

## Preparation and Investigation of Gum Tragacanth/ Gelatin Nanofibers for Antibacterial Drug Delivery Systems

Rashid Meghdadi Kasani<sup>1</sup> and Soheil Boddohi<sup>2\*</sup>

1. Faculty of Engineering, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Postal Code 1469669191,  
Tehran, Iran

2. Department of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares  
University, P.O. Box 14115-114, Tehran, Iran

Received: 17 September 2018, accepted: 7 April 2019

### ABSTRACT

**Hypothesis:** Based on previous studies, among all drug delivery systems, polymeric nanofibers have been used extensively. Release mechanism and rate can be tuned by changing polymer concentration, size and shape of nanofibers. In the present study, a drug delivery system was prepared by natural polymers of gum tragacanth and gelatin using electrospinning method for control delivery of imipenem/cilastatin in antibacterial applications.

**Methods:** Nanofibers' diameters and morphology were measured by scanning electron microscopy (SEM). The physicochemical properties of nanofibers' materials were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). In vitro release of drug was investigated using ultraviolet (UV) spectroscopy. MTT assay was performed using L929 (NCBI C161) cell line by extraction method on nanofibers with/without drug. The antibacterial activity was performed on nanofibers against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria.

**Findings:** Nanofibers with concentration ratio of gum tragacanth/gelatin (80 to 20%) were selected for further investigation. Diameters of nanofiber with/without drug were in the range of 100 and 200 nm, respectively. Also, the results confirmed that there is no possible interaction between drug and nanofiber materials. The drug release profile from nanofibers showed 82% release in 120 h. The result of MTT assay indicated that nanofibers without drug had no toxicity effects. Also cell viability of drug-loaded nanofibers has reached about 91% cell viability after 5 days. Overall, this study confirmed that this nanofiber could potentially be used as a drug carrier for antibacterial agent delivery, specifically against gram-negative bacteria without cytotoxicity effect.

#### Keywords:

nanofibers,  
gum tragacanth,  
gelatin,  
imipenem/cilastatin,  
drug delivery system

(\*)To whom correspondence should be addressed.

E-mail: [s.boddohi@modares.ac.ir](mailto:s.boddohi@modares.ac.ir)

#### Please cite this article using:

Meghdadi Kasani R., and Boddohi S., Preparation and Investigation of Gum Tragacanth/Gelatin Nanofibers for Antibacterial Drug Delivery Systems, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **32**, 145-155, 2019.

# تهیه و بررسی نانوالیاف کتیرا-ژلاتین در سامانه‌های دارورسانی ضدباکتریایی

رشید مقدادی کاسانی<sup>۱</sup>، سهیل بدوچی<sup>۲\*</sup>

۱- تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، دانشکده فنی و مهندسی، کد پستی ۱۴۶۹۶۶۹۱۹۱

۲- تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، گروه مهندسی زیست‌پزشکی، صندوق پستی ۱۴۱۱۵-۱۱۴

دریافت: ۱۳۹۷/۶/۲۶، پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۱۸

قابل دسترس در نشانی: <http://jips.ippi.ac.ir>

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،

سال سی و دوم، شماره ۲،

صفحه ۱۵۵-۱۴۵، ۱۳۹۸

ISSN: 1016-3255

Online ISSN: 2008-0883

DOI: 10.22063/JIPST.2019.1650

## چکیده

**فرضیه:** از میان سامانه‌های مختلف دارورسانی، نانوالیاف پلیمری به‌عنوان حامل مناسب دارو در مطالعات گذشته استفاده شده‌اند. سرعت و سازوکار رهایش دارو از نانوالیاف پلیمری را می‌توان با تغییر غلظت پلیمر، اندازه و شکل نانوالیاف کنترل کرد. در پژوهش حاضر، سامانه دارورسانی با استفاده از پلیمرهای طبیعی کتیرا و ژلاتین برای رهایش کنترل‌شده داروی ایمی‌پنم-سیلاستاتین در کاربردهای ضدباکتریایی تهیه شد.

**روش‌ها:** قطر و شکل‌شناسی نانوالیاف با میکروسکوپی الکترونی پویشی (SEM) و خواص فیزیکی شیمیایی نانوالیاف با طیف‌سنجی زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR) بررسی و تحلیل شد. رهایش برون‌تنی داروی ایمی‌پنم-سیلاستاتین با طیف‌سنجی فرابنفش (UV) بررسی شد. آزمون سمیت سلولی (MTT) با استفاده از سلول L929 (NCBI C161) و روش استخراج روی نانوالیاف با دارو و بدون آن انجام شد. فعالیت ضدباکتریایی نانوالیاف در برابر باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مطالعه شد.

**یافته‌ها:** نانوالیاف با نسبت ۸۰ به ۲۰ درصد کتیرا به ژلاتین برای بررسی بیشتر انتخاب شدند. نتایج نشان داد، قطر نانوالیاف با دارو و بدون آن به ترتیب در محدوده ۱۰۰ و ۲۰۰ nm بوده و دارو با نانوالیاف هیچ برهم‌کنش شیمیایی نداشته است. نیم‌رخ رهایش دارو از نانوالیاف، آزادسازی ۸۳٪ دارو را طی ۱۲۰ h نشان داد. نتایج آزمون سمیت سلولی نشان داد، نانوالیاف بدون دارو هیچ اثر سمی نداشته‌اند. زنده‌مانی سلول در نانوالیاف بارگذاری‌شده با دارو نیز پس از ۵ روز حدود ۹۱٪ بوده است. به‌طور کلی این مطالعه تأیید کرد، نانوالیاف تهیه‌شده می‌توانند به‌عنوان حامل مناسبی برای رساندن عامل ضدباکتریایی، به‌ویژه در برابر باکتری‌های گرم منفی بدون اثر سمیت سلولی استفاده شوند.

## واژه‌های کلیدی

نانوالیاف،

کتیرا،

ژلاتین،

ایمی‌پنم-سیلاستاتین،

سامانه دارورسانی

\* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:

s.boddohi@modares.ac.ir

## مقدمه

رهایش کنترل‌شده دارو، سامانه هدفمند کنترلی است که با محرک زیستی، رهایش را در زمان مشخص با مقدار معینی از دارو برای رساندن به اثر درمانی مطلوب تضمین می‌کند [۱]. چالش درمانی داروهای جدید، بهینه‌کردن اثرهای دارویی و کاهش سمیت آن‌هاست. با کنترل دقیق مقدار یا مکان دارو در بدن، عوارض جانبی می‌تواند کاهش یابد. امروزه، بررسی‌ها در حال پیشرفت مداوم برای بهبود عوامل کنترل‌کننده رهایش است، به‌طوری که داروها متابولیسم رهایش سریع و کنترل‌شده داشته باشند [۲]. بسیاری از روش‌های متداول مصرف دارو باعث افزایش زمان مصرف آن می‌شود که می‌تواند موجب بروز مشکلات و عوارض جانبی برای بیمار شود. مطلوب‌ترین شکل دارورسانی باید به‌صورت رهایش مقدار کافی دارو در زمان مشخص و قابل جذب برای عضو باشد. استفاده از سامانه‌های دارورسانی با ابعاد نانو دو هدف کلی افزایش اثر درمانی داروی مصرفی به‌واسطه افزایش سطح به حجم و کاهش اثرهای جانبی آن بر سایر اندام‌ها را به‌دنبال دارد [۳].

از میان سامانه‌های دارورسانی، نانوالیاف پلیمری جایگاه مناسبی در میان پژوهشگران پیدا کرده‌اند. با استفاده از روش مرسوم الکتروریسی، کنترل شکل‌شناسی نانوالیاف و خواص فیزیکی آن‌ها مهندسی و بهینه می‌شود. این نانوالیاف پلیمری با ساختار یکنواخت و بی‌دانه در کاربردهای زیست‌پزشکی، مهندسی بافت و دارورسانی نقش مهمی را ایفا می‌کنند [۴]. این ساختار از میان کاربردهای زیست‌پزشکی نانوالیاف، در بارگذاری داروهای ضدباکتریایی برای درمان بیماری‌های عفونی به‌ویژه عفونت‌های ناشی از زخم و جراحی استفاده می‌شود. نقش نانوالیاف افزون بر حفاظت فیزیکی از بافت آسیب‌دیده، رهایش کنترل‌شده و آهسته دارو برای درمان زخم است [۵].

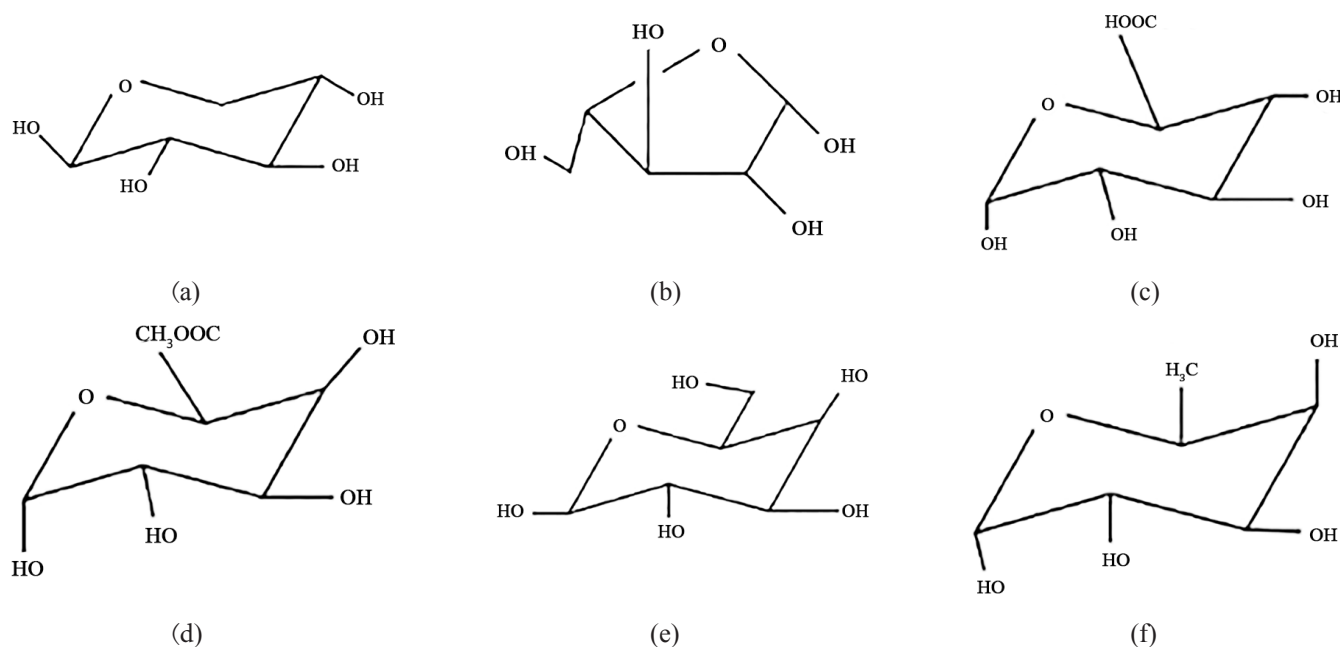
از میان پلیمرهای طبیعی، پلی‌ساکاریدها در چنه دهه اخیر به‌عنوان حامل‌های مناسب دارویی استفاده شده‌اند. این پلیمرها با اتمام رهایش کنترل‌شده دارو به‌دلیل خواص زیست‌تخریب‌پذیری از راه‌های مختلف بدون نیاز به عمل جراحی از بدن خارج می‌شوند [۶]. در سال‌های گذشته توسعه الیاف پلیمری برای کاربردهای مختلف به‌طور گسترده بررسی شده است. برتری‌های استفاده از الیاف الکتروریسی‌شده در حوزه رهایش دارو را می‌توان به درصد بارگذاری زیاد دارو، تنوع در انتخاب نوع پلیمر، سادگی فرایند و به‌صرفه‌بودن هزینه نسبت داد [۷]. نانوالیاف ریسیده‌شده با روش الکتروریسی مزایای بسیاری مانند تخلخل منحصر به‌فرد، نسبت سطح به حجم زیاد، پیوستگی کامل تخلخل‌ها، امکان استفاده از انواع

مختلف پلیمرهای طبیعی و سنتزی، قابلیت تولید انبوه و سادگی نسبی فرایند را دارند. از این روش برای ساخت زخم‌پوش‌ها، داربست‌های مهندسی بافت و سامانه‌های نوین دارورسانی استفاده می‌شود [۸،۹]. صمغ کتیرا (TG) پلی‌ساکاریدی طبیعی بوده که تجدیدپذیر، زیست‌تخریب‌پذیر و غیرسمی است و در زمینه‌های پزشکی استفاده می‌شود. این پلیمر کربوهیدرات اسیدی ناهمگن و آب‌دوست بوده که متشکل از مخلوطی از تراگاکانتین (tragacanthin) حل‌پذیر در آب، باسورین (bassorin) تورم‌پذیر در آب و بخش‌های پلی‌ساکاریدی با مقادیر زیادی آرابینوز و پروتئین است [۱۰]. با توجه به اینکه کاربردهای آینده داروها، پپتیدها و پروتئین‌ها، برای رهایش هدفمند در بدن به ساختار و مهندسی پلیمرها در آن سامانه‌ها بستگی دارد، استفاده از کتیرا به‌عنوان پلی‌ساکارید گزینه مناسبی در ساخت سامانه‌های دارورسانی است. این ماده نقش مهمی را در ایجاد رهایش کنترل‌شده ایفا می‌کند [۱۱]. واحدهای ساختاری کتیرا در شکل ۱ نشان داده شده است [۱۰].

ژلاتین (GL) پلیمر طبیعی است که از کلاژن استخراج می‌شود. این پلیمر مزایای بسیاری از جمله زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، منبع زیستی فراوان، قیمت مناسب و نیز تحریک‌نکردن سامانه ایمنی بدن را دارد. ژلاتین به‌طور گسترده در حوزه‌های دارورسانی و پزشکی در کاربردهای متنوعی همچون زخم‌پوش‌ها، ژن‌درمانی، ساخت داربست و میکروگوی برای مهندسی بافت و سامانه‌های رهایش دارو استفاده می‌شود [۱۲،۱۳].

ایمی‌پنم (IMP) (N-فرمیدویل تینامایسین مونوهیدرات) عضوی از خانواده کرباپنم است. آنتی‌بیوتیک‌های  $\beta$ -لاکتام به‌طور ویژه در برابر  $\beta$ -لاکتامازهای باکتری گرم مثبت و گرم منفی و نیز ارگانسیم‌های هوازی و غیرهوازی مقاوم هستند. فعالیت ایمی‌پنم در برابر بیشتر باکتری‌های بیماری‌زا قوی و از بین برنده است. به‌طور کلی فقط باکتری‌های /ستافیلوکوک مقاوم در برابر متی‌سیلین، سودوموناس مالتوفیلیا، سودوموناس سپاسیا و /ستریپتوکوکوس فاسیوم در برابر ایمی‌پنم مقاوم هستند. ایمی‌پنم با یک دی‌هیدروپپتیدها در لوله‌های پروگزیمال کلیه متابولیسم می‌شود. بنابراین برای رفع این مشکل، ایمی‌پنم با مهارکننده دی‌هیدروپپتیدها با نام سیلاستاتین تجویز می‌شود. ایمی‌پنم و سیلاستاتین، در مقدارهای ۵۰۰ mg برای هر یک به‌طور متوسط است [۱۴]. شکل ۲ ساختار شیمیایی ایمی‌پنم (N-فرمیدویل تینامایسین مونوهیدرات) را نشان می‌دهد [۱۵].

طراحی سامانه‌های جدید دارورسانی با کارایی مناسب و زیست‌سازگاری مطلوب، همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است. در این پژوهش، سامانه جدید بر پایه زیست‌پلیمر طبیعی کتیرا و



شکل ۱- واحدهای شیمیایی ساختار کتیرا: (a) D-β-گزیلوز، (b) L-آرابینوز، (c) D-α-گالاکترونیک اسید، (d) D-α-گالاکترونیک اسید متیل استر، (e) D-β-گالاکتوز و (f) L-α-فوکوز [۱۰].

Fig. 1. Chemical units of gum tragacanth structure: (a) β-D-xylose, (b) L-arabinose, (c) α-D-galacturonic acid, (d) α-D-galacturonic acid methylester, (e) β-D-galactose, and (f) α-L-fucose [9].

## تجربى

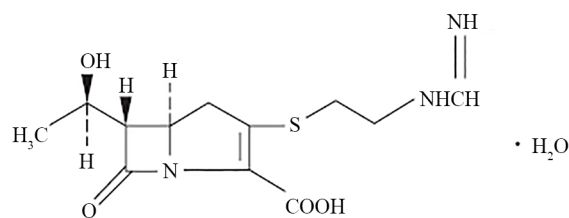
### مواد

کتیرای استفاده شده در این پژوهش از نوع روبانی با کیفیت زیاد از بوته آستراگالوس در مناطق مرکزی ایران و ژلاتین نوع A از شرکت Sigma آمریکا تهیه شد. استیک اسید، گلو تار آلدهید ۲۵٪، اتانول ۹۶٪ و قرص بافر فسفات برای آزمون رهائش دارو از شرکت Merck آلمان تهیه شدند. از آب مقطر به عنوان حلال استفاده شد. آنتی بیوتیک ایمپنم-سیلاستاسین نیز از شرکت داروسازی اکسیر ایران تهیه شد.

### دستگاه‌ها

برای ساخت نانوالیاف از دستگاه الکترورسی مدل Full Option ES ساخت شرکت نانواژما (ایران)، برای بررسی مقدار رهائش دارو و رسم منحنی استاندارد از طیف‌سنج با امواج فرابنفش مدل UV-1800 ساخت شرکت Shimadzu ژاپن و برای بررسی ساختار شیمیایی نمونه‌ها از طیف‌سنج زیرقرمز مدل FTIR-410 ساخت شرکت Jasco ژاپن استفاده شد. برای بررسی ساختار نانوالیاف، میکروسکوپ الکترونی پوششی مدل AIS 2100 ساخت شرکت Seron Technologies Inc. کره جنوبی و برای خارج سازی مقادیر

ژلاتین طراحی شده و رهائش آهسته ایمپنم-سیلاستاتین از این سامانه بررسی شده است. مطالعه خواص ضدباکتری این سامانه، با و بدون دارو بررسی و هاله عدم رشد باکتری اندازه گیری شد. همچنین، در نهایت آزمون نبود سمیت سلولی این سامانه به همراه دارو نیز بررسی شده است. گفتنی است، تاکنون درباره استفاده از این دارو در درمان عفونت با ترکیب زیست پلیمرهای کتیرا-ژلاتین به شکل نانوالیاف مطالعه نشده است.



شکل ۲- ساختار شیمیایی ایمپنم (N-فرمیدیل تینامایسین مونوهیدرات) [۱۵].

Fig. 2. Chemical structure of imipenem (N-formimidoyl thienamycin monohydrate) [15].

### رسم منحنی استاندارد

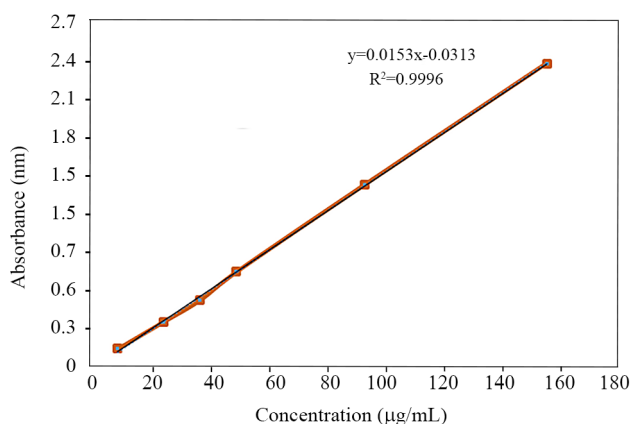
برای انجام این آزمون ابتدا به کمک طیف‌سنجی فرابنفش برای حلال (سدیم کلرید ۰/۹٪) خط پایه گرفته شد. در ادامه، ۶ نقطه برای رسم منحنی جذب داروی ایمپنم-سیلاستاتین در نظر گرفته شد که غلظت محلول‌ها به ترتیب ۰/۴، ۰/۵، ۰/۷، ۰/۹، ۰/۱۵ و ۰/۱۵۶  $\mu\text{g/mL}$  از ایمپنم در آب مقطر تهیه شد و جذب آن‌ها در طول موج بیشترین جذب ۳۰۰ nm ثبت شد. شکل ۳، منحنی استاندارد جذب دارو را نشان می‌دهد.

### بارگذاری داروی ایمپنم-سیلاستاتین

ابتدا دارو با دو مقدار ۳ و ۸٪ وزنی-وزنی نسبت به وزن پلیمر روی ترازو وزن شد. در ادامه، داروهای وزن‌شده به محلول آماده‌شده کتیرا-ژلاتین با نسبت ۸۰ به ۲۰ اضافه و به مدت ۱ h روی همزن مغناطیسی مخلوط شدند تا دارو با محلول پلیمر ترکیب شود. پس از ترکیب، محلول آماده‌شده ریسیده شد. در نتیجه، دارو درون الیاف تشکیل‌شده بارگذاری شد.

### رهایش آنتی‌بیوتیک ایمپنم-سیلاستاتین

برای مطالعه رفتار رهایش ایمپنم از نانوالیاف، از بافر فسفات به‌عنوان محیط رهایش در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد. وزن و ابعاد مشخصی از نانوالیاف TG/GL/8%IMP/CT و TG/GL/3%IMP/CT پدیدار شده در بخار گلو تارآلدئید به‌طور جداگانه درون بشر دارای ۲۵ mL بافر فسفات با pH برابر ۵ در دمای ۳۷°C روی همزن مغناطیسی ریخته شد. در زمان‌های مشخص برای تعیین مقدار ماده



شکل ۳- منحنی استاندارد جذب بر حسب غلظت داروی ایمپنم-سیلاستاتین.

Fig. 3. Standard curve of absorbance versus imipenem-cilastatin concentration.

کم حلال و خشک کردن نمونه‌ها، گرم‌خانه خلأ مدل VO400 ساخت شرکت Memmert آلمان به کار گرفته شد.

### روش‌ها

#### فرایند الکترورسی و تهیه نانوالیاف

برای تهیه نانوالیاف، ابتدا کتیرا با غلظت ۱٪ (حجمی-وزنی) در ۱۰ mL آب مقطر به مدت ۲۴ h روی همزن مغناطیسی در دمای محیط و ژلاتین با غلظت ۱/۵٪ (حجمی/وزنی) در ۱۰ mL استیک اسید رقیق‌شده ۹۰٪ به مدت ۴ h روی همزن مغناطیسی با دمای ۴۰°C همزده شد. محلول‌های کتیرا و ژلاتین به نسبت‌های مختلف کتیرا به ژلاتین با هم ترکیب شدند. نانوالیاف کتیرا-ژلاتین پس از یکنواخت‌سازی محلول در سرنگ ۵ mL با نوک سوزن گاوی با گیج ۱۸، ولتاژ ۱۸ kV، فاصله ۱۳ cm، سرعت تغذیه ۶ mL/h، در دمای محیط و با سرعت چرخش ۵۰۰ rpm جمع‌کننده الکترورسی شدند. سپس، مقادیر ۳ و ۸٪ وزنی-وزنی از داروی ایمپنم-سیلاستاتین به محلول کتیرا-ژلاتین اضافه شد. الکترورسی محلول نهایی به دلیل وجود دارو با شرایط پیشین امکان‌پذیر نبود و هنگام فرایند الکترورسی قطره ایجاد می‌شد. بنابراین، با کمی تغییر جزئی، ولتاژ ۱۹ kV، فاصله ۱۲ cm، سرعت تغذیه ۶ mL/h، دمای محیط و سرعت چرخش ۵۰۰ rpm جمع‌کننده برای الکترورسی نانوالیاف دارای دارو استفاده شد.

#### پایدارسازی نانوالیاف الکترورسی‌شده کتیرا-ژلاتین دارای دارو

با توجه به ناپایداری نانوالیاف کتیرا-ژلاتین (TG/GL) در محیط آبی، پایدارسازی نانوالیاف الکترورسی‌شده کتیرا-ژلاتین به ترتیب دارای ۳ و ۸٪ داروی ایمپنم-سیلاستاتین (TG/GL/3%IMP/CT و TG/GL/8%IMP/CT) با استفاده از بخار گلو تارآلدئید انجام شد. گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیلیک اسید در ساختار کتیرا موقعیت مناسبی را برای واکنش با پایدارکننده‌ها فراهم می‌کنند. همچنین، ژلاتین در ساختار خود هر دو اسید آمینه‌های مثبت و منفی را دارد که موجب ایجاد ماهیت پلی‌آمفولیت در این ماده می‌شود. گلو تارآلدئید به‌طور گسترده و در مقادیر کم به‌عنوان یکی از عامل‌های پایدارکننده استفاده می‌شود [۱۶]. الیاف تهیه‌شده به مدت ۵ h در مجاورت بخار گلو تارآلدئید ۲۰٪ درون خشکانه کاملاً بسته در دمای محیط قرار گرفتند. پس از اتمام عملیات پایدارسازی برای خارج کردن گلو تارآلدئید از ساختار نانوالیاف، نمونه‌ها درون گرم‌خانه خلأ در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ h قرار گرفتند.



### آزمون سمیت سلولی (MTT)

برای ارزیابی سمیت نانوالیاف TG/GL، مقدار زنده‌مانی سلول‌های رشته‌ساز (fibroblast) از رده L929 (NCBI C161) با آزمون سمیت‌شناسی MTT نامستقیم اندازه‌گیری شدند. درصد زنده‌مانی سلول‌های کشت داده‌شده با محیط‌های عصاره‌ای بررسی شدند که در مجاورت نانوالیاف‌های TG/GL و نانوالیاف TG/GL/8%IMP/CT به مدت ۱ تا ۵ روز قرار گرفته بودند.

## نتایج و بحث

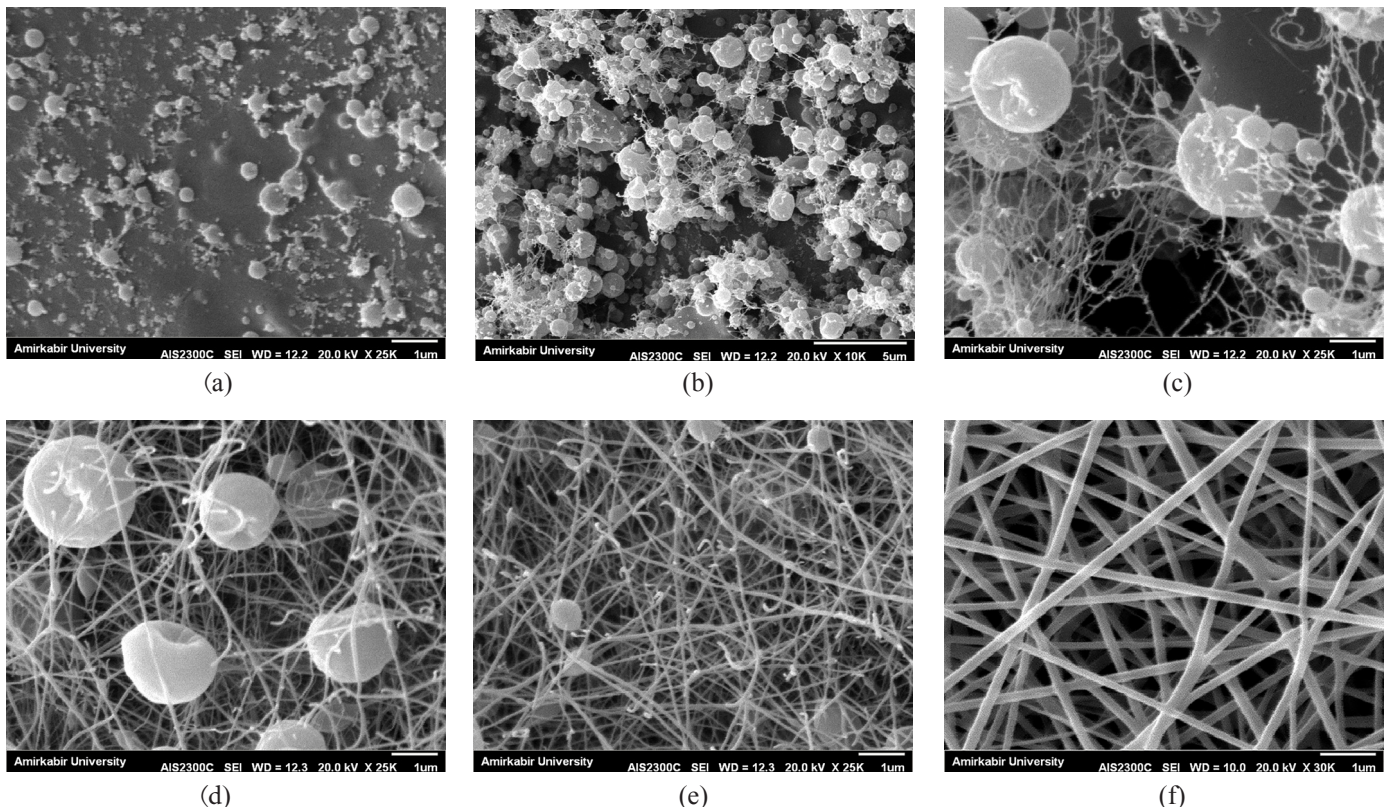
### مطالعات شکل‌شناسی نانوالیاف

تصاویر میکروسکوپی الکترونی نانوالیاف حاصل از الکتروریسی محلول بدون دارو در نسبت‌های مختلف و محلول دارای دارو و نانوالیاف دارای داروی پایدارشده در محیط آبی و میانگین قطر الیاف به ترتیب در شکل ۴ و جدول ۱ آمده است. نانوالیاف بدون دارو در نسبت‌های مختلف کتیرا به ژلاتین به ترتیب ۸۰/۲۰، ۷۰/۳۰، ۶۰/۴۰، ۵۰/۵۰، ۴۰/۶۰، ۲۰/۸۰ رسیدند. همان‌طور که در شکل ۴ دیده

فعال رهایش‌یافته، ۳ mL محیط رهایشی را که نانوالیاف در آن غوطه‌ور شده برداشته و به ازای آن همان حجم از محیط رهایش تازه به بشر اضافه شد. سپس، محیط‌های رهایش جداشده با طیف‌سنجی فرابنفش اندازه‌گیری شدند.

### آزمون ضدباکتریایی

بررسی اثر ضد میکروبی نمونه‌های تهیه‌شده در برابر باکتری‌های گرم مثبت/استافیلوکوکوس/اورئوس و نیز گرم منفی/شرشیاکلی با استفاده از روش انتشار دیسکی انجام شد. در این روش، در پلیت به قطر ۱۰۰ mL حدود ۲۵-۳۰ mL محیط مولر هیتون ریخته شد. سپس، به مقدار ۰/۵ مک فارلند باکتری به محیط مولر هیتون اضافه و به وسیله سواب (swab) محیط مدنظر کشت داده شد. پس از کشت، نانوالیاف مدنظر (دارای دارو و بدون آن) برای انجام آزمون ضدباکتری در اندازه ۱×۱ تهیه شدند و روی محیط کشت انتقال داده شدند. محیط‌های کشت به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷°C نگهداری شدند. پس از ۲۴ h پلیت‌ها بررسی و قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد.



شکل ۴- تصاویر SEM نانوالیاف TG/GL در نسبت‌های مختلف: (a) ۸۰/۲۰، (b) ۷۰/۳۰، (c) ۶۰/۴۰، (d) ۵۰/۵۰، (e) ۴۰/۶۰ و (f) ۲۰/۸۰.  
Fig. 4. SEM images of TG/GL nanofibers in different ratios: (a) 80/20, (b) 70/30, (c) 60/40, (d) 50/50, (e) 40/60, and (f) 20/80.

قطر نانوالیاف می‌تواند به دلیل فاز بخار موجود در روش پایدارسازی با بخار گلو تار آلهید باشد. این نوع رفتار در مطالعات گروهی از پژوهشگران نیز دیده شده است [۱۷].

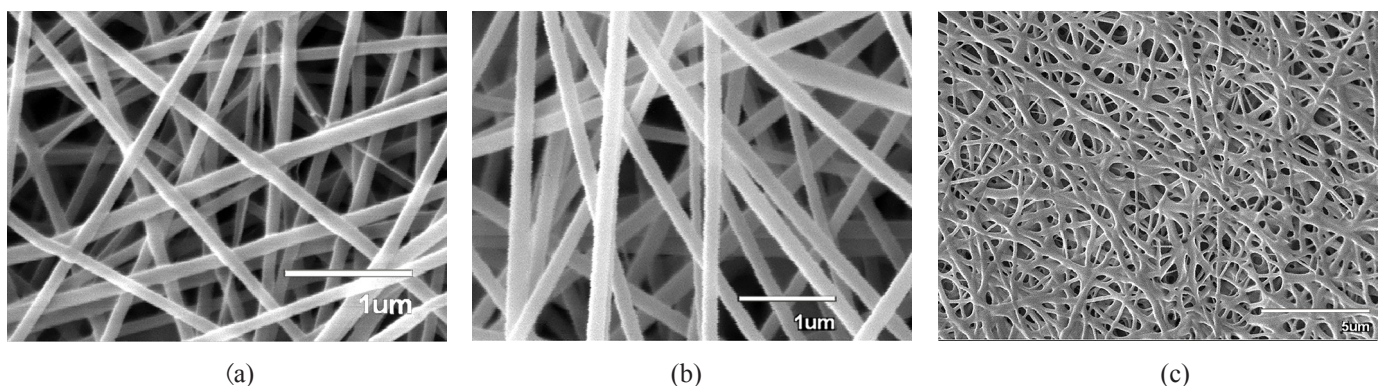
### بررسی طیف‌سنجی FTIR

در شکل ۶، طیف FTIR نانوالیاف TG/GL، داروی IMP/CT و نانوالیاف پایدار شده TG/GL/8%IMP/CT نشان داده شده است. مطابق این شکل در طیف FTIR نانوالیاف TG/GL پیک پهنی در محدوده  $3442\text{ cm}^{-1}$  دیده می‌شود که ناشی از گروه‌های O-H در کتیراست. پیک‌های محدوده  $2930-2856\text{ cm}^{-1}$  به گروه‌های متیلن در کتیرا مربوط می‌شوند. همچنین، پیک تیز در محدوده  $1747\text{ cm}^{-1}$  می‌تواند به گروه کربونیل در آلهیدها، کتون‌ها و اسیدهای کربوکسیلیک در کتیرا اختصاص داده شود [۱۸]. پیک محدوده  $1328\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ژلاتین است که به‌طور عمده به جابه‌جایی زنجیرهای پرولین مربوط می‌شود. پیک‌های محدوده  $3370-3270\text{ cm}^{-1}$  نشانگر آمید نوع اول است. پیک‌ها در محدوده  $1550-1500\text{ cm}^{-1}$  نشانگر تغییر شکل NH برای آمید نوع دوم هستند [۱۹]. در طیف FTIR داروی IMP/CT، پیک‌ها در محدوده  $2940$ ،  $2969$  و  $3240$  تا  $3250\text{ cm}^{-1}$  نشانگر پیوندهای به ترتیب NH، OH و CH هستند. همچنین، جذب پیک  $\text{C}=\text{O}$  برای جابه‌جایی کشش حلقه  $\beta-18$  لاکتام در محدوده  $1770\text{ cm}^{-1}$ ، گروه کربوکسیل در محدوده  $1720\text{ cm}^{-1}$ ، آمید نوع اول در محدوده  $1644\text{ cm}^{-1}$  و آمید نوع دوم در محدوده  $1528\text{ cm}^{-1}$  هستند. پیک‌ها در محدوده  $887\text{ cm}^{-1}$  تا  $809\text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه‌های  $\text{C}=\text{C}$  و  $\text{C}-\text{C}$  هستند [۲۰]. همان‌طور که در طیف FTIR نانوالیاف پایدار شده TG/GL/8%IMP/CT دیده می‌شود، پیک‌ها در محدوده  $790$ ،  $868$  و  $1745\text{ cm}^{-1}$  با کمی جابه‌جایی نسبت به پیک

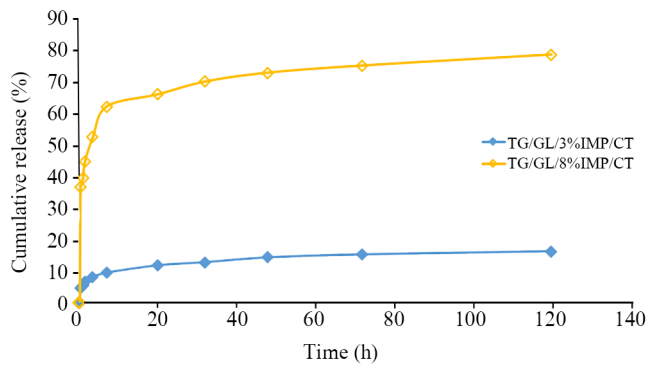
جدول ۱- میانگین قطر نانوالیاف TG/GL (کتیرا-ژلاتین) با و بدون دارو.  
Table 1. Average diameter of TG/GL nanofibers with and without drug.

| Nanofibers                 | Average diameter (nm) | Nanofiber diameter (nm) |     |
|----------------------------|-----------------------|-------------------------|-----|
|                            |                       | Max                     | Min |
| TG/GL                      | $101 \pm 38$          | 221                     | 42  |
| TG/GL/3%IMP/CT             | $184 \pm 36$          | 307                     | 83  |
| TG/GL/8%IMP/CT             | $200 \pm 48$          | 320                     | 86  |
| TG/GL/8%IMP/CT Crosslinked | $459 \pm 80$          | 964                     | 168 |

می‌شود، در نسبت‌هایی که مقدار کتیرا بیشتر از ژلاتین بود، نانوالیاف همراه با دانه تشکیل شد و نانوالیاف یکنواختی به دست نیامد. با تعیین نسبت مناسب کتیرا به ژلاتین (۲۰/۸۰)، نانوالیافی بدون دانه و یکنواخت تهیه شد. شکل ۵ (a) و (b) به ترتیب بارگذاری ۳ و ۸٪ دارو در محلول (۲۰/۸۰) کتیرا به ژلاتین را نشان می‌دهد که الیاف بدون دانه و یکنواخت حاصل شده است. شکل ۵ (c) نشان می‌دهد، نانوالیاف دارای ۸٪ دارو پس از استفاده از پایدارکننده کمی متورم شدند، اما شکل خود را حفظ کردند. همچنین، جدول ۱ اندازه متوسط قطر نانوالیاف را در شرایط مختلف نشان می‌دهد که با نرم‌افزار Image J محاسبه شده است. قطر نانوالیاف بدون دارو حدود  $101\text{ nm}$  اندازه‌گیری شد که با افزودن دارو به محلول کتیرا و ژلاتین، قطر از حدود  $101\text{ nm}$  به حدود  $200\text{ nm}$  افزایش یافته است. همچنین، پس از پایدارسازی نانوالیاف، قطر نانوالیاف به حدود  $459\text{ nm}$  افزایش یافت. با توجه به تورم‌پذیری کتیرا و ژلاتین، این افزایش



شکل ۵- تصاویر SEM نانوالیاف TG/GL بارگذاری شده با مقادیر مختلف داروی IMP/CT: (a) ۳٪، (b) ۸٪ و (c) ۸٪ و شبکه‌ای شده با گلو تار آلهید.  
Fig. 5. SEM images of loaded TG/GL nanofibers with different content of IMP/CT: (a) 3%, (b) 8%, and (c) 8% and crosslinked with glutaraldehyde.



شکل ۷- نیم‌رخ رهائش دارو از نانوالیاف TG/GL بارگذاری شده با ۳ و ۸٪ داروی IMP/CT.

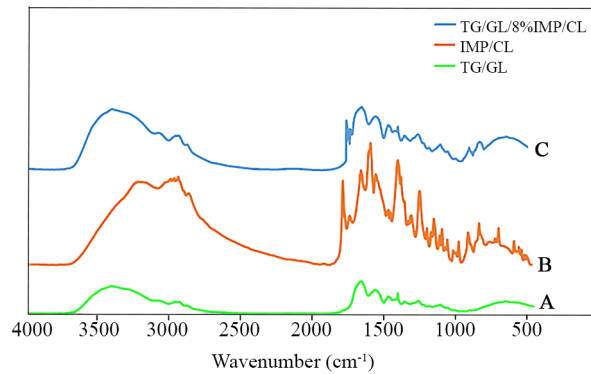
Fig. 7. Drug release profile from loaded TG/GL nanofibers with 3 and 8% IMP/CT.

#### بررسی آزمون ضدباکتریایی

نتایج و تصاویر حاصل از آزمون ضدباکتریایی نانوالیاف با دارو و بدون آن در برابر باکتری *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در شکل ۸ نشان داده شده است. نتایج مربوط به اندازه قطر هاله عدم رشد باکتری نیز در جدول ۳ آمده است. همان‌طور که دیده می‌شود، نانوالیاف به‌تنهایی دارای اثر ضد میکروبی کمی علیه باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* است که این نتیجه توسط سایر پژوهشگران نیز تأیید شده است [۲۱]. احتمالاً L-قندهای موجود در کتیرا (L-آرآینوز و L-فوکوز) مقاومت خوبی در برابر حمله میکروبی دارند، زیرا بیشتر ارگان‌ها قابلیت سوخت‌وساز این قند خارجی را ندارند [۲۱]. اما، نانوالیاف TG/GL در برابر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* اثری نداشتند. همان‌طور که در شکل ۸ و جدول ۳ نیز دیده می‌شود، نمونه نانوالیاف TG/GL/8%IMP/CT اثر بسیار خوبی بر دو نوع باکتری *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته است و قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۱۳ و ۱۴ mm گزارش شده جدول ۲- سازوکار رهائش دارو.

Table 2. Drug release mechanism.

| Equation and parameters                     | Release model    |                         |
|---------------------------------------------|------------------|-------------------------|
| $(M_t/M) = K_m t^n$                         | Korsmeyer-Peppas | pseudofickian diffusion |
| $M_t$ : Fraction of drug released at time t |                  |                         |
| M: Total amount of drug                     |                  |                         |
| $K_m$ : Kinetic constant                    |                  |                         |
| n: Diffusion exponent                       |                  |                         |
| t: Time                                     |                  |                         |



شکل ۶- طیف FTIR: (a) نانوالیاف TG/GL، (b) داروی IMP/CT، (c) نانوالیاف TG/GL دارای ۸٪ داروی IMP/CT و شبکه‌ای شده با گلو تارآلدهید.

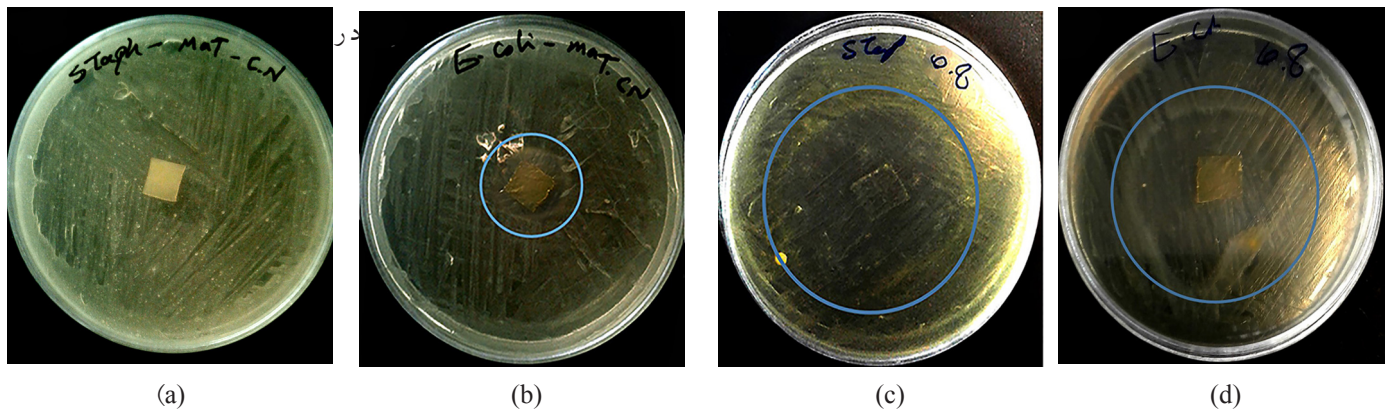
Fig. 6. FTIR spectra of: (a) TG/GL nanofibers, (b) IMP/CT drug, and (C) TG/GL/8%IMP/CT nanofibers crosslinked with glutaraldehyde.

داروی خالص، تأییدکننده وجود دارو در نانوالیاف ساخته شده هستند. همچنین، ظاهر نشدن پیک جدید تأییدکننده نبود پیوند شیمیایی جدید در ساختار نانوالیاف با دارو است.

#### بررسی سازوکار رهائش دارو از نانوالیاف رسیده شده

فرایند رهائش دارو از نانوالیاف کتیرا-ژلاتین دارای ۳٪ و ۸٪ (وزنی-وزنی) ایمی‌نم-سیلاستاتین پایدار شده در دمای ۳۷°C و بافر فسفات بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۷ دیده می‌شود، به دلیل بارگذاری کم دارو در نمونه TG/GL/3%IMP/CT و نیم‌رخ با رهائش کم دارو، از این نمونه صرف‌نظر شد و در نتیجه فقط نمونه TG/GL/8%IMP/CT بیشتر بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد، منحنی رهائش دارو از نانوالیاف TG/GL/8%IMP/CT در ۳۰ min اول، رهائش انفجاری داشته و حدود ۳۹٪ دارو آزاد شده است. این مقدار می‌تواند به دلیل اتصال دارو روی سطح نانوالیاف باشد. همچنین بقیه دارو که داخل نانوالیاف بود، طی پنج روز (۱۲۰ h) آزاد شد. در نهایت، ۸۲٪ از دارو از این سامانه طبق مدل ریاضی Korsmeyer-Peppas و با سازوکار شبه‌فیکی آزاد شد. در جدول ۲ معادله رهائش دارو از نانوالیاف TG/GL/8%IMP/CT بررسی شد. رهائش دارو طی ۱۲۰ h از مدل رهائش Korsmeyer-Peppas پیروی می‌کند و  $R^2 = 0.95$  است. با توجه به نتایج، n به دست آمده در این معادله برابر با ۰/۱۲۷۴ بود. از آنجا که n کوچک‌تر از ۰/۵ بود، در نتیجه رهائش دارو از سامانه از راه نفوذ و با سازوکار رهائش شبه‌فیکی انجام شد.

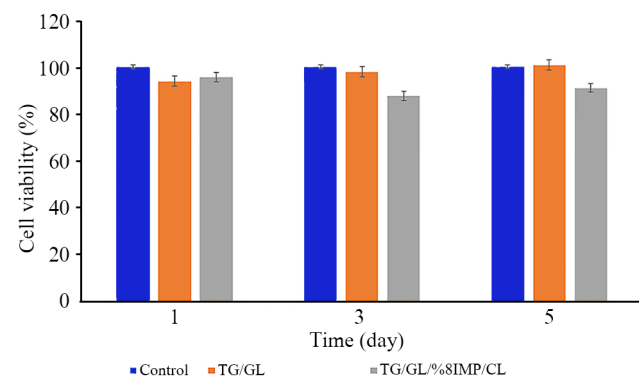




شکل ۸- نتایج آزمون ضدباکتریایی نانوالیاف TG/GL: بدون دارو در برابر (a) *S. aureus*، (b) *E. coli* و بارگذاری شده با ۸٪ داروی IMP/CT در برابر (c) *S. aureus* و (d) *E. coli*.

Fig. 8. Antibacterial test results for TG/GL nanofibers: without drug against (a) *S. aureus*, (b) *E. coli* and loaded with 8%IMP/CT against, (c) *S. aureus*, and (d) *E. coli*.

نتیجه گروه‌های آب‌دوست مکان مناسبی برای رشد و تکثیر سلولی هستند. همچنین این داده‌ها نشان داده‌اند، با گذشت زمان در روزهای سوم و پنجم درصد زنده‌مانی سلول‌ها در مجاورت نانوالیاف TG/GL نسبت به روز اول افزایش یافته و این مقدار به ترتیب از ۹۳٪ به ۱۰۰٪ رسیده است. در نتیجه با افزایش غلظت عصاره نانوالیاف‌ها، زنده‌مانی سلول‌ها نیز افزایش یافت که این موضوع زیست‌سازگاری زیاد کتیرا و ژلاتین را نشان می‌دهد. در مقابل همان‌طور که در شکل ۹ دیده می‌شود، مقدار زنده‌مانی سلول‌ها در مجاورت نانوالیاف TG/GL/8%IMP/CT در روز اول بیشتر از روزهای سوم و پنجم بود که این کاهش به دلیل عوارض داروی رهانده از سامانه TG/GL/8%IMP/CT است. مقدار زنده‌مانی سلول پس از ۵ روز



شکل ۹- آزمون MTT برای نانوالیاف TG/GL و بارگذاری شده با 8%IMP/CT طی ۵ روز.

Fig. 9. MTT assay for TG/GL nanofibers and loaded with 8%IMP/CT during 5 days.

است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، از این سامانه برای رهایش داروی ایمی‌پنم-سیلاستاتین که دارای طیف گسترده‌ای در برابر هر دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی است، برای بیماری‌های عفونی استفاده کرد.

#### بررسی آزمون سمیت سلولی (MTT)

نتایج آزمون MTT با استفاده از روش عصاره‌گیری (نامستقیم) و سلول‌های رشته‌ساز از رده L929 (NCBI C161) در شکل ۹ نشان داده شده است. طبق تحلیل آماری انجام‌شده روی این داده‌ها، مقدار زنده‌مانی سلول‌ها در مجاورت نانوالیاف TG/GL در مقایسه با نمونه کنترل، تغییر شایان توجهی نداشته است و در تمام روزها مقدار زنده‌مانی سلول‌ها بیشتر از ۹۰٪ نشان داده شده است. زیرا TG برخی از گروه‌های آب‌دوست را روی سطح نانوالیاف TG/GL ایجاد می‌کند و

جدول ۳- قطر هاله عدم رشد در برابر باکتری *E. coli* و *S. aureus* در تماس با نانوالیاف TG/GL و TG/GL/8%IMP/CT.

Table 3. Diameter of the zone of inhibition against *E. coli* and *S. aureus* bacteria in contact with TG/GL and TG/GL/8%IMP/CT nanofibers.

| Sample         | Diameter of the zone of Inhibition (mm) for |                  |
|----------------|---------------------------------------------|------------------|
|                | <i>E. coli</i>                              | <i>S. aureus</i> |
| TG/GL          | 4                                           | 0                |
| TG/GL/8%IMP/CT | 13                                          | 14               |

۹۱٪ بود که این مقدار نیز برای مطالعات آینده مطلوب است.

## نتیجه‌گیری

نانوالیاف TG/GL با نسبت‌های مختلف کتیرا به ژلاتین و نیز بارگذاری ۳ و ۸٪ دارو با اعمال پارامترهای مختلف الکتروریسی شدند. با بررسی اندازه قطر و تصاویر به‌دست آمده از میکروسکوپی الکترونی پویشی، ولتاژ ۱۹ kV، فاصله ۱۲ cm و سرعت ۶ mL/h، به‌عنوان پارامترهای مناسب انتخاب شدند. بررسی طیف‌های FTIR نانوالیاف TG/GL، IMP/CT و TG/GL/8%IMP/CT نشان داد، مواد تشکیل‌دهنده الیاف و دارو هیچ برهم‌کنش شیمیایی خاصی نداشته‌اند. رهایش دارو در محیط برون‌تنی با استفاده از طیف‌سنجی فرابنفش بررسی شد. نیم‌رخ رهایش داروی ایمپی-پنم-سیلاستاتین در محلول بافر فسفات نشان داد، این دارو می‌تواند طی ۱۲۰ h حدود ۸۲٪

رهایش یابد. بر اساس آزمون ضدباکتری نشان داده شد، نانوالیاف TG/GL بدون دارو روی باکتری گرم منفی /شرشیا کلی اثر ضدباکتریایی داشته‌اند و اندازه قطر هاله ۴ mm بود. همچنین، نانوالیاف دارای دارو روی هر دو طیف باکتری (گرم منفی و گرم مثبت) اثر ضدباکتریایی ایجاد کردند و اندازه قطر هاله برای باکتری گرم منفی ۱۳ mm و برای باکتری گرم مثبت ۱۴ mm بود. با وجود اثر ضدباکتریایی نانوالیاف بدون دارو علیه باکتری گرم منفی /شرشیا کلی، قطر هاله نانوالیاف دارای دارو در برابر باکتری گرم مثبت /استافیلوکوکوس /اورئوس بیشتر بود که این موضوع به‌دلیل اثر بیشتر ایمپی-پنم روی این طیف از باکتری‌هاست. در نهایت، نبود سمیت سلولی در این سامانه نیز بررسی شد و این سامانه به همراه دارو مقدار ۹۱٪ زنده‌مانی سلولی را پس از ۵ روز نشان داد. به‌طور کلی این مطالعه نشان داد، نانوالیاف TG/GL/8%IMP/CT افزون بر خواص ضدباکتریایی می‌تواند به‌عنوان حامل مناسب دارورسانی بدون اثر سمیت سلولی برای جلوگیری از عفونت‌های پوستی استفاده شوند.

## مراجع

- Goonoo N., Bhaw-Luximon A., and Jhurry D., Drug Loading and Release from Electrospun Biodegradable Nanofibers, *J. Biomed. Nanotech.*, **10**, 2173-2199, 2014.
- Nouri M., Mokhtari J., Salmani L., and Sadeghieh K.H., Electrospinning of Silk Fibroin/ $\beta$ -Cyclodextrin Nanofibers for Controlled Drug Release, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **29**, 89-100, 2015.
- Tanha N.R. and Nouri M., Core Shell Nanofibers of Silk Fibroin Polyvinyl Alcohol Structure and Controlled Release Behavior, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **30**, 473-488, 2018.
- Um-i-Zahra S. and Zhu L., Novel Drug Delivery Duplicate Nanofibers and Their In Vitro Drug Release Profiles, *Am. Res. Thoughts*, **1**, 1683-1698, 2015.
- Topuz F. and Uyar T., Electrospinning of Cyclodextrin Functional Nanofibers for Drug Delivery Applications, *Pharmaceutics*, **11**, 2019, DOI: 10.3390/pharmaceutics11010006.
- Shelke N.B., James R., Laurencin C.T., and Kumbar S.G., Polysaccharide Biomaterials for Drug Delivery and Regenerative Engineering, *Polym. Adv. Technol.*, **25**, 448-460, 2014.
- Chou Sh-F., Carson D., and Woodrow K.A., Current Strategies for Sustaining Drug Release from Electrospun Nanofibers, *J. Control. Release*, **220**, 584-591, 2015.
- Thenmozhiab S., Dharmaraja N., Kadirvelub K., and Kim H.Y., Electrospun Nanofibers: New Generation Materials for Advanced Applications, *Mater. Sci. Eng. B*, **217**, 36-48, 2017.
- Son Y.J., Kim W.J., and Yoo H.S., Therapeutic Applications of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Systems, *Arch. Pharm. Res.*, **37**, 69-78, 2014.
- Ranjbar M., Bahrami S.H., and Ramakrishna S., Gum Tragacanth/Poly(L-lactic acid) Nanofibrous Scaffolds for Application in Regeneration of Peripheral Nerve Damage, *Carbohydr. Polym.*, **140**, 104-112, 2016.
- Kaffashi B., Zandieh A., and Khadiv-Parsi P., Drug Release Study of Systems Containing the Tragacanth and Collagen Composite: Release Characterization and Viscoelastic Measurements, *Macromol. Symp.*, **239**, 120-129, 2006.
- Kim S.E., Heo D.N., Lee J.B., Kim J.R., Park S.H., Jeon S.H., and Kwon I.K., Electrospun Gelatin/Polyurethane Blended Nanofibers for Wound Healing, *Biomed. Mater.*, **4**, 2009, Doi: 10.1088/1748-6041/4/4/044106.

13. Panzavolta S., Gioffre M., Focarete M.L., Gualandi C., Foroni L., and Bigi A., Electrospun Gelatin Nanofibers Optimization of Genipin Cross-linking to Preserve Fiber Morphology After Exposure to Water, *Acta Biomater.*, **7**, 1702-1709, 2011.
14. Rodriguez K., Dickinson G., Arcey S., Alea A., and Greenman R., Efficacy of Imipenem Cilastatin in Endocarditis, *Am. J. Med.*, **78**, 117-121, 1985.
15. Rodloff A.C., Goldstein E.J.C., and Torres A., Two Decades of Imipenem Therapy, *J. Antimicrob. Chemother.*, **58**, 916-929, 2006.
16. Laha A., Sharma C.S., and Majumdar S., Electrospun Gelatin Nanofibers as Drug Carrier: Effect of Crosslinking on Sustained Release, *Mater. Today Proc.*, **3**, 3484-3491, 2016.
17. Destaye A.G., Lin C.K., and Lee C.K., Glutaraldehyde Vapor Cross-linked Nanofibrous PVA Mat with In Situ Formed Silver Nanoparticles, *ACS. Appl. Mater. Interfaces*, **5**, 4745-4752, 2013.
18. Bahrami S.H. and Ranjbar M., Development of Nanofibrous Scaffolds Containing Gum Tragacanth Poly( $\epsilon$ -caprolactone) for Application as Skin Scaffolds, *Mater. Sci. Eng. C*, **48**, 71-79, 2015.
19. Hossana M.J., Gafurb M.A., Kadirb M.R., and Karima M.M., Preparation and Characterization of Gelatin-Hydroxyapatite Composite for Bone Tissue Engineering, *Int. J. Eng. Technol.*, **14**, 24-32, 2014.
20. Fazli Y., Shariatinia Z., Kohsari I., Azadmehr A., and Pourmortazavi S.M., A Novel Chitosan-Polyethylene Oxide Nanofibrous Mat Designed for Controlled Co-release of Hydrocortisone and Imipenem/Cilastatin Drugs, *Int. J. Pharm.*, **513**, 636-647, 2016.
21. Bahrami S.H., Ranjbar-Mohammadi M., and Joghataei M.T., Fabrication of Novel Nanofiber Scaffolds from Gum Tragacanth PVA for Wound Dressing Application: In Vitro Evaluation and Antibacterial Properties, *Mater. Sci. Eng. C*, **33**, 4935-4943, 2013.