنی و مهندسی، رامین خواجوی (email: khajavi@azad.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۴/۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۸/۴

بقیای مواد نظیر سدیم دو دسیل سولفات (SDS)، گوآنیدینوم کلرید (GdmCl)، چربی و آلودگی می‌تواند روی واکنش‌های محلول استخراج تاثیر گذارد و نتایج آنالیز پروتئین‌ها را مخدوش نماید (۲۲،۲۳)، موها توسط مخلوط اتانول و صابون در دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت چربی‌زدایی شدند (۱۶). مقدار ۱۰ گرم از موی چربی‌زدایی شده در داخل ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول قلیایی (۱ wt.% NaOH) ریخته شد و به مدت ۴۸ ساعت تحت دمای ۵۰ درجه سانتی-گراد در حمام بن ماری قرار داده شد. سپس محلول داخل بشر از کاغذ صافی عبور داده شد و توسط اسید استیک (۹۹/۵٪) خنثی گردید و تحت دور ۵۰۰۰ rpm و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ گردید. فاز جامد جدا شده جمع‌آوری و در آن (دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت) خشک گردید و به عنوان پروتئین استخراج شده در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. الکتروفورز ماده استخراج شده (SDS-PAGE; 13.5% slab gel) به روش Laemmli (۲۴) انجام گرفت. مقدار ۲۵ میکرولیتر از پروتئین استخراج شده که تقریباً حاوی ۵۰ میکرولیتر پروتئین بود، به چاهک‌های الکتروفورز با ژل بالایی حاوی ۳/۷۵٪ آکرلامید - بیس آکرلامید و ژل پایینی حاوی ۱۲٪ آکرلامید-بیس آکرلامید منتقل شد. ابعاد ژل ۱۴۰×۱۱۰×۱ میلی‌متر مکعب، زمان الکتروفورز ۳ ساعت (تا رسیدن رنگ بروموفنل بلو به لبه پایینی ژل) و شدت جریان ۳۰ mA انتخاب گردید و در دستگاه PROTEIN 11 xi SLABGEL (شرکت BIO-RAD) انجام پذیرفت. پس از بیرون آوردن ژل از شیشه‌های الکتروفورز با محلول حاوی ۰/۱ گرم رنگ کوماسی بلو (R-250 Coomassie brilliant blue)، ۱۰٪ اسید استیک خالص و ۴۰٪ متانول به مدت ۱۲ ساعت رنگ‌بری شد.

تولید داربست‌های نانولیفی

ابتدا محلول پایه ریسندگی با حل کردن (wt/wt) ۷٪ از پلی‌وینیل‌الکل (SigmaAldrich, MW=30,000_70,000) در آب مقطر، دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت تهیه شد. نانو ذرات نقره (SigmaAldrich, <100 nm, surface area~5.0m²/g) به عنوان ماده ضد باکتری پایه و با غلظت ۱۰۰۰ ppm به محلول پایه ریسندگی اضافه گردید (۲۷-۲۵). غلظت‌های متفاوت از کراتین در محلول هیدروکسید سدیم (۱ wt.% NaOH) تحت دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تهیه شدند و به محلول‌های ریسندگی افزوده

نظیر کلاژن (۷)، ژلاتین (۸) و کراتین (۹-۱۲) به طور گسترده‌ای جهت مراقبت از زخم‌ها و در مهندسی بافت استفاده شده‌اند. کراتین دسته‌ای از پروتئین‌های فیبری شکل حاوی آمینو اسیدهای گوگرددار است. زنجیره‌های مولکولی کراتین پیوندهای عرضی قدرتمندی را با یکدیگر از طریق باندهای دی سولفیدی ایجاد می‌کنند و بدین وسیله خصوصیات مکانیکی مناسبی را در ساختار لیفی شکل ایجاد می‌نمایند (۱۳). با توجه به مزایای زیست‌سازگاری، خواص فیزیکی و مکانیکی و فراوانی طبیعی، محصولات کراتینی تحولی بزرگ در زمینه بیومواد در جهان ایجاد نموده‌اند (۱۴).

۶۵-۹۵٪ از وزن موی انسانی از پروتئین تشکیل شده است که غالب آن (حدود ۸۰٪) از نوع پروتئین کراتین است (۱۹-۱۵). تا کنون در زمینه استخراج این ماده از موی انسانی و تبدیل آن به ساختار داربستی نانو الیفی به ویژه جهت کاربرد در زخم بندهای پیشرفته تحقیقات محدودی منتشر شده است. هیرو و همکارانش در سال (۲۰۰۵) موفق شدند با در آمیختن کراتین موی انسانی با محلول آبی ژلان، کایتوزان و اسید استیک تولید الیف هیبریدی نمایند (۲۰). در پژوهشی دیگر، ورما و همکارانش در سال (۲۰۰۸) موفق به ایجاد شبکه‌ای از پروتئین‌های موی انسانی جهت استفاده در مهندسی بافت گردیدند (۲۱). در این تحقیق هدف آن بود که ابتدا ماده ارزشمند کراتین از ضایعات موی انسانی به عنوان منبعی اقتصادی استخراج و در نهایت به داربستی نانولیفی تبدیل گردد. جهت ایجاد خاصیت ضد میکروبی پایه در داربست‌ها از نانو ذرات نقره و جهت دستیابی به خصوصیات قابلیت تشکیل شبکه با غلظت‌های پایین کراتین از پلیمر پلی‌وینیل‌الکل به عنوان پلیمری کمکی بهره گرفته شد. با توجه به خصوصیات ذاتی و قابل انتظار این ماده انتظار می‌رفت که خصوصیات ضد میکروبی و سازگاری سلولی بهبود یافته‌ای در داربست‌های تولیدی حاصل گردد تا بتوان داربست تولیدی را جهت زخم بندهای پیشرفته پیشنهاد و معرفی نمود. خواص فوق‌الذکر توسط آزمون ضد میکروبی (AATCC100-2004) و آزمون MTT به صورت مستقیم (ISO10993-5) بررسی گردیدند.

مواد و روش‌ها

استخراج و الکتروفورز کراتین موی انسانی

موهای انسانی از نوجوانی مذکر (به صورت طبیعی قهوه‌ای رنگ و پس از رنگ‌زدایی "دکلره کردن") با طول ۱mm~ و قطر (ظرافت) ۶۰µm~ به دست آمدند. از آنجایی که وجود

گردیدند، به نحوی که چهار محلول ریسندگی با غلظت‌های کراتین محتوی (۰،۱،۵ و ۱۰ wt/wt/.) حاصل گردید. محلول ریسندگی با غلظت صفر درصد جهت تولید داربست شاهد مورد استفاده قرار گرفت. محلول‌ها توسط دستگاه الکترورسی (Spinner Model NF-C0 EN-II) تحت شرایط یکسان ولتاژ ۲۰ kV، فاصله ۱۵ سانتی‌متر و دبی تزریق ۱ ml/hr الکترورسی گردیدند و داربست‌های حاصله به صورت لایه از روی فویل‌های آلومینیومی جمع‌آوری شدند.

بررسی مورفولوژی

ساختار داربست‌های نانولیفی تولید شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل (FE-SEM -X L30, Philips-Holland) مشاهده شدند. برای این منظور دیسک‌هایی از داربست‌ها بریده و بر روی استب (Stab) چسبانده شدند و پس از پوشش با طلا در خلا در دو بزرگ‌نمایی ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ برابر و ولتاژهای یکسان (۱۵ kV) مشاهده و مورد بررسی قرار گرفتند (۲۸). ضخامت نانوالیاف تشکیل دهنده هر نمونه داربستی با نرم‌افزار Image اندازه‌گیری و میانگین ۲۰ بار تکرار برای هر نمونه گزارش گردید.

سنجش فعالیت ضد میکروبی

فعالیت ضد میکروبی داربست‌های تولیدی در برابر باکتری‌های گرم منفی (*E. coli* ATCC 8793) و گرم مثبت (*S. aureus* ATCC 6538) با پروسه آنتی‌بیوگرام دیسک دیفیوژن و همچنین بر اساس استاندارد (AATCC100) تعیین گردید (۲۹-۳۱). نمونه داربستی مورد نظر پس از قرار گرفتن در محیط کشت نوترینت آگار بمدت ۱ تا ۲ روز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد و پس از طی شدن زمان فوق میزان رشد باکتری در محیط کشت بررسی گردید. جهت ساخت محلول ۰/۵ مک فارلند، ۹/۹۵ میلی‌لیتر از محلول اسید سولفوریک ۱٪ و ۰/۰۵ میلی‌لیتر باریم کلراید ۱/۱۷۵٪ به آرامی با یکدیگر مخلوط شدند و درب لوله با پارافیلیم بسته گردید. باریم سولفات در نتیجه این واکنش رسوب کرد و کدورتی ایجاد نمود که جهت مقایسه غلظتی با سوسپانسیون‌های میکروبی به کار رفت. جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی به کمک آنس، ۳ تا ۴ کلونی خالص از کشت ۲۴ ساعته میکروب مورد نظر برداشته شد و در داخل لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل حل گردید تا کدورتی به اندازه کدورت لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند به دست آمد. سوآب استریل آغشته به سوسپانسیون میکروبی آب‌کشی گردید (فشار دادن سوآب به کناره لوله) و محیط‌های کشت به صورت چمنی (سه بار در حالت زاویه ۶۰ درجه)

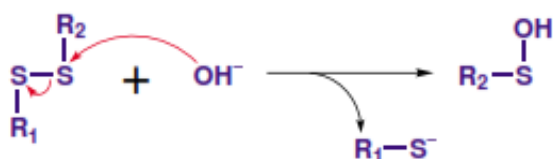
$$R\% = [(N_0 - N_t) / N_0] \times 100 \quad (1)$$

که در آن R میزان کاهش باکتری‌ها، N_t تعداد باکتری‌های داربست پس از ۲۴ ساعت و N_0 تعداد باکتری‌های داربست در زمان تماس صفر می‌باشند.

آزمون ارزیابی کمی سمیت MTT

این آزمایش مطابق با موارد مطرح شده در استاندارد ISO 10993-5 و به‌طور مستقیم (Direct) انجام شد (۳۳ و ۳۲). نوع سلول مصرفی در این آزمایش رده سلولی فیبروبلاست L929 (ATCC-NCTC 929) بود. شرایط کشت شامل انکوباتور حاوی گاز دی‌اکسید کربن ۵٪، رطوبت ۹۰٪ و دمای کشت ۳۷ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. پلیت کشت سلولی نیز به عنوان شاهد منفی (عدم پاسخ سمیت سلولی) از شرکت Orange انتخاب گردید. برای بررسی میزان تکثیر سلولی از آزمون دی‌متیل تیازول دی‌فنیل تترازولیوم بروماید (MTT) استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا تعداد مشخص سلول بر روی سطح هر نمونه کشت داده شد. در این آزمون بر روی هر نمونه تعداد 1×10^4 سلول بر روی هر نمونه درون پلیت کشت سلولی ۲۴ چاهکی ریخته شد. پس از گذشت سه ساعت سلول‌ها بر روی نمونه‌ها می‌چسبند و می‌توان محیط کشت را اضافه نمود تا سطح کل نمونه پوشانده شود. همین روند به‌طور مشابه برای نمونه شاهد در نظر گرفته شد. پس از گذشت مدت زمان مشخص (سه روز) از شروع کشت سلولی، محیط کشت خارج شد و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول (Sigma) MTT (Chemical Co., St. Louis, MO, USA) با غلظت ۰/۵ mg/ml به هر چاهک وارد شد. پس از گذشت ۴ ساعت محلول روی سلول‌ها خارج شد و ایزوپروپانل به آن‌ها اضافه گردید تا بلورهای بنفش رنگ ایجاد شده حل شود. سپس مقدار غلظت ماده حل شده در ایزوپروپانل در طول موج ۵۴۵ nm با دستگاه ELISA reader StatFax 2000 ساخت آمریکا محاسبه شد. چاهک دارای سلول‌های بیشتر چگالی نوری (OD) بالاتری نسبت به چاهک با سلول کمتر

جهت استخراج کراتین از مو معمولاً روشهای هیدروترمال در بخارهای با فشار بالا (۱۵-۱۰ psi) و یا در درجه حرارت‌های زیاد (۱۴۰-۸۰ درجه سانتی‌گراد) در حضور اسید (نظیر HCL، H₂SO₄، HCOOH) و یا قلیای مناسب (نظیر NaOH، Na₂SiO₃، K₂SiO₃) ارایه شده‌اند. انجام این گونه عملیات با اسید و یا قلیا بعد از مدتی مناسب منجر به باز شدن پیوندهای دی سولفیدی کراتین (شکل ۲) و تولید پلی پپتیدها، الیگو پپتیدها و حتی آمینو اسیدها می‌گردد. واکنش قلیا بر روی پیوندهای دی سولفیدی در شکل ۲ نشان داده شده است. در این گونه روش‌های هیدروترمالی پارامترهای فرآیندی نظیر فشار، درجه حرارت و pH در کیفیت و کمیت محصولات پپتیدی حاصله بسیار موثر است (۳۶،۳۷).



شکل ۲. هیدرولیز قلیای پیوند دی سولفیدی توسط قلیا (۳۸)

در این تحقیق، ارایه روش هیدروترمال با شرایطی تعدیل یافته نظیر کاهش دما و غلظت پایین قلیا به واسطه افزایش زمان بوده است. با توجه به تحقیقات دیگر محققان سه غلظت متفاوت از هیدروکسید سدیم (۱، ۵ و ۱۰ درصد وزنی) جهت استخراج کراتین از ضایعات موی انسان مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۱-۱۸). محلول یک درصد وزنی هیدروکسید سدیم نسبت به دیگر درصدها راندمان استخراجی بالاتری از خود نشان داد و از هر ۱۰ گرم موی انسانی در این غلظت مقدار ۳/۵۷ گرم کراتین به دست آمد. برتری این غلظت می‌تواند به نرخ هیدرولیز سطحی، اندازه مولکول‌های هیدراته شده و یا دیگر شرایط مربوط باشد که در بحث حاضر قرار نمی‌گیرد.

بعد از الکتروفورز، رنگ آمیزی ژل با کوماسی بریلیانت بلو R- 250 صورت پذیرفت (شکل ۳) و مقایسه با تحقیقات مشابه انجام گرفت (۳۴، ۳۹، ۴۰). در الکتروفورز پروتئین استخراج شده باند یک نمایانگر پروتئین‌های شاخص با اوزان مولکولی مختلف ۱۱، ۱۷، ۲۶، ۳۴، ۴۳، ۵۶، ۷۲، ۹۵، ۱۳۰ و ۱۷۰ کیلودالتون می‌باشند (Fermentas GmbH - St. Leon-Rot, Germany). باندهای دو الی چهار شامل پروتئین‌های استخراجی با غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ mg/ml می‌باشند. همان طور که در تصویر مشخص شده است هیچ گونه پروتئینی در باندهای ۲ و ۳ وجود ندارد، ولی در باند چهار با غلظت

نشان می‌دهد (۳۲،۳۳). بنابراین می‌توان از رابطه زیر چاهک دارای مقدار سلول بیشتر را مشخص کرد و با نمونه شاهد مقایسه نمود. آزمون MTT برای بررسی تکثیر سلول‌های کشت داده شده بر روی نمونه‌ها استفاده می‌شود تا بتوان معیاری از میزان زیست‌سازگاری نمونه‌ها به دست آورد. رنگ MTT در میتوکندری سلول‌های زنده از رنگ زرد به رنگ بنفش تغییر می‌یابد و غلظت رنگ معیاری از میزان سلول‌های زنده است. درصد سمیت سلولی و زنده ماندن سلول‌ها به شرح زیر محاسبه شد (روابط ۲ و ۳):

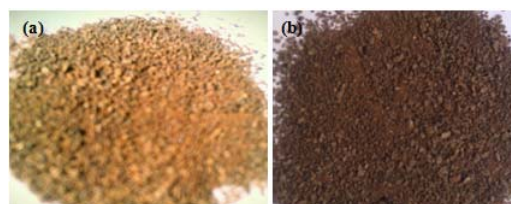
$$\text{Toxicity\%} = \left(1 - \frac{\text{mean OD of sample}}{\text{mean OD of control}}\right) \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Viability \%} = 100 - \text{Toxicity} \quad (3)$$

ارزیابی تصاویر سلول‌ها نیز به کمک میکروسکوپ نوری (Heepbago, Switzerland) انجام گرفت. برای این منظور نمونه‌ها به ترتیب پس از گذشت ۲۴ و ۷۲ ساعت از رشد سلولی در زیر میکروسکوپ قرار داده شدند و رشد سلولی آنها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

در شکل ۱ تصویر پودرهای استخراج شده از موی انسانی آورده شده است. برخلاف کراتین استخراج شده از پر مرغ، پودر پروتئین‌های استخراج شده دارای رنگی زرد تا قهوه‌ای است (۳۴). این موضوع می‌تواند مربوط به استخراج ملانین و یا هیدرولیز قلیایی اجتناب ناپذیر زنجیرهای پلیمری در مرحله استخراج باشد. شدت واکنش اکسیداسیون و رنگ حاصل به عوامل مختلفی نظیر غلظت محلول قلیایی، دما، زمان و نوع منبع پروتئین دارد (۳۵). بنابراین، رنگ کراتین استخراج شده از هر دو موی قهوه‌ای رنگ و دکلره شده بین رنگ‌های زرد تا قهوه‌ای بودند، به طوری که برای موی قهوه‌ای به علت وجود رنگدانه ملانین، قهوه‌ای سیر و برای موی دکلره زرد مایل به قهوه‌ای حاصل گردید (شکل ۱). توضیح آنکه جهت ادامه تحقیق صرفاً از کراتین استخراجی از موی قهوه‌ای استفاده گردید.



شکل ۱. پودر پروتئین استخراج شده از موی دکلره (a) و موی طبیعی (b)

۱۰ mg/ml از پروتئین، وجود پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۵۶-۶۵ kDa تایید می‌گردد (شکل ۳).

جدول ۲. خواص ضد میکروبی داربست‌های تولیدی در برابر باکتری‌های E.coli و S.aureuse (تعداد کلونی ها و قطر هاله عدم رشد)

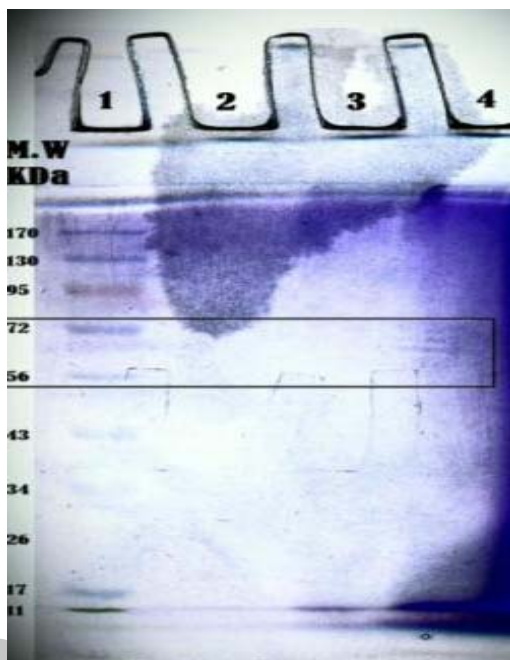
نوع داربست*		کاهش کلونی‌ها (%)		قطر هاله عدم رشد (mm)		اثر ضد میکروبی	
S.aureus	E.coli	S.aureus	E.coli	S.aureus	E.coli	S.aureus	E.coli
-	-	۰/۰	۰/۰	۴۶/۶	۲۰	-	-
+	+	۴/۰	۰/۵	۹۶/۴	۵۲/۴	+	+
+	+	۱۰/۰	۲/۰	۹۷/۸	۹۰/۶	+	+

* کلیه داربست‌ها شامل نانو ذرات نقره به مقدار یکسان (۱۰۰۰ ppm) هستند.

جدول ۳. درصد زنده ماندن سلول‌ها در داربست‌های تولید شده از طریق تست MTT

نوع داربست		کنترل + کنترل -		PVA +10% Keratin		PVA	
میانگین ۵ بار تکرار	۰/۵۴	۰/۷۰	۰/۷۴	۰/۷۰	۰/۰۲	۰/۷۴	۰/۷۴
سازگاری سلولی (%)	۷۲/۳۳	۹۳/۸۵	۱۰۰	۳/۰۹	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
سمیت (%)	۲۷/۶۷	۶/۱۵	۰	۹۶/۹۱	۰	۰	۰

قابلیت تحویل دارو و یا مواد آنتی باکتریال بسترهای کراتینی توجه محققان را به سمت خود جلب نموده است و در این زمینه مستندات ارایه گردیده است (۴۱،۳۴،۲۶). جدول ۲ میزان ضخامت قطر هاله عدم رشد، تعداد کلونی‌ها و میزان ممانعت در برابر باکتری را برای هر دو باکتری مورد آزمایش نشان می‌دهد. تعداد کلونی‌های E. coli در نمونه شاهد در حدود ۱۰۰ کلونی تخمین زده شده است که برای ۵ و ۱۰ درصد وزنی از کراتین به ترتیب به ۴۷۶ و ۹۶ کلونی کاهش می‌یابد. در شرایط مشابه برای باکتری S.aureus نیز تعداد کلونی‌ها به ترتیب به ۳۶ و ۲۲ کلونی تقلیل می‌یابد. جهت ایجاد ممانعت ضد میکروبی، نسبت تعداد کلونی‌های شمارش شده در هر پلیت به تعداد کلونی‌های شمارش شده در نمونه شاهد باید تفاوت معنی‌داری داشته باشد و به عبارتی باید در حدود ۵۰٪ تقلیل نشان دهد. با توجه به جدول ۲ ملاحظه گردید کلیه نمونه‌های داربستی حاوی کراتین ممانعت ضد میکروبی و تفاوت معنی‌دار از خود نشان دادند. هاله عدم رشد حاصله در نمونه‌های داربستی متفاوت در شکل ۵ نشان داده شده است. داربست‌ها با مقادیر کراتین بیشتر اثر ممانعتی بیشتری در برابر باکتری‌های گرم مثبت و منفی (E.coli and S.aureus) از خود نشان دادند. که تایید کننده نتایج جدول ۲ است. مشاهده می‌گردد (شکل ۵-b,c,e&f) که با ورود کراتین به شبکه رهایش نانو ذرات یا تاثیر ضد میکروبی کراتین انجام گرفته و با افزایش این مقدار غلظت پروتئین (شکل ۵-f)، هاله عدم رشد بیشتر شده است.



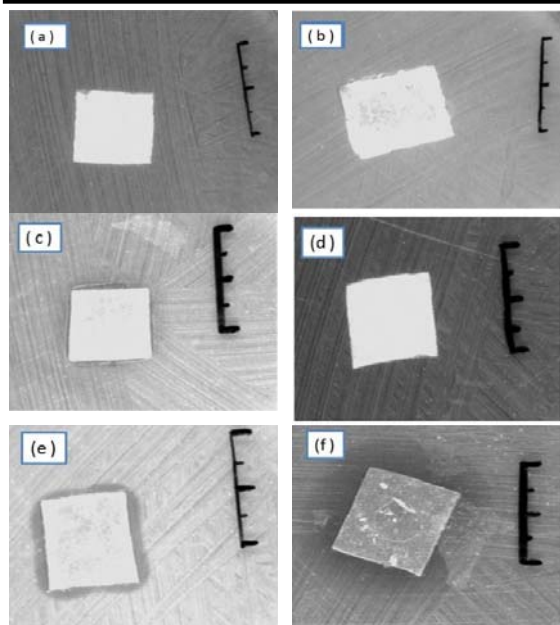
شکل ۳. الکتروفورز SDS-PAGE کراتین استخراج شده، باند یک پروتئین‌های شاخص با اوزان مولکولی مختلف باندهای دو الی چهار نمونه استخراج شده با غلظت ۱، ۵ و ۱۰ پروتئین.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی داربست‌های نانولیفی الکترونی در شکل ۴ نشان دهنده تشکیل موفقیت آمیز داربستی متخلخل و سه بعدی از نانو الیاف است. در تصاویر مشهود است که با وارد شدن کراتین به داربست دانه‌هایی (Beads) پدیدار می‌گردند و با افزایش غلظت آن شکل دانه‌ها از حالت دوکی به کروی تغییر یافتند (شکل ۴ a-d). میانگین ظرافت نانوالیاف تشکیل دهنده هر نمونه داربستی تولیدی در جدول ۱ آورده شده است که در محدوده ۹۰-۱۸۰ nm قرار دارد.

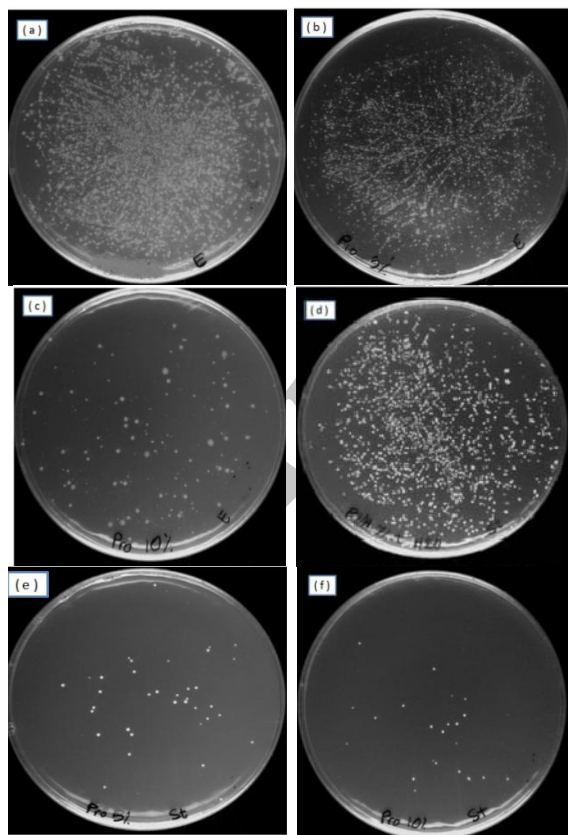
جدول ۱. میانگین ضخامت (ظرافت) نانو الیاف تشکیل دهنده داربست‌های تولیدی.

مواد تشکیل دهنده داربست*	PVA نمونه شاهد	PVA +5% Keratin	PVA +1% Keratin	PVA +10% Keratin
میانگین ظرافت نانو الیاف [†]	۱۸۰/۵۷۲	۱۲۷/۵۵۹	۱۰۴/۷۵۹	۹۰/۰۱۶

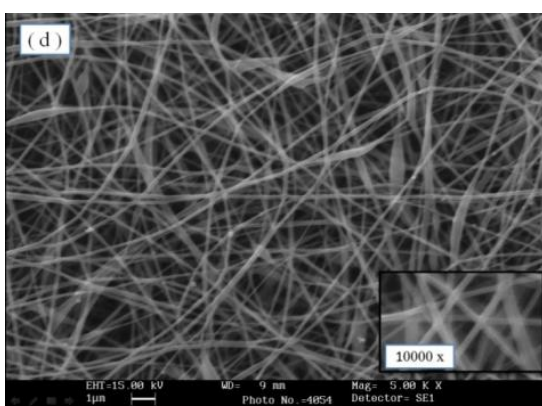
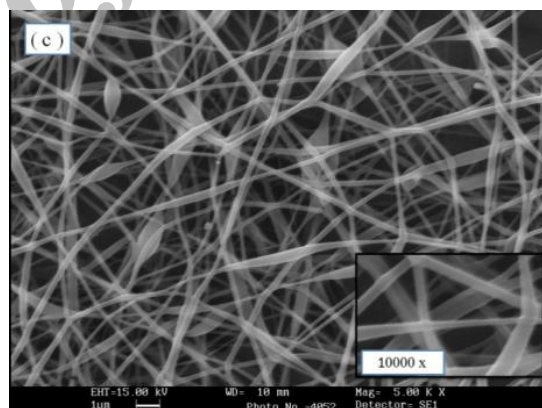
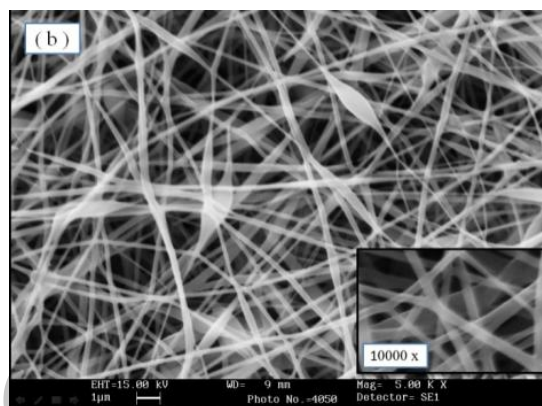
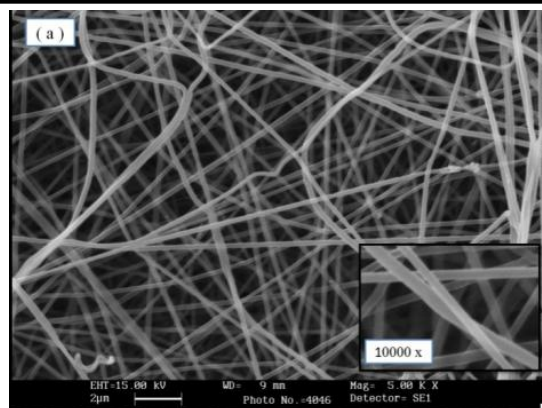
* کلیه داربست‌ها شامل نانو ذرات نقره به مقدار یکسان (۱۰۰۰ ppm) هستند.[‡] توسط نرم افزار Image J بیست لیف از هر تصویر اندازه‌گیری و میانگین گزارش شده است.



شکل ۵. هاله عدم رشد داربست‌های نانولیفی در برابر باکتری‌های *E. coli* :a-c و *S. aureus* :d-e و PVA+a&d، PVA+5% Keratin :b&e. PVA+10% Keratin :c&f. کلیه داربست‌ها شامل نانو ذرات نقره به مقدار یکسان (۱۰۰۰ ppm) هستند.



شکل ۶. نتایج ضد میکروبی داربست‌ها در برابر باکتری‌های *E. coli* :a-c و *S. aureus* :d-f و PVA+a&d، PVA+5% Keratin :b&e. PVA+10% Keratin :c&f. کلیه داربست‌ها شامل نانو ذرات نقره به مقدار یکسان (۱۰۰۰ ppm) هستند.

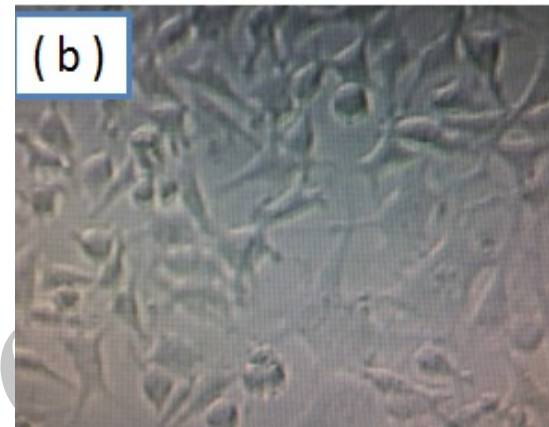


شکل ۴. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست‌های نانولیفی. a: PVA، b: PVA+1% Keratin، c: PVA+5% Keratin، d: PVA+10% Keratin

این موضوع برای محصول ارائه شده نیز بررسی گردید و درصد زنده ماندن سلول‌ها از طریق آزمون MTT (با ۵ تکرار) تخمین زده شد که نتایج آن در جدول ۳ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهند که میزان زنده ماندن سلول‌ها در داربست حاوی ۱۰٪ کراتین بیش از ۹۰٪ است که در مقایسه با داربست فاقد کراتین تفاوت معنی‌داری دارد. زیست‌سازگاری داربست‌های تولید شده در شکل ۷ بیانگر میزان رشد سلول فیبروبلاست L929 بر روی داربست حاوی ۱۰٪ کراتین پس از گذشت مدت زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت می‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان رشد سلول‌ها طی مدت زمان ۳ روز افزایش یافت.

بحث

در این تحقیق پلیمر ارزشمند کراتین از منبعی اقتصادی که ضایعات موی انسانی بود به روشی ساده استخراج گردید. با توجه به خواص ذاتی این پلیمر نظیر سازگاری با بدن انسان از آن در تولید داربستی نانولیفی بهره گرفته شد. داربست‌های نانولیفی دارای کراتین خواص ضد میکروبی فزاینده‌ای در برابر باکتری‌های گرم منفی (E. Coli) و گرم مثبت (S. aureus) در مقایسه با داربست‌های صرفاً حاوی نانو ذرات نقره از خود نشان دادند که می‌تواند باعث کاهش تسهیل شده به واسطه کاهش دانسیته پیوندهای هیدروژنی و یا وجود اسیدهای آمینه گوگرددار و یا هم‌افزایی این دو عامل با یکدیگر باشد. ورود کراتین به داربست باعث افزایش سازگاری سلولی گردید. بنابراین با در نظر گرفتن پتانسیل بالقوه کراتین و اقتصادی بودن منبع استخراج آن، اثرات ضد میکروبی و سازگاری سلولی ارتقا یافته، داربست‌های حاصله می‌توانند جهت عملکردهای پزشکی به ویژه تولید زخم بندهای پیشرفته مورد نظر قرار گیرند. البته لازم به ذکر است که برآورد قطعی زیست‌سازگاری و عملکرد واقعی یک سیستم نانویی باید همراه با مطالعه در بررسی‌های درون تنی باشد.



شکل ۷. تصاویر میکروسکوپ نوری رشد سلول فیبروبلاست L929 بر روی داربست حاوی ۱۰٪ کراتین. (a) پس از ۲۴ ساعت (b) پس از ۷۲ ساعت.

نتایج خواص ضد میکروبی بر اساس استاندارد AATCC 100 نیز تایید کننده نتایج تعداد کلونی‌ها و قطرهای عدم رشد بودند (شکل ۶). در این مورد نیز با افزایش در کراتین موجود در داربست‌ها، خواص ضد میکروبی در برابر باکتری‌های گرم منفی (E. Coli) و گرم مثبت (S. aureus) ارتقا یافت. کراتین به عنوان بستری مناسب جهت کاربردهای پزشکی مطرح شده است که یکی از مهم‌ترین دلایل وفاق و سازگاری با بدن و سلول‌ها می‌باشد که این موضوع در تحقیقات مورد آزمون و به اثبات رسیده است (۱۴،۴۱،۳۴).

REFERENCES

1. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Deliv* 2007; 59:207-33.
2. Sell SA, Wolfe PS, Garg K, McCool JM, Rodriguez IA, Bowlin GL. The use of natural polymers in tissue engineering: A focus on electrospun extracellular matrix analogues. *Polymers* 2010;2:522-53.
3. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci* 2008;97:2892-23.
4. Mortimer D. Moist wound dressings and pressure relieving surfaces, The Centre for Health Program Evaluation (CHPE). Available at www.buseco.monash.edu.au/centres/che/pubs/wp104.pdf. (Accessed: July 2013)

5. Helfman T, Ovington L, Falanga V. Occlusive dressings and wound healing. *Clin Dermatol* 1994;12:121-27.
6. Bradley M, Cullum N, Nelson EA, Peticrew M, Sheldon T, Torgerson D. Systematic reviews of wound care management: (2). Dressings and topical agents used in the healing of chronic wounds. *Health Technol Assess* 1999;3:1-143.
7. Boccafoschi F, Habermehl J, Vesentini S, Mantovani D. Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26:7410-17.
8. Huang Y, Onyeri S, Siewe M, Moshfeghian A, Madihally SV. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2005;26: 7616-27.
9. Katoha K, Shibayamac M, Tanabea T, Yamauchia K. Preparation and physic chemical properties of compression-molded keratin films. *Biomaterials* 2004; 25: 2265-72.
10. Sierpinski P, Garrett J, Ma J, Apel P, Klorig D, Smith T, Koman LA, et al. The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves. *Biomaterials* 2008;29:118-28.
11. Tachibana A, Furuta Y, Takeshima H, Tanabe T, Yamauchi K. Fabrication of wool keratin sponge scaffolds for long-term cell cultivation. *J Biotechnol* 2002;93:165-70.
12. Tachibana A, Kaneko S, Tanabe T, Yamauchi K. Rapid fabrication of keratin-hydroxyapatite hybrid sponges toward osteoblast cultivation and differentiation. *Biomaterials* 2005; 26:297-302.
13. Sen J. Human hair in personal identification and documenting drug and substance abuse. *Anthropologist* 2010; 12: 47-58.
14. Rouse JG, van Dyke ME. A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. *Materials* 2010; 3: 999-1014.
15. Menkart J, Wotfram LJ, Mao I. Caucasian hair, Negrohair, and wool: Similarities and differences. *J Soc Cosmetic Chemists* 1966;17:769-87.
16. Nakamura AM, Arimoto K, Takeuchi K, Fujii K. A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated Species, *Boil Pharm Bull* 2002;25:569-72.
17. Areida SK, Ismail MF, AbdelHady EK, Osman AO. Molecular characterization of haircuticle and its extracted proteins In seven mammalian species. *Egyptian Journal of Hospital Medicine* 2006;23:287-308.
18. Fujii T, Nakai K, Kikuta H, Kobayashi S, Hirai T. Preparation and properties of protein particles from human hair. *J Boil Macromol* 2006; 6:30-35.
19. Han MO, Chun JA, Lee WH, Lee JW, Chung CH. A simple improved method for protein extraction from human head hairs. *J Cosmet Sci* 2007;58:527-34.
20. Hirao Y, Ohkawa K, Yamamoto H, Fujii T. A novel human hair protein fiber prepared by watery hybridization spinning. *Macromolecular Material and Engineering* 2005; 290:165-71.
21. Verma V, Verma P, Ray P, Ray A. Preparation of scaffolds from human hair proteins for tissue-engineering applications. *Biomed Mater* 2008; 3:025007.
22. Yamauchi K, Yamauchi Asao, Kusuunoki T, Kohda A, Konishi Y. Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physiochemical and biodegradational properties of films. *J Biomed Mater Res* 1996;31:439-44.
23. Steinert P, Zackroff R, Martha Aynardi-Whitman MA, Goldman RD. Chapter 24 Isolation and characterization of intermediate filaments. *Methods Cell Biol* 1982;24:399-419.
24. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-85.
25. Khajavi R, Abbasipour M. Electro spinning as a versatile method for fabricating coreshell, hollow and porous nanofibers. *Scientia Iranica* 2012;19: 2029 -34.
26. Lichou W, Yu D, Yang M. The preparation and characterization of silver-loading cellulose acetate hollow fiber membrane for water treatment. *Polymer for Advanced Technologies* 2005;16:600-607.
27. Gaidau G, Petica A, Ciobanu C, Martinescu T. Investigations on antimicrobial activity of collagen and keratin based materials doped with silver nanoparticles. *Romanian Biotechnological Letters* 2009;14:4665-72.
28. Khajavi R, Atlasi A, Yazdanshenas ME. Alkali treatment of cotton yarns with ultra-sonic bath. *Textile Research Journal* 2013;83:827-35.

29. Damerchely R, Yazdanshenas ME, Rashidi AS, Khajavi R. Morphology and mechanical properties of antibacterial nylon 6/nano-silver nano-composite multifilament yarns. *Textile Research Journal* 2011; 81:1694-701.
30. Khajavi R, Sirmohammadi Bahadoran MM, Bahador A, Khosravi A. Removal of microbes and air pollutants passing through nonwoven polypropylene filters by activated carbon and nanosilver colloidal layers. *Journal of Industrial Textiles* 2013; 42: 219-30.
31. AATCC Test Method 100-2004. Assessment of antibacterial finishes on textile materials: AATCC Technical Manual. Research Triangle Park, NC: American Association of Textile Chemists and Colorists; 2005.
32. Bonakdar SH, Shahriar Hojjati Emami SH, Shokrgozar MA, Farhadi A, Seyed Amir Hoshidar Ahmadi SA, Amanzadeh A. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol hydrogels crosslinked by biodegradable polyurethane for tissue engineering of cartilage. *Material and engineering and chemistry C* 2010;30:636-43.
33. Homaeigohar SSh, Shokrgozar MA, Sadi AY, Khavandi A, Javadpour J, Hosseinalipour M. In vitro evaluation of biocompatibility of beta-tricalcium phosphate-Reinforced High-Density polyethylene; an orthopedic Composite. *J Biomed Mater Res A* 2005; 75:14-22.
34. Yin X CH, Li F Y, Fenghe Y, Wang Y, Wang R M. Study on Effective Extraction of Chicken Feather Keratins and Their Films for Controlling Drug Release. *Electronic Supplementary Material (ESI) for Biomaterials Science* 2013; 1:528-36.
35. Serra JA. Constitution of hair melanins. *Nature* 1946;157:771-71.
36. Karthikeyan R, Balaji S, Sehgal PK. Industrial application of keratin– a review. *Journal of Scientific and Industrial Research* 2007;66:710-15.
37. Mokrejs P, Krejci O, Svoboda P. Producing keratin hydrolysates from sheep wool. *Oriental Journal of Chemistry* 2011;27:1303-309.
38. Hogg PJ. Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem Sci* 2003;28:210-14.
39. Langbein L, Rogers M A, Winter H, Praetzel S, Schweizer J. The catalog of human hair keratins II. Expression Of the six type II members in the hair follicle and the combined catalog of human type I and II keratins. *J Biol Chem* 2001; 276: 35123-32.
40. Lusiana, Reichl S, Müller-Goymann CC. Keratin film made of human hair as a nail plate model for studying drug permeation. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;78:432-40.
41. Meng H. Development of human hair keratin biomaterials for antibiotic delivery in treatment of acute bacterial infections [MSc Dissertation]. Miami: Miami University; 2013.