



تنظیم ویژگی‌های ضدباکتری و خون‌کافت زخم‌پوش‌های پلی‌یورتانی ابرمولکولی اصلاح شده با مشتقات آلرینات

مریم زارع گاچی^۱، حامد دائمی^{۱*}، جواد محمدی^۲ و حسین بهاروند^۱

^۱ پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه فناوری نانو و زیست‌مواد،

تهران ایران

^۲ دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

*h.daemi@royaninstitute.org

چکیده

امروزه با توجه به اهمیت پوست به عنوان اولین سد دفاعی بدن در برابر عوامل بیماری‌زا و نیز بروز عوارض شدیدتر در صورت عدم رعایت روند درمان صحیح پوست از مواد زیستی و مصنوعی مختلفی برای تولید و طراحی زخم‌پوش‌های متفاوت بهره گرفته شده است. اما حضور عامل خارجی در تماس با محیط زیستی بدن می‌تواند در کنار ایفای نقش خود باعث مشکلات دیگری به‌ویژه خون‌کافت گلبول‌های قرمز (آسیب به غشا گلبول قرمز) شود. در این پروژه با توجه به اهمیت حضور گلبول قرمز در تمام مراحل ترمیم زخم و عدم حضور باکتری در بستر زخم، زخم‌پوش‌های پلیمری جدید برپایه پلی‌یورتان کاتیونی تهیه و اصلاح سطح آن با پوشش نمک‌های آمونیوم آلرینات به کمک برهمکنش‌های ابرمولکولی یونی برای کاهش خون‌کافت در کنار افزایش ویژگی ضدباکتری انجام گردید. بررسی‌های زیستی نشان داد، افزایش غلظت و دانسیته بار الکتریکی کاتیون آمونیومی باعث بهبود ویژگی ضدباکتری می‌شود، درحالی‌که ویژگی خون‌کافت افزایش می‌یابد. همچنین به‌طور بهینه نمک TBA-Alg با غلظت ۱ mg/mL دارای خون‌کافت ۵٪ و نیز ویژگی ضدباکتری برای باکتری گرم مثبت ۴۵٪ و گرم منفی حدود ۳۵٪ است. آزمون طیف‌بینی زیرقرمز نیز حضور گروه‌های آمونیوم و نیز برهم‌کنش آن‌ها با آنیون را تایید کرد. در فیلم‌های پلی‌یورتان اصلاح سطح شده نیز فیلم دارای پوشش سطحی TBA-Alg با غلظت بهینه، بهترین ویژگی‌های زیستی را از خود نشان داد.

کلید واژگان: آمونیوم آلرینات، زخم‌پوش، پلی‌یورتان، ویژگی ضدباکتری، خون‌کافت

۱- مقدمه

سالانه در ایالات متحده آمریکا نزدیک به یک میلیون نفر از آسیب‌های سوختگی و ۶/۵ میلیون نفر از زخم‌های مزمن ناشی از دیابت و عفونت زخم و مشکلات ناشی از آن‌ها رنج می‌برند [۱]. با توجه به زمان‌بر بودن ترمیم پوست آسیب‌دیده، به ویژه در زخم‌های مزمن، استفاده از زخم‌پوش‌های پلیمری با ویژگی ضدباکتری رویکرد جدیدی در حوزه ترمیم آسیب‌های پوستی محسوب می‌شود. زخم‌پوش‌های ضدباکتری، به عنوان محافظ موقت روی زخم قرار می‌گیرند و به ترمیم سریع‌تر زخم کمک می‌کنند. زخم‌پوش‌های ضدباکتری برپایه نانوذرات نقره اگرچه امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند، اما به دلیل عدم ماندگاری طولانی مدت، سمیت نسبت به سلول‌های سالم و گلبول‌های قرمز، رهايش ذرات در محیط و ایجاد مقاومت باکتریایی، به مرور توسط مواد طراحی‌شده جدید در حال جایگزینی هستند. مواد پلیمری ضد میکروبی با پایداری شیمیایی، فعالیت طولانی مدت و سمیت کمتر یکی از این مواد جایگزین هستند [۲]. آلرینات یک زیست‌بسپار طبیعی است که به دلیل ویژگی‌های زیستی مطلوب از جمله جذب و نگهداری رطوبت مناسب زخم و کمک به ترمیم زخم به طور گسترده به عنوان زخم‌پوش استفاده می‌شود. با این وجود، آلرینات ویژگی ضدباکتری ذاتی ندارد و از نظر مکانیکی برای زخم‌های در معرض تنش‌های مکانیکی زیاد مناسب نیست. هدف از این پژوهش، بهبود ویژگی ضدباکتری این ماده بدون استفاده از نانوذرات فلزی یا ترکیبات آنتی‌بیوتیک است. همچنین، برای بهبود ویژگی‌های مکانیکی، نمک‌های آلرینات



حاوی کاتیون‌های آمونیومی به عنوان یک پوشش روی سطح پلی‌یورتان‌های کاتیونی (به دلیل ویژگی‌های مکانیکی مناسب و ماهیت انعطاف پذیر) پوشش داده می‌شوند. این پوشش‌دهی به دلیل سطح مثبت پلی‌یورتان کاتیونی و توده آلزینات با بار الکتریکی منفی به آسانی با استفاده از برهم‌کنش‌های ابرمولکولی انجام می‌شود و نیازی به استفاده از روش‌های شیمیایی پیچیده ندارد.

۲- بخش تجربی

به منظور بهبود ویژگی ضدباکتری ترکیب سدیم آلزینات، یون‌های سدیم با کاتیون‌های آمونیوم جایگزین شدند. برای بررسی تأثیر ساختار شیمیایی کاتیون آمونیوم بر ویژگی‌های هیدرولیز و ضدباکتری آلزینات از آمین‌های مختلف با ساختار خطی و شاخه‌ای و با تعداد متفاوت کربن دودسیل آمین (DDA)، دی‌هگزیل آمین (DHA)، تری‌اتیل آمین (TEA) و تری‌بوتیل آمین (TBA) استفاده شد (شکل ۱). پس از تعیین غلظت بهینه نمک‌های آمونیوم آلزینات برای ایجاد ویژگی‌های ضدباکتری و خون‌کافت، مشتقات آمونیوم آلزینات با یک برهم‌کنش ابرمولکولی فیزیکی یونی به شکل پوشش روی فیلم پلی‌یورتان پوشش داده شدند. برای ساخت فیلم پلی‌یورتان کاتیونی از مواد ایزوفورون دی‌ایزوسیانات (IPDI)، پلی‌کاپرولاکتون دی‌ال (PCL)، مخلوط N-متیل‌دی‌اتانول آمین (MDEA) و استیک اسید (HOAC) به عنوان عامل کاتیونی و زنجیرافزاینده بوتان دی‌ال (BD) استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی ساختار شیمیایی با طیف‌بینی زیرقرمز (ATR-FTIR)

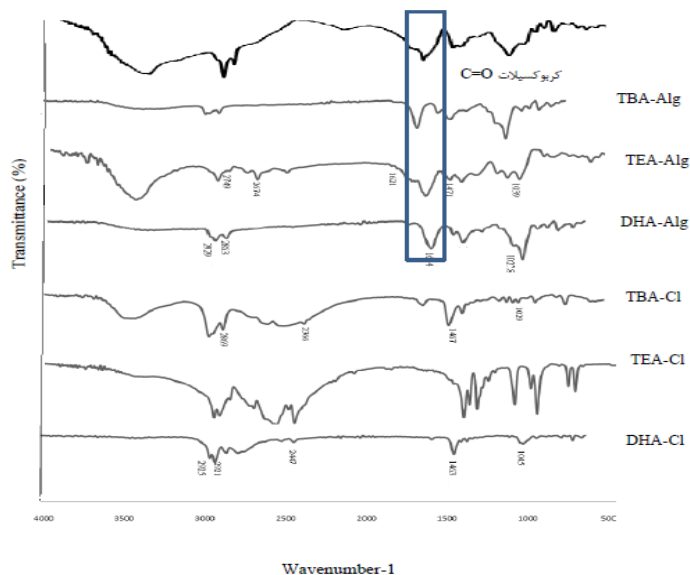
برای بررسی ساختار شیمیایی مشتقات آمونیوم آلزینات و تأثیر کاتیون‌های آمونیومی مختلف بر ساختار آلزینات از روش طیف‌بینی زیرقرمز استفاده شد. براساس شکل ۱ نوارهای جذبی در بررسی‌های مربوط به ترکیبات آمونیومی نمونه‌های آمونیوم آلزینات و نمک‌های آمونیومی در مقایسه با نوارهای جذبی سدیم آلزینات در طیف‌های زیرقرمز مشاهده گردید.

۳-۲- بررسی خواص ضدباکتری مشتقات آمونیوم آلزینات و فیلم پلی‌یورتان

به‌منظور بررسی ویژگی‌های عملکردی مشتقات آمونیوم آلزینات، نتایج آزمون ضدباکتری، کمترین غلظت لازم جهت بازدارندگی و مرگ کامل جمعیت باکتری‌ها (MIC) و نیز غلظت مطلوب ضدباکتری برای ویژگی خون‌کافت و سمیت سلولی مشخص گردید. جدول ۱ به طور خلاصه غلظت‌های نمک‌های آمونیوم آلزینات و آمونیوم کلرید و میزان فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها را نسبت به دو باکتری مختلف گرم کثبت و گرم منفی نشان می‌دهد. فیلم‌های پلی‌یورتانی اصلاح سطح شده با مشتقات آلزینات روی ژل آگار، منطقه خاموشی به‌طور میانگین ۲ cm را نشان دادند.

۳-۳- بررسی ویژگی خون‌کافت مشتقات آمونیوم آلزینات و فیلم پلی‌یورتان

جدول ۲ میزان خون‌کافت مشتقات مختلف آمونیوم آلزینات را نشان می‌دهد. ساختار فضایی و افزایش شاخه‌ای بودن می‌تواند باعث بهبود فرآیند خون‌کافت شود، از طرفی افزایش وزن مولکولی و افزایش دانسیته بار الکتریکی مثبت (نسبت بار الکتریکی مثبت به سطح) سطح مواد در فرآیند خون‌کافت باعث افزایش آن گردد [۳]. براساس نتایج، فیلم پلی‌یورتانی اصلاح سطح شده با نمک TBA-Alg کم‌ترین خون‌کافت را در غلظت‌های مختلف نسبت به نمونه‌های TEA-Alg و DHA-Alg از خود نشان داد. زیرا با افزایش شاخه‌ای شدن زنجیرها در هم‌رفتگی آنها با هم افزایش یافته و سطح گلبول قرمز کمتر در تماس با بار الکتریکی مثبت روی آن قرار می‌گیرد.

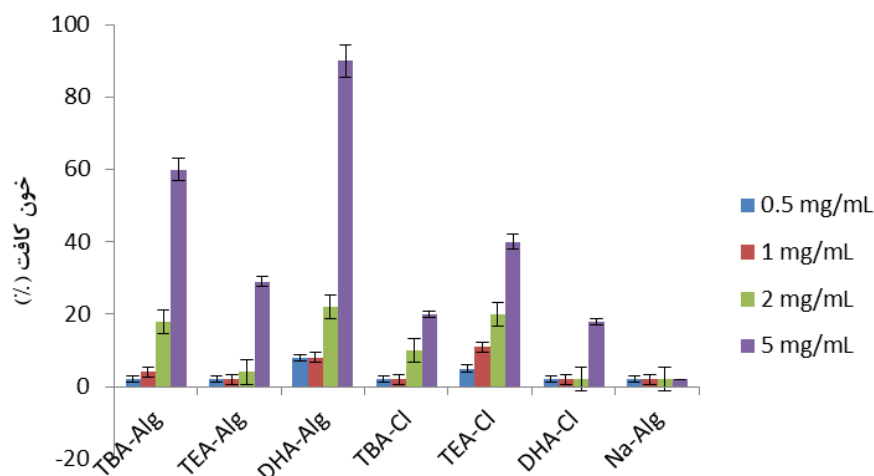


شکل ۱: طیف‌های زیرقرمز (ATR-FTIR) حاصل از نمک‌های آمونیوم کلرید و مشتقات آلژینات

جدول ۱: مقایسه فعالیت ضدباکتری مشتقات آلژینات و نمک‌های آمونیوم کلرید

غلظت محلول مشتقات آمونیوم آلژینات (mg/mL)								
باکتری /استفیلوکوکوس/اورئوس (گرم مثبت)				باکتری ای-کولای (گرم منفی)				
۵	۲	۱	۰/۵	۵	۲	۱	۰/۵	نمونه
۹۵ ± ۵	۹۵ ± ۵	۴۵ ± ۳	۳۰ ± ۵	۵۳ ± ۵	۴۷ ± ۵	۳۳ ± ۳	۱۰ ± ۵	TBA-Alg
۹۵ ± ۵	۵۷ ± ۲	۲۵ ± ۵	۱۵ ± ۳	۵۰ ± ۴	۴۰ ± ۳	۱۰ ± ۵	۵ ± ۵	TEA-Alg
۹۵ ± ۵	۹۵ ± ۵	۹۵ ± ۵	۸۵ ± ۴	۹۵ ± ۵	۶۰ ± ۴	۴۲ ± ۳	۲۴ ± ۵	DHA-Alg
۹۵ ± ۴	۹۵ ± ۴	۵۰ ± ۵	۳۰ ± ۵	۳۰ ± ۴	۲۰ ± ۵	۱۰ ± ۵	-	TBA-Cl

میزان مورب باکتری (%)



شکل ۲: میزان خون کافت محلول مشتقات آلژینات و نمک‌های آمونیوم کلرید



جدول ۲: میزان سمیت سلولی غلظت‌های مختلف مشتقات آمونیوم آلژینات در ۲۴ ساعت

غلظت محلول مشتقات آمونیوم آلژینات (mg/mL)			نمونه	زنده‌مانی سلول (%)
۲	۱	۰/۵		
۵۰	۱۰۰	۱۰۰		
۴۰	۹۸	۹۵		
۱	۱۰	۱۵		
۱۵	۱۰۰	۱۰۰		
			TBA-Alg	
			TEA-Alg	
			DHA-Alg	
			TBA-Cl	

۴- نتیجه‌گیری

از آنجا که عدم حضور باکتری در محیط زخم و نیز حضور گلبول قرمز در بستر زخم برای ادامه فرایند ترمیم ضروری و حیاتی است، در هنگام استفاده از زخم‌پوش وجود این دو ویژگی در آن دارای اهمیت است. در این پژوهش با طراحی پوشش سطحی با استفاده از مشتقات آمونیوم آلژینات روی بستر پلی‌یورتان کاتیونی سعی شد تا غلظت و ترکیب مطلوب در بستر یک زخم‌پوش با بیشترین توانایی ضدباکتری و کمترین مقدار خون‌کافت با کاهش سمیت در سلول‌های پوستی تعیین و انتخاب گردد. به‌طور کلی نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های زیستی مشتقات آمونیوم آلژینات نشان داد، عوامل متفاوتی شامل وزن مولکولی، ساختار شیمیایی، دانسیته بار سطحی ترکیبات آمونیوم، و نیز غلظت این مواد در کنار عوامل موثر سطحی مانند خاصیت ترشوندگی می‌توانند بر ویژگی‌های ضدباکتری، خون‌کافت و سمیت سلولی تاثیرگذار باشند. هم‌چنین این ترکیبات به شکل پوشش سطحی در مقایسه با حالت محلول آنها، ویژگی‌های زیستی مناسب‌تری از خود نشان دادند. در نهایت فیلم پلی‌یورتان اصلاح شده با نمک TBA-Alg در غلظت ۱ mg/mL بهترین گزینه به‌عنوان پوشش با ویژگی‌های زیستی ضدباکتری، خون‌کافت و سمیت است.

مراجع

- [۱] Brigham, P.A. and E. McLoughlin. (۱۹۹۶). Burn incidence and medical care use in the United States: estimates, trends, and data sources. *Journal of Burn Care & Research*, (۲) ۱۷: p. ۹۵-۱۰۷.
- [۲] Haas, K.L. and K.J. Franz. (۲۰۰۹). Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. *Chemical reviews*, ۱۰۹(۱۰): p. ۴۹۲۱-۴۹۶۰.
- [۳] Gibney, K. (۲۰۰۹). Polymeric antibacterial agents: Cytotoxicity and antimicrobial properties of amphiphilic polymers.