Archive of SID

ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3):373-380

A Study on Biofilm Formation, Antibacterial Properties and Cell Viability of Poly (ε-Caprolactone)-Based Electrospun Nanofibrous Scaffold

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Peimaneh Abedi Mohtasab T.[1] *MSc,*
Tamjid E.*[2] *PhD,*
Haji-Hosseini R.[3] *PhD*

How to cite this article
Peimaneh Abedi Mohtasab T, Tamjid E, Haji-Hosseini R. A Study on Biofilm Formation, Antibacterial Properties and Cell Viability of Poly (ε-Caprolactone)-Based Electrospun Nanofibrous Scaffold. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3):373-380.

[1]Micribial Biotechnology Department, Basic Sciences Faculty, Payame Noor University, Tehran, Iran
[2]Nanobiotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3]Biochemistry Department, Basic Sciences Faculty, Payame Noor University, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116
Phone: +98 (21) 82884746
Fax: +98 (21) 82884717
tamjid@modares.ac.ir

Article History
Received: August 1, 2018
Accepted: July 5, 2018
ePublished: September 21, 2019

ABSTRACT

Aims Recently, polymer-based nanofibrous scaffolds have attracted great attention due to their significant antibacterial properties in the field of dermatological applications. In this study, a polycaprolactone-based nanofibrous scaffold has been fabricated using the electrospinning method. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of electrospun nanofibrous structures.

Materials and Methods In this experimental study, the structure and bacterial attachment on polymeric nanofibrous scaffolds were studied by Scanning Electron Microscopy (SEM). In addition, antibacterial properties of nanofibrous scaffolds were studied on two gram-negative bacteria of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa and two gram-positive bacteria of Staphylococcus aureus and Streptococcus mutans, using microdilution method and biofilm assay. Moreover, MTT assay was performed on HeLa and human fibrosarcoma cell line (HT1080) cancerous cell lines to evaluate the cell viability.

Findings The results of this study showed that nanofibrous scaffold revealed a significant antimicrobial and anti-biofilm formation effect on all of the studied bacterial strains, but in microscopic observations and microdilution assay was observed on Pseudomonas aeruginosa in 1mg/ml of nanofibrous scaffold extract concentration, while the major effect in biofilm assay was observed in 8µg/ml of extract concentration. Moreover, the cell viability studies showed that the most significant effect was shown on HT1080 cell line which has drastically decreased by 40% after 48 hours in comparison with the control.

Conclusion These results show that electrospun nanofibrous PCL-based scaffolds are potentially promising for dermal tissue engineering applications, due to anti-biofilm effects and capability of reducing the number of cancerous cells in the wound site.

Keywords Nanofibrous Scaffolds; Poly (ε-caprolactone); Antibacterial; Biofilm Formation; Cytotoxicity; Electrospinning

CITATION LINKS

[1] Biodegradable polymeric scaffolds. Improvements in bone tissue ... [2] Preparation of natural 3D scaffolds for tissue engineering studies [3] Electrospun poly (L-lactide)/poly (ε-caprolactone) blend nanofibrous ... [4] An improved hydrophilicity via electrospinning for enhanced cell attachment and proliferation [5] An improved hydrophilicity via electrospinning for enhanced cell attachment and ... [6] Effect of interface on mechanical properties and biodegradation of PCL HAp ... [7] Cell attachment and viability study of PCL nano-fiber modified by cold ... [8] Antimicrobial properties and osteogenicity of vancomycin-loaded synthetic ... [9] Antimicrobial formulations of absorbable bone substitute materials ... [10] Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three- ... [11] Star poly (ε-caprolactone)-based electrospun fibers as biocompatible scaffold ... [12] Minimum inhibitory concentration of vancomycin in Staphylococcus aureus ... [13] Disk diffusion antimicrobial susceptibility testing for clinical and ... [14] Comparison of broth microdilution, E test, and agar dilution methods for antibiotic ... [15] Optimization of tetrazolium salt assay for Pseudomonas aeruginosa biofilm using ... [16] Cell sensitivity assays: the MTT ... [17] Antimicrobial effects of nanofiber poly (caprolactone) tissue ... [18] Characterization, drug loading and antibacterial activity ... [19] Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on ... [20] Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation ... [21] Effects of selenium compounds on proliferation, migration and ... [22] Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa ... [23] Effect of cerium lanthanide on Hela and MCF-7 cancer ... [24] Cytotoxic evaluation of doxorubicin in combination with... [25] HeLa cells 50 years on: The good, the bad and the ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه تشکیل بیوفیلم، خواص ضدباکتریایی و سمیت سلولی داربست نانوالیافی پلی‌کاپرولاکتونی الکتروریسی‌شده

ترانه پیمانه‌عابدی‌محتسب MSc
گروه زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
الناز تمجید* PhD
گروه ریز زیست‌فناوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
رضا حاجی‌حسینی PhD
گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده

اهداف: در سال‌های اخیر داربست‌های نانوالیافی زمینه پلیمری به‌دلیل اثرات ضدمیکروبی در مهندسی بافت پوست مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. هدف از این پژوهش تولید و مشخصه‌یابی خواص آنتی‌باکتریال داربست‌های نانوالیافی زمینه پلیمری است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر داربست نانوالیافی پلی‌کاپرولاکتون به روش الکتروریسی ساخته شد. بررسی‌های ریزساختاری و مطالعات چسبندگی باکتریایی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی صورت گرفت. برای انجام آزمون‌های ضدباکتریایی از آزمون‌های میکرودایلوشن و تشکیل بیوفیلم بر سویه‌های استاندارد گرم منفی *اشرشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا*، گرم مثبت *استرپتوکوکوس موتانس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و برای مطالعه سمیت سلولی از آزمون MTT بر سلول‌های سرطانی رده هلا و HT1080 استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج این پژوهش نشان داد که این داربست نانوالیافی خواص ضدباکتریایی و ضدتشکیل بیوفیلم بر همه سویه‌ها دارد اما در مشاهدات میکروسکوپ الکترونی و آزمون میکرودایلوشن بیشترین اثر بر سویه *سودوموناس آئروژینوزا* و در غلظت یک‌میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره داربست نانوالیافی مشاهده شده، اما در آزمون تشکیل بیوفیلم بیشترین اثر بر سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* و در غلظت ۸میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره حاصل شد. همچنین نتایج آزمون‌های سمیت‌سنجی سلولی نیز نشان داد که عصاره داربست‌های سنتزشده روی سلول‌های سرطانی فیبروبلاست انسانی (HT1080) اثرات سمی بیشتری داشته و پس از ٤٨ساعت منجر به کاهشی در حدود ۴۰% تعداد آنها می‌شود.

نتیجه‌گیری: داربست‌های نانوالیافی پلی‌کاپرولاکتون تولیدشده به روش الکتروریسی، بالقوه می‌توانند گزینه امیدبخشی در کاربردهای مهندسی بافت پوست با قابلیت جلوگیری از تشکیل بیوفیلم در محل ترمیم زخم و نیز کاهش تعداد سلول‌های سرطانی باشند.

کلیدواژه‌ها: داربست نانوالیافی، پلی‌کاپرولاکتون، ضدباکتریایی، تشکیل بیوفیلم، زنده‌مانی، الکتروریسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۱۴
*نویسنده مسئول: *tamjid@modares.ac.ir

مقدمه

امروزه مهندسی بافت به‌عنوان یک روش درمانی جدید برای ترمیم بافت با استفاده از بیومواد پلیمری یا کامپوزیتی به‌همراه سلول یا بدون آنها مورد توجه فراوان است[1]. یکی از اهداف مهندسی بافت تولید داربست پلیمری با ساختاری سه‌بعدی برای پیوند عضو است[2]. در سلول‌های زنده، ماتریس خارج سلولی نقش موثری بر کنترل رفتار سلول‌ها دارد[3]، بنابراین داربست باید از نظر ساختار فیزیکی طوری طراحی شود تا این نقش را در مهندسی بافت ایفا کند. همچنین داربست‌های نانوفیبری مناسب باید چسبندگی سلولی خوب داشته و باعث تکثیر سلول‌ها شوند. روش‌های مختلفی وجود دارد که یکی از پرکاربردترین آنها استفاده از روش الکتروریسی است که در سال‌های اخیر برای ساخت نانوالیاف بیوکامپوزیتی در کاربردهای مهندسی پزشکی پوست مورد توجه زیادی قرار گرفته است[3-7]. برای مثال ترکیبات مختلفی از پلیمرهای سنتزی و طبیعی با این روش قابل تولید هستند که قابلیت بهبود چسبندگی سلول‌ها و تخریب‌پذیری نانوالیاف را دارند[4]. از میان نانوالیاف الکتروریسی‌شده، نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون می‌تواند خصوصیاتی را که مورد علاقه برای کاربردهای پزشکی است، فراهم کند[5]. پلی‌کاپرولاکتون یک پلیمر آب‌گریز خطی نیمه‌کریستالی با فرمول مولکولی $(C_6H_{10}O_2)_n$ است که به‌عنوان یک پلی‌استر زیست‌سازگار مورد تایید سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) قرار گرفته و به دلایلی از قبیل زیست‌تخریب‌پذیری و ارزان‌بودن برای انواع مختلف داربست، ایمپلنت‌های زیستی، سامانه‌های رهایش کنترل‌شده دارو، نخ‌های بخیه و بسته‌بندی مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین خصوصیات مکانیکی فوق‌العاده، آنتی‌ژنیسیته پایین، فرآیندپذیری ساده و آسان، نقطه ذوب پایین (۶۰°C) و غیرسمی‌بودن محصولات حاصل از تخریب از مزایای دیگر آن است. اگرچه این پلیمر به‌دلیل آب‌دوستی کم، توانایی کمی در چسبندگی، مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولی از خود نشان می‌دهد، با ترکیب خصوصیات عالی ذاتی پلی‌کاپرولاکتون با خصوصیات منحصربه‌فرد ساختار نانوالیافی و مزیت‌هایی چون درصد تخلخل بالا و نرخ سطح به حجم بالا که باعث افزایش برهم‌کنش‌های سلول- زیست‌ماده می‌شود، یک ماده امیدبخش برای کاربردهای پزشکی فراهم می‌شود که جایگزین مناسبی برای شبیه‌سازی ماتریس خارج سلولی طبیعی بوده و قابلیت کاربرد برای بازسازی انواع بافت‌های سخت و نرم بدن را دارد[6]. شایان ذکر است اندازه تخلخل و داشتن ساختار سه‌بعدی یک غشای نانوالیافی تقلیدی از ماتریس خارج سلولی طبیعی است که می‌تواند چسبندگی، رشد، تکثیر و تمایز سلولی را بهبود ببخشد[7]. علاوه بر عوامل ساختاری، عفونت‌های میکروبی و تشکیل بیوفیلم در موضع زخم نیز در روند ترمیم بافت از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. به همین دلیل در سال‌های اخیر توجه پژوهشگران به توسعه داربست‌های مهندسی بافت با خواص ضدباکتریایی معطوف شده است[1]. در همین راستا انواع داروهای آنتی‌بیوتیکی شامل ونکومایسین[8]، جنتامایسین و توبرامایسین[9]، تتراسایکین و هیدروکلراید[10] به این منظور مورد استفاده قرار گرفته‌اند. از سوی دیگر به‌دلیل آن که بسیاری از زخم‌های مرتبط با جراحی‌های پوست مستعد تکثیر سلول‌های سرطانی هستند، افزودن داروهای ضدسرطانی از جمله دکسوروبیسین[11] نیز یکی از علاقمندی‌های پژوهشی در سال‌های اخیر بوده است. این پژوهش‌ها نشان دادند

www.SID.ir

Archive of SID

که نانوالیاف می‌توانند به‌عنوان ایمپلنت با قابلیت رهایش دارو در طولانی‌مدت مورد استفاده قرار گرفته و از پیشرفت مقاومت دارویی در درمان سرطان به‌علت رهایش کنترل‌نشده داروهای ضدسرطان در روش‌های متداول جلوگیری نمایند[11]. اگرچه در این مطالعات داربست‌های الیافی پلی‌کاپرولاکتون به‌عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفته‌اند، اما قطر الیاف مورد مطالعه در این گزارش‌ها همواره در محدوده میکرومتری و بالاتر بوده‌اند. در سال ۲۰۱۲ مطالعاتی روی اثر الیاف نانومتری بر چسبندگی باکتری‌ها انجام شده است. الیاف مورد مطالعه در پژوهش مزبور در محدوده ۳۰۰نانومتر تا بالاتر از میکرون بوده‌اند. علی‌رغم اهمیت سطح ویژه در خواص الیاف الکتروریسی شده، تاکنون پژوهشی روی نانوالیاف با قطر کمتر از ۱۰۰نانومتر انجام نشده است. به علاوه مطالعات گذشته همواره معطوف به مشاهدات میکروسکوپی و نیز آزمون‌های خواص ضدباکتریایی بوده‌اند اما علی‌رغم اهمیت تشکیل بیوفیلم در ترمیم زخم تاکنون هیچ پژوهشی بر تشکیل بیوفیلم روی نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتونی به روش الکتروریسی انجام نشده است. بر این اساس در تحقیق حاضر، داربست نانوالیافی پلی‌کاپرولاکتون به روش الکتروریسی طراحی و سنتز شد. ارزیابی فعالیت‌های ضدباکتریایی و ضدبیوفیلم و نیز رشد و زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست انسانی رده HT1080 و سلول‌های سرطانی هلا، در مجاورت عصاره‌های داربست‌های الکتروریسی‌شده فوق مورد بررسی قرار گرفت. همچنین میزان چسبندگی باکتری بر نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتونی توسط مشاهدات میکروسکوپ الکترونی با هدف کاربرد برای زخم‌پوش‌های پوست با خواص ضدباکتریایی و ضدسرطانی مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

الکتروریسی داربست‌های نانوالیافی: برای ساخت داربست به روش الکتروریسی، ابتدا حلال با ترکیبی از کلروفروم (سیگما؛ آلمان) و متانول (سیگما؛ آلمان) با نسبت حجمی به‌ترتیب ۳ به ۱ تهیه شد. سپس گرانول‌های PCL (با جرم مولکولی ۸۰۰۰۰؛ سیگما؛ آلمان) به حلال اضافه و با استفاده از هم‌زن مغناطیسی به‌مدت یک‌ساعت با سرعت ۴۰۰دور بر دقیقه مخلوط شدند تا محلول یکنواخت و شفافی حاصل شود. محلول حاصل برای انجام فرآیند الکتروریسی بلافاصله به داخل سرنگ کشیده شد. برای تولید نانوالیاف از دستگاه الکتروریسی مدل ES1000 (فناوران نانومقیاس؛ ایران) بهره گرفته شد و با توجه به مطالعات قبلی[4-6] فرآیند الکتروریسی با پارامترهای ذکرشده در جدول ۱، صورت گرفت. به‌منظور دست‌یابی به ضخامت ۳۰میکرومتر حجم تزریق یک‌میلی‌لیتر در نظر گرفته شد و نمونه‌ها پس از اتمام الکتروریسی به‌منظور خروج کامل حلال مدتی زیر هود شیمیایی روشن باقی ماندند و سپس به داخل دسیکاتور منتقل شدند تا خشک شده و در معرض آلودگی نباشند.

مشاهدات میکروسکوپ الکترونی روبشی: به‌منظور بررسی ساختار نانوالیاف و نیز ارزیابی شکل و مورفولوژی سلول‌های کشت‌شده روی داربست‌های نانوفیبری تهیه‌شده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM مدل XL30 شرکت (فیلیپس؛ ایالات متحده آمریکا) استفاده شد. برای مشاهده اتصال باکتری‌ها به نانوالیاف، داربست‌های حاوی باکتری در گلوتارآلدهید ۲% به‌مدت ۲ساعت تثبیت و سپس با سری غلظتی اتانول (از ۵۰ تا ۱۰۰%) آب‌گیری شدند. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ‌های الکترونی روبشی مدل XL30 (فیلیپس؛ ایالات متحده آمریکا) تصویربرداری شد.

جدول ۱) پارامترهای مورد استفاده در فرآیند الکتروریسی نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون

پارامتر	مقدار
ولتاژ	۱۸کیلوولت
فاصله نوک سوزن تا درام	۱۵سانتی‌متر
نرخ تزریق	یک‌میلی‌لیتر بر ساعت
شماره سوزن	۲۳
سرعت چرخش درام	۲۰۰rpm
سرعت چرخش درام	۱۰۰۰میلی‌متر بر دقیقه

مطالعه خواص ضدباکتریایی: نمونه‌های مورد استفاده در آزمون‌های ضدباکتریایی به‌صورت عصاره‌گیری تهیه شدند. به این ترتیب که ۵۰میلی‌گرم از هر نمونه در شرایط استریل (در مجاورت دو شعله و زیر هود لامینار) به لوله‌های فالکون استریل حاوی ۵۰ و ۲۰۰سی‌سی PBS استریل اضافه و به‌مدت ۲۴ساعت در دمای اتاق روی شیکر هم‌زده شد. سپس عصاره حاصل برای تست‌های ضدباکتریایی به کار رفت. در این پژوهش برای انجام آزمون‌های ضدباکتریایی از سویه‌های استاندارد *اشرشیا کلی* (ATCC ۲۵۹۲۲)، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC۲۷۸۵۳)، *استرپتوکوکوس موتانس* (ATCC۱۶۸۳) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC۲۵۹۲۳) استفاده شد. تهیه محیط کشت مولرهینتون‌آگار طبق دستورالعمل کارخانه سازنده (مرک؛ آلمان) و داخل پلیت‌های ۱۰سانتی‌متری با حداکثر عمق ۴میلی‌متر انجام شد. به‌منظور بررسی آلودگی محیط‌های ساخته‌شده پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ساعت داخل انکوباتور قرار گرفتند. نگهداری محیط‌ها در یخچال تا حداکثر یک هفته قبل از کشت انجام شد.

آزمون‌های تعیین خاصیت ضدمیکروبی به روش میکرودایلوشن (رقیق‌سازی در لوله): در این پژوهش برای تعیین خاصیت ضدمیکروبی از روش میکرودایلوشن (رقیق‌سازی در لوله) در محیط مولرهینتون‌براث استفاده شد. از مولرهینتون‌براث به‌عنوان رقیق‌کننده و از نمونه حاوی پادتن سیپروفلوکساسین ۵میکروگرم (پادتن‌طب؛ ایران) به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. کشت تازه سویه‌های باکتری و تهیه ۲میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی در لوله‌های شیشه‌ای و انتقال باکتری با سواب استریل به این لوله‌ها انجام شد. شایان ذکر است سوسپانسیون اولیه باکتری با کدورت معادل ۰/۵مک‌فارلند تهیه شد که در این سوسپانسیون به اندازه ۱۵۰میلیون باکتری در هر میلی‌لیتر وجود دارد[12]. به این ترتیب که با ایجاد رقت‌های سریالی عصاره از اولین تا چاهک یازدهم محدوده غلظت

www.SID.ir

Archive of SID

را ایجاد کرده و در چاهک دوازدهم به‌عنوان کنترل (غلظت صفر) هیچ عصاره‌ای اضافه نشد. سپس در هر ۱۲ چاهک ۱۰میکرولیتر از باکتری که با کدورت نیم‌مک‌فارلند تهیه شده بود اضافه نموده و در آخر میکروپلیت ۹۶خانه در دمای ۳۷°C به‌مدت ۲۴ساعت انکوبه‌گذاری شد. پس از طی زمان فوق با استفاده از دستگاه الایزا ریدر مقدار جذب در طول موج ۶۲۰ قرائت و نتایج با درج انحراف‌معیار ترسیم شد[13, 14].

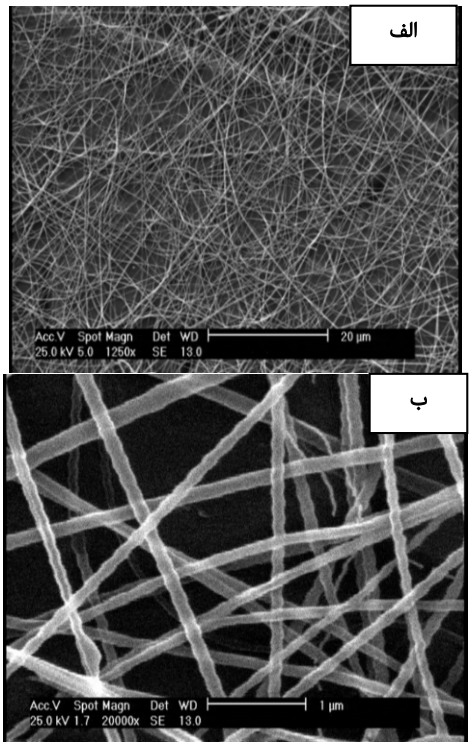
تست تشکیل بیوفیلم (Biofilm Assay): این آزمون به روش میکروتیتر پلیت از طریق رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله و اندازه‌گیری جذب نوری به طریق زیر انجام شد:

ابتدا در پلیت ۹۶خانه در هر چاهک ۱۰۰میکرولیتر محیط LB حاوی ۱٪ سوکروز ریخته و سپس از عصاره تهیه‌شده از داربست‌ها به چاهک اول ۱۰۰میکرولیتر اضافه شد و به‌ترتیب ۱۰۰میکرولیتر از چاهک اول برداشته و به چاهک دوم اضافه کرده تا چاهک دهم و به این ترتیب رقت‌های مختلف تهیه شد و در چاهک ۱۲ هیچ نمونه‌ای از عصاره وارد نشد و به‌عنوان کنترل مثبت و یک چاهک هم فقط محیط کشت به‌عنوان کنترل منفی اعمال شد. سپس به هر چاهک ۱۰میکرولیتر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* با غلظت نیم‌مک‌فارلند اضافه و ۲۴ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه‌گذاری شدند. پس از زمان انکوبه‌گذاری محیط چاهک‌ها را خالی نموده و سپس سه‌بار با PBS شسته، به آن ۲۵۰میکرولیتر کریستال ویوله اضافه و بعد از گذشت ۴۵دقیقه قرارگیری در یک مکان ثابت رنگ تخلیه و سپس دوبار با الکل ۹۶٪ شست‌وشو داده شد. برای بار سوم الکل ۹۶٪ را اضافه نموده و با دستگاه الایزاریدر جذب نوری در طول موج ۵۷۰نانومتر قرائت شد. شایان ذکر است در این روش مقادیر OD کمتر نشان‌دهنده جلوگیری بیشتر از تشکیل بیوفیلم است[15].

کشت سلول و بررسی سمیت سلولی: از آزمون MTT برای بررسی میزان سمیت سلولی داربست‌ها به روش عصاره‌گیری استفاده شد[16]. برای عصاره‌گیری از داربست‌های نانوالیافی در ابتدا عمل استریل‌کردن داربست‌ها در اتانول ۹۷٪ صورت گرفت و سپس نمونه‌های تهیه در پلیت‌های ۴۸خانه‌ای قرار گرفته و ۵۰۰میکرولیتر بافر فیزیولوژیPBS به هر کدام از نمونه‌ها اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت ۷۲ساعت در دمای ۳۷°C با دور ۵۰rpm هم‌زده شدند. سپس ۲۰میکرولیتر از این عصاره‌ها برای انجام آزمون در هر بازه زمانی مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه سلول‌های سرطانی دهانه رحم انسانی رده هلا با کد ™ATCC® CCL-2 و فیبروبلاست انسانی رده HT1080 با کد ™ATCC®. CCL121 (انستیتوپاستور؛ ایران) مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌های رده هلا در محیط کشت DMEM با ۱۰٪ FBS و رده HT1080 در محیط RPMI با ۱۰٪ FBS، در انکوباتور با دمای ۳۷°C، رطوبت ۹۵٪ و دی‌اکسیدکربن ۵٪ نگهداری شدند. به‌منظور پاساژدهی هر دو رده سلولی از تریپسین (۰/۲۵٪) استفاده و سپس سانتریفیوژ و کشت در پلیت کشت انجام شد. برای انجام آزمون MTT تعداد 10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه کشت شده و پس از ۲۴ساعت با غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰نانوگرم در میلی‌لیتر از عصاره‌ها تیمار شده و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ساعت انکوبه شدند. سلول‌های هر دو رده بدون تیمار کشت داده شده و به‌عنوان گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. میزان زنده‌ماندن سلول‌ها در مجاورت هر عصاره با سه‌بار تکرار توسط انکوباسیون با MTT به‌مدت ۴ساعت و سپس افزودن اسیدایزوپروپانول ارزیابی و میزان جذب در ۵۷۰نانومتر با استفاده از دستگاه الایزاریدر مدل elx808 (بیوتک؛ ایالات متحده آمریکا) ثبت شد. مقادیر جذب نسبت به مقادیر جذب گروه‌های شاهد نرماله‌شده و براساس میانگین و با احتساب انحراف‌معیار با استفاده از نرم‌افزار Mini Tab 18 گزارش شد.

یافته‌ها

مشخصه‌یابی مورفولوژی نانوالیاف الکتروریسی‌شده: میکروسکوپ الکترونی روبشی برای مشاهده و بررسی سطح داربست‌های الکتروریسی‌شده به کار رفت. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده، داربست‌ها ساختاری نانوالیافی داشته و توزیع قطر الیاف یکنواخت و حدود ۱۰۰-۲۰۰نانومتر است. همچنین هیچ‌گونه ناپایداری و گره در ساختار نانوالیاف مشاهده نمی‌شود.



شکل ۱) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست‌های نانوالیافی الکتروریسی‌شده پلی‌کاپرولاکتون در بزرگ‌نمایی‌های (الف) ۵۰۰۰ و (ب) ۳۰۰۰۰ برابر

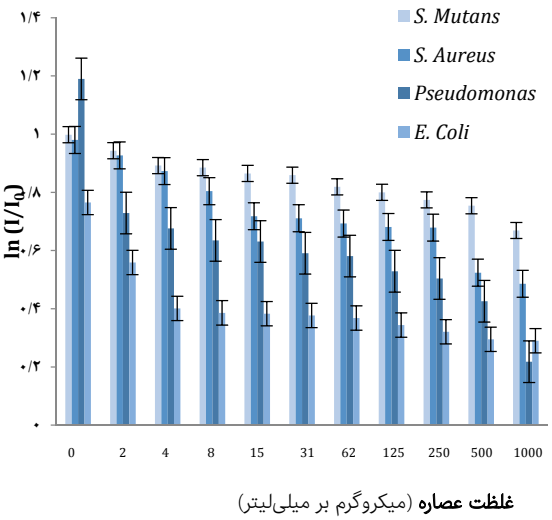
آزمون‌های ضدباکتریایی

تعیین اثر عصاره داربست نانوالیافی بر بازدارندگی رشد باکتری به روش میکرودایلوشن: نتایج مطالعه خواص ضدباکتریایی عصاره‌های تهیه‌شده از داربست نانوالیافی پلی‌کاپرولاکتون الکتروریسی‌شده بر چهار سویه *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استرپتوکوکوس*

www.SID.ir

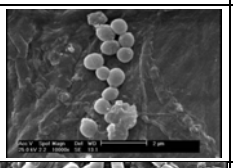
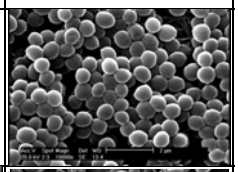
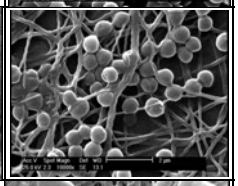
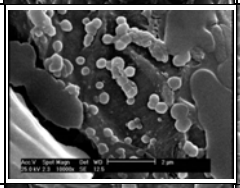
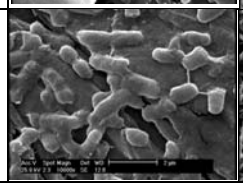
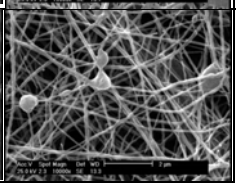
Archive of SID

موتانس و *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط آزمون میکرودایلوشن در نمودار ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود اثر بازدارنده رشد در هر چهار سویه باکتری مشاهده شد که این نتایج توسط آنالیز واریانس و آزمون توکی در نرم‌افزار MINI TAB 18 در محدوده $p<0/05$ معنی‌دار بود. به‌طوری که در سویه‌های گرم منفی شامل *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشرشیا کلی* اثر کشندگی داشته که به وضوح قابل مشاهده است، حال آن که بر باکتری‌های گرم مثبت شامل *استرپتوکوکوس موتانس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* تنها در کاهش رشد باکتری موثر بوده است.



نمودار ۱) فعالیت ضدباکتریایی عصاره نانوالیاف الکتروریسی‌شده پلی‌کاپرولاکتون بر چهار سویه باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، سودوموناس، و *اشرشیا کلی* در آزمون میکرودایلوشن در طول موج ۶۲۰نانومتر ($p<0/05$)

مشاهدات میکروسکوپ الکترون روبشی تشکیل بیوفیلم روی داربست نانوالیافی: تعیین میزان و مورفولوژی اتصالات هر چهار سویه باکتری مورد مطالعه روی داربست نانوالیافی پلی‌کاپرولاکتون با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی در شکل ۲ نشان می‌دهد که نانوالیاف الکتروریسی‌شده پلی‌کاپرولاکتون روی باکتری‌های گرم منفی و مثبت اثرات متفاوتی داشته است. اثرات مهار تشکیل بیوفیلم بر باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* مشهود نیست. فقط این داربست توانسته است اثر کمی بر تعداد باکتری‌ها گذاشته و از تعداد باکتری‌های گرم مثبت *استرپتوکوکوس موتانس* بکاهد. اثرات مهار تشکیل بیوفیلم روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* مشهود نیست فقط این نانوداربست توانسته بر تعداد باکتری‌ها اثرگذار باشد که نشان‌دهنده اثرات کمتر این داربست بر کاهش تعداد باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* است. مهارکنندگی رشد روی باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* کاملاً قابل توجه است یعنی این داربست توانست اثر مهارکنندگی بر تعداد باکتری‌های فوق بگذارد و از تعداد باکتری‌های گرم منفی *اشرشیا کلی* بکاهد. چنان که مشاهده می‌شود اثرات مهار تشکیل بیوفیلم روی باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* کاملاً مشهود است یعنی این داربست توانست اثر کاملاً مهارکنندگی بر باکتری‌های فوق گذاشته و از رشد باکتری‌های گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* جلوگیری کند.

زیرلایه کشت / سویه باکتری	دیسک بلانک	داربست نانوالیافی
استرپتوکوکوس موتانس		
استافیلوکوکوس اورئوس		
اشرشیا کلی		
سودوموناس آئروژنوزا		

شکل ۲) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی چهار سویه باکتری‌های *استرپتوکوکوس موتانس*، *سودوموناس آئروژنوزا*، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* روی: دیسک بلانک (ستون چپ) و داربست نانوالیافی پلی‌کاپرولاکتون (ستون راست)

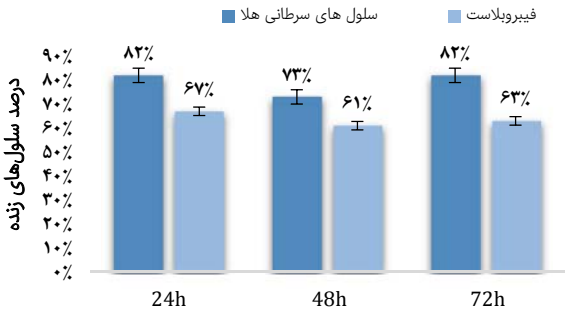
تعیین اثر عصاره داربست نانوالیافی بر تشکیل بیوفیلم: آزمون تشکیل بیوفیلم در حضور غلظت‌های مختلف عصاره داربست نانوالیافی بر دو سویه مختلف باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان تشکیل بیوفیلم در واحد سطح برای سویه‌های مختلف، مقادیر متفاوتی داشته به‌طوری که فعالیت ضدبیوفیلم داربست‌های نانوالیافی پلی‌کاپرولاکتون نشان می‌دهد که اثر مهاری توسط داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون و عدم تشکیل بیوفیلم در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از *اشرشیا کلی* بود. تجزیه و تحلیل کمی از مهار بیوفیلم در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان می‌دهد که بیشترین تاثیر بر عدم تشکیل بیوفیلم *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌ترتیب در غلظت‌های ۲۵۰ و ۸ از عصاره نانوداربست پلی‌کاپرولاکتونی حاصل شده است.

بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌ها به‌وسیله آنالیز MTT: نمودار ۲ نتایج آزمون زنده‌مانی بر دو رده سلول سرطانی شامل هلا و HT1080 را در تماس با عصاره داربست‌های نانوالیافی نشان

www.SID.ir

Archive of SID

می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، میزان زنده‌مانی سلول‌های هلا در مجاورت عصاره داربست‌های نانوالیافی در مدت ۷۲ساعت بین ۸۲ تا ۷۳% بوده است که نشان‌دهنده عدم تاثیر قابل توجه عصاره‌ها بر سلول‌های هلا است. نکته قابل توجه در نتایج این آزمون، اختلاف معنی‌دار میزان زنده‌مانی دو رده سلولی است. زیرا برخلاف سلول‌های هلا، تعداد سلول‌های سرطانی فیبروبلاست انسانی (HT1080) در تیمار با عصاره نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون، در ۲۴ساعت اول کشت به میزان قابل توجهی کاهش یافته و پس از ۷۲ساعت درصد سلول‌های زنده حدود ۴۰% کاهش داشته است. در واقع تیمار با عصاره نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون در بازه‌های زمانی یکسان، بیشترین تاثیر را بر سلول‌های سرطانی فیبروبلاست نشان داده است.

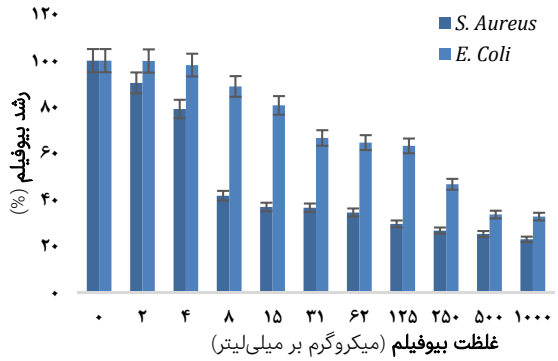


نمودار ۲) میزان زنده‌ماندن سلول‌های سرطانی هلا و HT1080 در تیمار با عصاره نانوالیاف الکتروریسی‌شده پلی‌کاپرولاکتون پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ساعت، نتایج در مقایسه با تعداد سلول‌های نمونه کنترل نرماله شده و به‌صورت درصد گزارش شده‌اند.

بحث

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی در این مطالعه، آنالیز داده‌های تست میکرودایلوشن را تایید نموده و نشان می‌دهد که نانوداربست‌های پلی‌کاپرولاکتون روی باکتری‌های گرم منفی اثرات مهار رشد به‌ویژه روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* که یک آلودگی مهم در عفونت‌های بیمارستانی است، دارد. پژوهش حاضر با نتایج مطالعه *روخ* و همکاران در ۲۰۱۲ [17] تفاوت معنی‌داری دارد به‌طوری که تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی تفاوت‌های قابل توجهی بین رشد بیوفیلم باکتری در داربست‌های با پلی‌کاپرولاکتون و بدون آن را نشان داد. اثرات ضدمیکروبی پلی‌کاپرولاکتون بر هر دو گونه باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* در تحقیق مزبور جمعیت متراکمی را تشکیل می‌دهند، حال آن که در پژوهش حاضر چسبندگی باکتری‌ها به‌شدت کاهش یافته است. با مقایسه قطر الیاف به نظر می‌رسد این کاهش ناشی از قطر نانومتری الیاف در پژوهش حاضر باشد. مقایسه داربست‌های پلی‌کاپرولاکتونی خالص با نمونه‌های حاوی دارو در آن پژوهش نشان داد که جمعیت متراکمی از باکتری‌ها روی داربست‌های فاقد دارو تشکیل شده است. حال آن که در پژوهش حاضر داربست‌های نانوالیافی فاقد دارو به میزان قابل توجهی قادر به کنترل چسبندگی *سودوموناس آئروژینوزا* بوده‌اند. همچنین مشاهدات *حسان* و همکاران در ۲۰۱۷ که روی خصوصیات، بارگذاری و رهایش دارو و فعالیت ضدباکتری غشای الکتروریسی‌شده نانوهیدروکسی‌آپاتیت/پلی‌کاپرولاکتون مطالعه نموده بودند، نتایج مشابهی را ارایه داده به‌طوری که ثابت شد این نانوالیاف دارای خواص ضدباکتریایی بوده و رهایش دارو از آنها بیشتر و موثرتر است[18]. شایان ذکر است در پژوهش مزبور حداقل غلظت بازدارنده نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون در برابر گونه‌های باکتری مقاوم در برابر چندین داروی مقاوم مثل *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌طور معنی‌داری کمتر از دیگر باکتری‌ها بوده است.

از سوی دیگر پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که ارتباط مستقیمی بین اتصال باکتری و تشکیل بیوفیلم وجود ندارد و اگرچه اتصال باکتری به سطح به‌عنوان یک مرحله اولیه برای تشکیل بیوفیلم مطرح است، اما این بدان معنا نیست که اتصال باکتری‌های بیشتر، الزاماً به تشکیل لایه ضخیم‌تری از بیوفیلم منجر خواهد شد. به عبارت بهتر تشکیل بیوفیلم بیش از آن که به تعداد باکتری‌های متصل به سطح وابسته باشد تابع میزان میانکنش باکتری‌ها و اتصال آنها با یکدیگر[19] و سیگنال‌رسانی‌های ناشی از فاکتورهای تنشی است[20]. به این ترتیب به نظر می‌رسد اگرچه از نظر کیفی براساس مشاهدات میکروسکوپ الکترونی (شکل ۲)، اتصال باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* به سطح داربست نانوالیافی در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی *اشرشیا کلی* اندکی بیشتر یا تقریباً مشابه بوده است، اما با بررسی آنالیز کمی (نمودار ۳) به نظر می‌رسد که قرارگیری در معرض عصاره داربست نانوالیافی، تشکیل بیوفیلم باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را بیش از بیوفیلم *اشرشیا کلی* مهار کرده است، به‌طوری که در مورد بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس*، تشکیل بیوفیلم در معرض عصاره با غلظت ۸میکروگرم در میلی‌لیتر، به کمتر از ۴۰% رسیده حال آن که برای کاهش بیوفیلم به میزان مشابه در باکتری *اشرشیا کلی*، غلظت ۵۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر لازم است.



نمودار ۳) آزمون تشکیل بیوفیلم در تیمار با عصاره نانوالیاف الکتروریسی‌شده پلی‌کاپرولاکتون بر باکتری *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* (در طول موج ۵۷۰نانومتر)، نتایج در مقایسه با بیوفیلم تشکیل‌شده بر نمونه کنترل که فاقد عصاره بوده نرماله شده و به‌صورت درصد گزارش شده‌اند ($p<0/001$).

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج تست MTT نیز نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان دو گروه بررسی‌شونده سلول‌های سرطانی انسانی است. در این مطالعه مشاهده شد که تیمار با نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون، تعداد سلول‌های سرطانی فیبروبلاست انسانی را در ۲۴ساعت اول کشت کاهش می‌دهد و بیشترین تاثیر را در ۴۸ساعت بعد از کشت و تیمار با نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون داشت. در مقایسه تاثیر این نانوالیاف بر سلول‌های کشت‌شده سرطانی هلا تغییر محسوسی در ۲۴ساعت اول تیمار نشان نداده ولی در ۴۸ساعت بعد از تیمار اثرات خوبی را نشان می‌دهد. در واقع بسته به میزان غلظت عصاره نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون بیشترین تاثیر بر سلول‌های سرطانی را می‌توان در ۴۸ساعت پس از قرارگیری با تیمار مشاهده نمود که نیاز به بررسی‌های بیشتری با غلظت عصاره بیشتر دارد. نتایج این بررسی با مشاهدات *بالاکریشنا* و همکاران سال ۲۰۱۸ که روی نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون الکتروریسی‌شده با دوکسوروبیسین با فعالیت طولانی‌مدت دارو انجام‌شده تطابق دارد[11]. پس از ۷۲ساعت میزان زنده‌مانی سلول‌های هلا مجدداً افزایش می‌یابد که در تطابق با نتایج گزارش‌شده قبلی است[21-24] که به نظر می‌رسد ناشی از سرعت بسیار بالای رشد این رده سلولی و نامیرایی آن است[24, 25]. به این ترتیب به نظر می‌رسد علی‌رغم مرگ تعداد قابل توجهی از سلول‌ها در بازه ۴۸ساعت و رسیدن تعداد سلول‌های زنده به ۷۳%، همان میزان سلول باقی‌مانده نیز با سرعت تکثیر بسیار بالا پس از ۷۲ساعت جمعیت قابل توجهی خواهند داشت. اما نکته شایان توجه آن است که علی‌رغم آن که این رده سلولی دارای زمان دوبرابرشدن ۲۴ساعت است انتظار می‌رود که در صورت عدم تیمار تعداد سلول‌های زنده در ساعت ۷۲، جمعیت سلول‌های زنده به دوبرابر ساعت ۴۸ یعنی ۱۱۳% برسد، حال آن که تعداد سلول‌های زنده تیمارشده با عصاره رقیقی از نانوالیاف بدون تغییر فاحش باقی‌مانده که این نتیجه نشان‌دهنده اثر قابل توجه عصاره بر مهار رشد این رده سلولی است.

محدودیت مطالعه حاضر استفاده از عصاره نانوالیاف برای آزمون‌های سلولی بود که در صورت انجام آزمون به‌صورت مستقیم می‌توان اثرات ساختار نانوالیافی بر کشت سلول‌ها را نیز مورد مطالعه قرار داد. در مطالعات آینده، در نظر است آزمون‌های برون‌تنی علاوه بر رده‌های سرطانی، بر رده‌های نرمال پوست نیز انجام شود. همچنین می‌توان با انجام آزمون‌های درون‌تنی از زیست‌سازگاری زخم‌پوش‌های بر پایه نانوالیاف مورد مطالعه در این پژوهش برای کاربردهای بالینی اطمینان حاصل نمود.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتونی الکتروریسی‌شده بالقوه می‌تواند گزینه مناسبی برای زخم‌پوش‌های با قابلیت ترمیم زخم و مهندسی بافت باشد. این نانوالیاف پلیمری زیست‌تخریب‌پذیر خواص ضدباکتریایی مواد را بهبود داده‌اند اما بر سویه‌های مختلف میزان اثر متفاوتی داشته‌اند به‌طوری که در مشاهدات میکروسکوپ الکترونی و آزمون میکرودایلوشن بیشترین اثر بر سویه *سودوموناس آئروژینوزا* و در غلظت یک‌میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره داربست نانوالیافی مشاهده شد، اما در آزمون تشکیل بیوفیلم بیشترین اثر بر سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* و در غلظت ۸میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره حاصل شده است. همچنین نتایج آزمون‌های سمیت‌سنجی سلولی نیز نشان داد که این زخم‌پوش‌ها می‌توانند مانع از رشد سلول‌های سرطانی خصوصاً سلول‌های سرطانی فیبروبلاست انسانی در مدت‌زمان ۴۸ساعت شده و تعداد آنها را حدود ۴۰ کاهش دهند. به این ترتیب به نظر می‌رسد زخم‌پوش‌های نانوالیافی الکتروریسی‌شده می‌توانند گزینه امیدبخشی در کاربردهای مهندسی بافت با قابلیت جلوگیری از تشکیل بیوفیلم در محل ترمیم زخم و کاهش تعداد سلول‌های سرطانی پوست باشند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله از معاونت‌های محترم پژوهشی دانشگاه‌های تربیت‌مدرس و پیام‌نور تهران شرق برای ارایه خدمات و تجهیزات آزمایشگاهی سپاسگزاری می‌نمایند.

تاییدیه‌اخلاقی: در این پژوهش هیچ‌گونه نمونه‌گیری یا آزمونی بر انسان و حیوان یا مواد با منشا انسانی یا حیوانی انجام نشده است. رده‌های سلولی مورد استفاده در این پژوهش استاندارد بوده و از انستیتو پاستور ایران خریداری شده‌اند.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: ترانه پیمانه‌عابدی‌محتسب (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۴۵%)؛ الناز تمجید (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۵%)؛ رضا حاجی‌حسینی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰%)

منابع مالی: این پژوهش فاقد حمایت توسط منابع مالی خارج از دانشگاه بوده است.

منابع

1- Holland TA, Mikos, AG. Biodegradable polymeric scaffolds. Improvements in bone tissue engineering through controlled drug delivery. In: Scheper T, Lee K, Kaplan D, editors. Tissue engineering I. Berlin, Heidelberg: Springer; 2006. p. 161-85.

2- Mahdavi Shahri N, Shahabipour F, Moghaddam Matin M, Tavassoli A, Fereidooni M, Moghimi A, et al. Preparation of natural 3D scaffolds for tissue engineering studies. 16th National Conference and 4th International Conference on Biology of Iran; 2010 Sep 14-16; Ferdowsi University of Mashhad - Iranian Association for Biology, Mashhad, Iran. [Persian]

3- Chen L, Bai Y, Liao G, Peng E, Wu B, Wang Y, Xie X. Electrospun poly (L-lactide)/poly (ε-caprolactone) blend nanofibrous scaffold: characterization and biocompatibility with human adipose-derived stem cells. PLoS One. 2013;26;8(8):e71265.

www.SID.ir

Archive of SID

dilution methods for antibiotic susceptibility testing of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. J Clin Microbiol. 2003;41(3);1062-8.
15- Sabaeifard P, Abdi-Ali A, Soudi MR, Dinarvand R. Optimization of tetrazolium salt assay for Pseudomonas aeruginosa biofilm using microtiter plate method. J Microbiol Methods. 2014;105:134-40.
16- Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods Mol Biol. 2011;731:237-45.
17- Ruckh TT, Oldinski RA, Carroll DA, Mikhova K, Bryers JD, Popat KC. Antimicrobial effects of nanofiber poly (caprolactone) tissue scaffolds releasing rifampicin. J Mater Sci Mater Med. 2012;23(6):1411-20.
18- Hassan MI, Sultana N. Characterization, drug loading and antibacterial activity of nanohydroxyapatite/polycaprolactone (nHA/PCL) electrospun membrane. 3 Biotech. 2017;7(4):249.
19- Cerca N, Pier GB, Vilanova M, Oliveira R, Azeredo J. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of Staphylococcus epidermidis. Res Microbiol. 2005;156(4):506-14.
20- Ali Mirani Z, Fatima A, Urooj S, Aziz M, Khan M, Abbas T. Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, and Escherichia coli. Iran J Basic Med Sci. 2018;21(7):760-9.
21- Sun L, Lu J, Wang Q, Liu Y, Han F, Yang Y, et al. [Effects of selenium compounds on proliferation, migration and adhesion of HeLa cells]. Wei Sheng Yan Jiu. 2015;44(2):276-8.
22- Luo H, Wang F, Bai Y, Chen T, Zheng W. Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa and MDA-MB-231 cells through induction of S phase arrest. Colloids Surf B Biointerfaces. 2012;94:304-8.
23- Palizban AA, Sadeghi-Aliabadi H, Abdollahpour F. Effect of cerium lanthanide on Hela and MCF-7 cancer cell growth in the presence of transferring. Res Pharm Sci. 2010;5(2):119-25.
24- Sadeghi-Aliabadi H, Minaiyan M, Dabestan A. Cytotoxic evaluation of doxorubicin in combination with simvastatin against human cancer cells. Res Pharm Sci. 2010;5(2):127-33.
25- Masters JR. HeLa cells 50 years on: The good, the bad and the ugly. Nat Rev Cancer. 2002;2(4):315-9.
4- Xu CY, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S. Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. Biomaterials. 2004;25(5):877-86.
5- Kim CH, Khil MS, Kim HY, Lee HU, Jahng KY. An improved hydrophilicity via electrospinning for enhanced cell attachment and proliferation. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater. 2006;78(2):283-90.
6- Shokrollahi P, Mehmanchi M, Atai M, Omidian H, Shokrolahi F. Effect of interface on mechanical properties and biodegradation of PCL HAp supramolecular nano-composites. J Mater Sci Mater Med. 2014;25(1):23-35.
7- Atyabi SM, Sharifi F, Irani S, Zandi M, Mivehchi H, Nagheh Z. Cell attachment and viability study of PCL nano-fiber modified by cold atmospheric plasma. Cell Biochem Biophys. 2016;74(2):181-90.
8- García-González CA, Barros J, Rey-Rico A, Redondo P, Gómez-Amoza JL, Concheiro A, et al. Antimicrobial properties and osteogenicity of vancomycin-loaded synthetic scaffolds obtained by supercritical foaming. ACS Appl Mater Interfaces. 2018;10(4):3349-60.
9- Pförringer D, Obermeier A, Kiokekli M, Büchner H, Vogt S, Stemberger A, et al. Antimicrobial formulations of absorbable bone substitute materials as drug carriers based on calcium sulfate. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(7):3897-905.
10- Mouriño V, Boccaccini AR. Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. J R Soc Interface. 2010;7(43):209-27.
11- Bala Balakrishnan P, Gardella L, Forouharshad M, Pellegrino T, Monticelli O. Star poly (ε-caprolactone)-based electrospun fibers as biocompatible scaffold for doxorubicin with prolonged drug release activity. Colloids Surf B Biointerfaces. 2018;161:488-96.
12- Saffari M, Jokar M, Shajary GR, Piroozmand A, Mousavi GA. Minimum inhibitory concentration of vancomycin in Staphylococcus aureus isolates collected from clinical samples of Shahid Beheshti hospital, kashan during 2009. Feyz J Kashan Univ Med Sci. 2010;14(3):234-41. [Persian]
13- Graham DR, Dixon RE, Hughes JM, Thornsberry C. Disk diffusion antimicrobial susceptibility testing for clinical and epidemiologic purposes. Am J Infec Control. 1985;13(6):241-9.
14- Luber P, Bartelt E, Genschow E, Wagner J, Hahn H. Comparison of broth microdilution, E test, and agar

www.SID.ir