



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

Abedi Mohtasab T.P.¹ MSc,
Tamjid E.^{2*} PhD,
Haji-Hosseini R.³ PhD

How to cite this article

Abedi Mohtasab TP, 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.

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 8 μ g/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 ...

¹Micribial Biotechnology Department, Basic Sciences Faculty, Payame Noor University, Tehran, Iran

²Nanobiotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³Biochemistry 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

مطالعه تشکیل بیوفیلیم، خواص ضدباکتریایی و سمیت سلولی داربست نانوالیافی پلی‌کاپرولاکتونی الکتروریسی شده

ترانه پیمان‌ه عابدی، محتسب 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 به دلیل اثرات ضد میکروبی 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 میکرودايلوشن و تشکیل بیوفیلیم بر سوبه‌های استاندارد گرم منفی / *اشرشیا کلی* و *سودوموناس آئرئوزینوزا*، 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 بیوفیلیم بر همه سوبه‌ها دارد اما در مشاهدات میکروسکوپ الکترونی و آزمون میکرودايلوشن بیشترین اثر بر سوبه *سودوموناس آئرئوزینوزا* و در غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره داربست نانوالیافی مشاهده شده، اما در آزمون تشکیل بیوفیلیم بیشترین اثر بر سوبه *استافیلوکوکوس اورئوس* و در غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره حاصل شد. همچنین نتایج آزمون‌های سمیت‌سنجی سلولی نیز نشان داد که عصاره داربست‌های سنتز شده روی سلول‌های سرطانی فیبروبلاست انسانی (HT1080) اثرات سمی بیشتری داشته و پس از ۴۸ ساعت منجر به کاهش در حدود ۴۰٪ تعداد آنها می‌شود.

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

کلیدواژه‌ها: داربست نانوالیافی، پلی‌کاپرولاکتون، ضدباکتریایی، تشکیل بیوفیلیم، 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 خصوصیتی 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 ارزان بودن 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 ($60^\circ C$) و غیرسمی بودن محصولات حاصل از تخریب از مزایای دیگر آن است. اگرچه این پلیمر به دلیل 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 بخشد [7]. علاوه بر عوامل ساختاری، عفونت‌های میکروبی و تشکیل بیوفیلیم 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 ونکومايسين [8]، جنتامایسین و تورامایسین [9]، تتراسایکین و هیدروکلراید [10] به این منظور مورد استفاده قرار گرفته‌اند. از سوی دیگر به دلیل آن که بسیاری از زخم‌های مرتبط با جراحی‌های پوست مستعد تکثیر سلول‌های سرطانی هستند، افزودن داروهای ضدسرطانی از جمله دکسوروبیسیک [11] نیز یکی از علاقمندی‌های پژوهشی در سال‌های اخیر بوده است. این پژوهش‌ها نشان دادند

رویشی SEM مدل XL30 شرکت (فیلیپس؛ ایالات متحده آمریکا) استفاده شد. برای مشاهده اتصال باکتری‌ها به نانوالیاف، داربست‌های حاوی باکتری در گلوکارآلدهید ۲٪ به مدت ۲ ساعت 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 الکترونیسی نانوالیاف پلی کاپرولاکتون

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

مطالعه خواص ضدباکتریایی: نمونه‌های مورد استفاده در آزمون‌های ضدباکتریایی به صورت عصاره‌گیری تهیه شدند. به این ترتیب که ۵۰ میلی‌گرم از هر نمونه در شرایط استریل (در مجاورت دو شعله و زیر هود لامینار) به لوله‌های فالتون استریل حاوی ۵۰ و ۲۰۰ سی‌سی PBS استریل اضافه و به مدت ۲۴ ساعت 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 / *شرشیا کلی* (ATCC ۲۵۹۲۲)، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC ۲۷۸۵۳)، *استرپتوکوکوس موتانس* (ATCC ۱۶۸۳) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC ۲۵۹۲۳) استفاده شد. تهیه محیط کشت مولر هینتون اگر طبق دستورالعمل کارخانه سازنده (مرک؛ آلمان) و داخل پلیت‌های ۱۰ سانتی‌متری با حداکثر عمق ۴ میلی‌متر انجام شد. به منظور بررسی آلودگی محیط‌های ساخته شده پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرار گرفتند. نگهداری محیط‌ها در یخچال تا حداکثر یک هفته قبل از کشت انجام شد.

آزمون‌های تعیین خاصیت ضد میکروبی به روش میکرودایلوشن (رقیق‌سازی در لوله): در این پژوهش برای تعیین خاصیت ضد میکروبی از روش میکرودایلوشن (رقیق‌سازی در لوله) در محیط مولر هینتون برات استفاده شد. از مولر هینتون برات به عنوان رقیق‌کننده و از نمونه حاوی پادتن سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم (پادتن‌طب؛ ایران) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. کشت تازه سویه‌های باکتری و تهیه ۲ میلی‌لیتر 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 ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد که در این سوسپانسیون به اندازه ۱۵۰ میلیون باکتری در هر میلی‌لیتر وجود دارد^[12]. به این ترتیب که با ایجاد رقت‌های سریالی عصاره از اولین تا چاهک یازدهم محدوده غلظت

که نانوالیاف می‌توانند به عنوان ایمپلنت با قابلیت رهایش دارو در طولانی مدت مورد استفاده قرار گرفته و از پیشرفت مقاومت دارویی در درمان سرطان به علت رهایش کنترل نشده داروهای ضدسرطان در روش‌های متداول جلوگیری نمایند^[11]. اگرچه در این مطالعات داربست‌های الیافی پلی کاپرولاکتون به عنوان 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 ۳۰۰ نانومتر تا بالاتر از میکرون بوده‌اند. علی‌رغم اهمیت سطح ویژه در خواص الیاف الکترونیسی شده، تاکنون پژوهشی روی نانوالیاف با قطر کمتر از ۱۰۰ نانومتر 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 پلی کاپرولاکتونی به روش الکترونیسی انجام نشده است. بر این اساس در تحقیق حاضر، داربست نانوالیافی پلی کاپرولاکتون به روش الکترونیسی 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 الکترونیسی شده فوق مورد بررسی قرار گرفت. همچنین میزان چسبندگی باکتری بر نانوالیاف پلی کاپرولاکتونی توسط مشاهدات میکروسکوپ الکترونی با هدف کاربرد برای زخم‌پوش‌های پوست با خواص ضدباکتریایی و ضدسرطانی مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

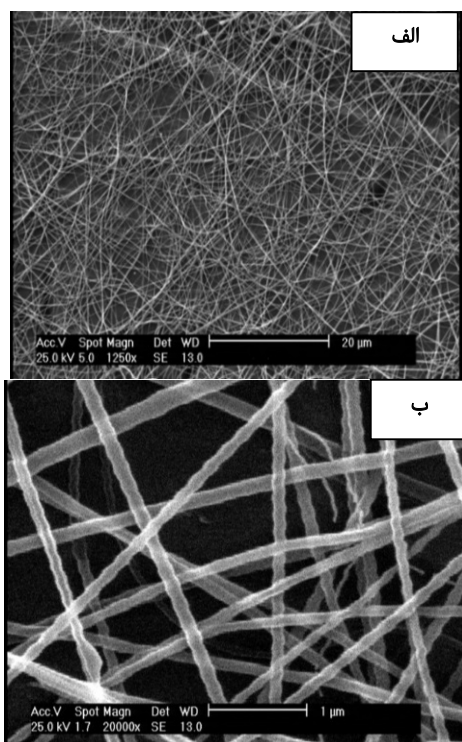
الکترونیسی داربست‌های نانوالیافی: برای ساخت داربست به روش الکترونیسی، ابتدا حلال با ترکیبی از کلروفرم (سیگما؛ آلمان) و متانول (سیگما؛ آلمان) با نسبت حجمی به ترتیب ۳ به ۱ تهیه شد. سپس گرانول‌های PCL (با جرم مولکولی ۸۰۰۰۰؛ سیگما؛ آلمان) به حلال اضافه و با استفاده از هم‌زن مغناطیسی به مدت یک ساعت با سرعت ۴۰۰ دور بر دقیقه مخلوط شدند تا محلول یکنواخت و شفاف حاصل شود. محلول حاصل برای انجام فرآیند الکترونیسی بلافاصله به داخل سرنگ کشیده شد. برای تولید نانوالیاف از دستگاه الکترونیسی مدل ES1000 (فناوران نانومقیاس؛ ایران) بهره گرفته شد و با توجه به مطالعات قبلی^[4-6] فرآیند الکترونیسی با پارامترهای ذکر شده در جدول ۱، صورت گرفت. به منظور دستیابی به ضخامت ۳۰ میکرومتر حجم تزریق یک میلی‌لیتر در نظر گرفته شد و نمونه‌ها پس از اتمام الکترونیسی به منظور 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: به منظور بررسی ساختار نانوالیاف و نیز ارزیابی شکل و مورفولوژی سلول‌های کشت شده روی داربست‌های نانوفیبری تهیه شده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی

۷۵ و ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از عصاره‌ها تیمار شده و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت 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 به مدت ۴ ساعت و سپس افزودن اسیدایزوپروپانول ارزیابی و میزان جذب در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزایدر مدل elx808 (بیوتک؛ ایالات متحده آمریکا) ثبت شد. مقادیر جذب نسبت به مقادیر جذب گروه‌های شاهد نرماله‌شده و براساس میانگین و با احتساب انحراف معیار 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 ۱۰۰-۲۰۰ نانومتر 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 میکرودیالوژن: نتایج مطالعه خواص ضدباکتریایی عصاره‌های تهیه‌شده از داربست نانوالیافی پلی‌کاپرولاکتون الکتروریسی‌شده بر چهار سویه *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استرپتوکوکوس*

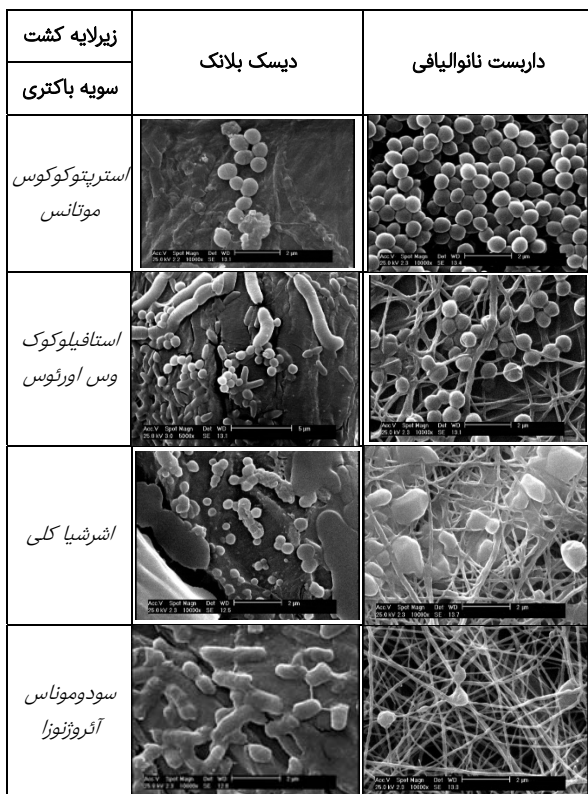
را ایجاد کرده و در چاهک دوازدهم به‌عنوان کنترل (غلظت صفر) هیچ عصاره‌ای اضافه نشد. سپس در هر ۱۲ چاهک ۱۰ میکرولیتر از باکتری که با کدورت نیم‌مک‌فارلند تهیه شده بود اضافه نموده و در آخر میکروپلیت ۹۶ خانه در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه‌گذاری شد. پس از طی زمان فوق با استفاده از دستگاه الایزا ریدر مقدار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

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

ابتدا در پلیت ۹۶ خانه در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط LB حاوی ۱٪ سوکروز ریخته و سپس از عصاره تهیه‌شده از داربست‌ها به چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد و به‌ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر 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 ۱۰ میکرولیتر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* با غلظت نیم‌مک‌فارلند اضافه و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه‌گذاری شدند. پس از زمان انکوبه‌گذاری محیط چاهک‌ها را خالی نموده و سپس سه‌بار با PBS شسته، به آن ۲۵۰ میکرولیتر کریستال ویوله اضافه و بعد از گذشت ۴۵ دقیقه 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 الایزایدر جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر 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 ۴۸ خانه‌ای قرار گرفته و ۵۰۰ میکرولیتر بافر فیزیولوژی PBS به هر کدام از نمونه‌ها اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷°C با دور ۵۰ rpm هم‌زده شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر 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™ (انستیتو پاستور؛ 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 (۲۵٪) استفاده و سپس سانتریفیوژ و کشت در پلیت کشت انجام شد. برای انجام آزمون MTT تعداد ۱۰ سلول در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه کشت شده و پس از ۲۴ ساعت با غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰،

روی باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا کاملاً مشهود است یعنی این داربست توانست اثر کاملاً مهارکنندگی بر باکتری های فوق گذاشته و از رشد باکتری های گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا جلوگیری کند.

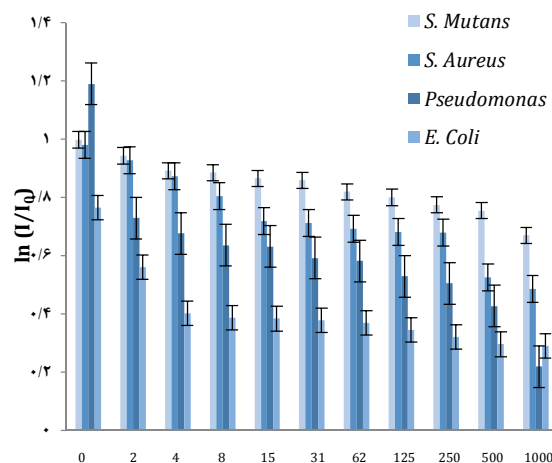


شکل ۲) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی چهار سویه باکتری های استرپتوکوکوس موتانس، سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس ورس/اورئوس روی: دیسک بلانک (ستون چپ) و داربست نانوالیافی پلی کاپرولاکتون (ستون راست)

تعیین اثر عصاره داربست نانوالیافی بر تشکیل بیوفیلم: آزمون تشکیل بیوفیلم در حضور غلظت های مختلف عصاره داربست نانوالیافی بر دو سویه مختلف باکتری های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس/اورئوس انجام شد. همان طور که مشاهده می شود میزان تشکیل بیوفیلم در واحد سطح برای سویه های مختلف، مقادیر متفاوتی داشته به طوری که فعالیت ضدبیوفیلم داربست های نانوالیافی پلی کاپرولاکتون نشان می دهد که اثر مهاری توسط داربست های پلی کاپرولاکتون 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 می دهد که بیشترین تاثیر بر عدم تشکیل بیوفیلم اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس/اورئوس به ترتیب در غلظت های ۲۵۰ و ۸ از عصاره نانوداربست پلی کاپرولاکتونی حاصل شده است.

بررسی میزان زندهمانی سلول ها به وسیله آنالیز MTT: نمودار ۲ نتایج آزمون زندهمانی بر دو رده سلول سرطانی شامل هلا و HT1080 را در تماس با عصاره داربست های نانوالیافی نشان

موتانس و استافیلوکوکوس/اورئوس توسط آزمون میکرودایلوشن در نمودار ۱ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود اثر بازدارنده رشد در هر چهار سویه باکتری مشاهده شد که این نتایج توسط آنالیز واریانس و آزمون توکی در نرم افزار MINI TAB 18 در محدوده $p < 0.05$ معنی دار بود. به طوری که در سویه های گرم منفی شامل سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیا کلی اثر کشندگی داشته که به وضوح قابل مشاهده است، حال آن که بر باکتری های گرم مثبت شامل استرپتوکوکوس موتانس و استافیلوکوکوس/اورئوس تنها در کاهش رشد باکتری موثر بوده است.



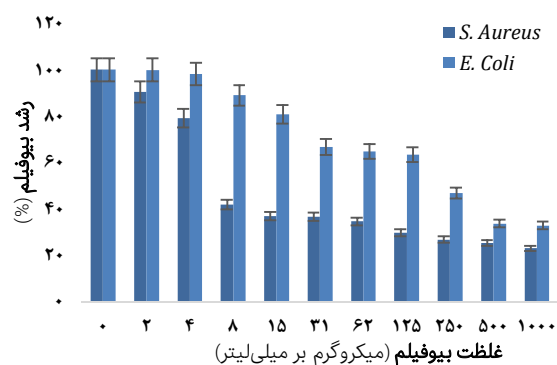
غلظت عصاره (میکروگرم بر میلی لیتر)

نمودار ۱) فعالیت ضدباکتریایی عصاره نانوالیاف الکتروپرسی شده پلی کاپرولاکتون بر چهار سویه باکتری استرپتوکوکوس موتانس، استافیلوکوکوس/اورئوس، سودوموناس، و اشرشیا کلی در آزمون میکرودایلوشن در طول موج ۶۲۰ نانومتر ($p < 0.05$)

مشاهدات میکروسکوپ الکترون روبشی تشکیل بیوفیلم روی داربست نانوالیافی: تعیین میزان و مورفولوژی اتصالات هر چهار سویه باکتری مورد مطالعه روی داربست نانوالیافی پلی کاپرولاکتون با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی در شکل ۲ نشان می دهد که نانوالیاف الکتروپرسی شده پلی کاپرولاکتون روی باکتری های 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 باکتری ها گذاشته و از تعداد باکتری های گرم مثبت استرپتوکوکوس موتانس بکاهد. اثرات مهار تشکیل بیوفیلم روی باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس/اورئوس مشهود نیست فقط این نانوداربست توانسته بر تعداد باکتری ها اثرگذار باشد که نشان دهنده اثرات کمتر این داربست بر کاهش تعداد باکتری های 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 باکتری های فوق بگذارد و از تعداد باکتری های گرم منفی اشرشیا کلی بکاهد. چنان که مشاهده می شود اثرات مهار تشکیل بیوفیلم

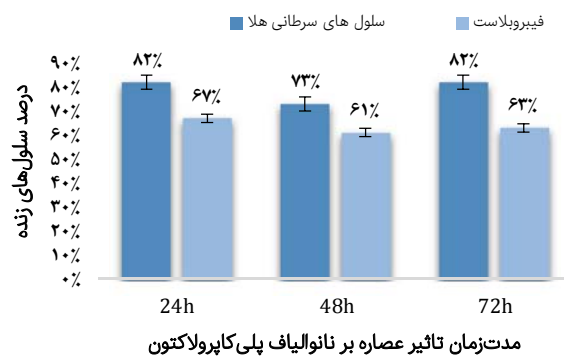
نانوالیافی فاقد دارو به میزان قابل توجهی قادر به کنترل چسبندگی *سودوموناس آئروژینوزا* بوده‌اند. همچنین مشاهدات *حسان* و همکاران در ۲۰۱۷ که روی خصوصیات، بارگذاری و رهایش دارو و فعالیت ضدباکتری غشای الکتروریسی‌شده نانو هیدروکسی‌آپاتیت/پلی‌کاپرولاکتون مطالعه نموده بودند، نتایج مشابهی را ارائه داده به‌طوری 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 میانگینش باکتری‌ها و اتصال آنها با یکدیگر [19] و سیگنال‌رسانی‌های ناشی از فاکتورهای تنش 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 ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر، به کمتر از ۴۰٪ رسیده حال آن که برای کاهش بیوفیلم به میزان مشابه در باکتری *اشرشیا کلی*، غلظت ۵۰۰ میکروگرم 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 ۵۷۰ نانومتر)، نتایج در مقایسه با بیوفیلم تشکیل‌شده بر نمونه کنترل که فاقد عصاره بوده نرماله شده و به‌صورت درصد گزارش شده‌اند ($p < 0.001$).

می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، میزان زنده‌مانی سلول‌های هلا در مجاورت عصاره داربست‌های نانوالیافی در مدت ۷۲ ساعت 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 ۲۴ ساعت اول کشت به میزان قابل توجهی کاهش یافته و پس از ۷۲ ساعت 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 ۴۸، ۷۲ و ۲۴ ساعت، 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 میکروداپلوشن 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 ضد میکروبی 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

مشاهدات میکروسکوپ الکترونی و آزمون میکرودايلوشن بیشترین اثر بر سويه سودوموناس آئروژینوزا و در غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر عصاره داربست نانوالیافی مشاهده شد، اما در آزمون تشکیل بیوفیلم بیشترین اثر بر سويه استافیلوکوکوس اورئوس و در غلظت ۸ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره حاصل شده است. همچنین نتایج آزمون های سمیت سنجی سلولی نیز نشان داد که این زخم پوش ها می توانند مانع از رشد سلول های سرطانی خصوصاً سلول های سرطانی فیبروبلاست انسانی در مدت زمان ۴۸ ساعت شده و تعداد آنها را حدود ۴۰ کاهش دهند. به این ترتیب به نظر می رسد زخم پوش های نانوالیافی الکترورسی شده می توانند گزینه امیدبخشی در کاربردهای مهندسی بافت با قابلیت جلوگیری از تشکیل بیوفیلم در محل ترمیم زخم و کاهش تعداد سلول های سرطانی پوست باشند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله از معاونت های محترم پژوهشی دانشگاه های تربیت مدرس و پیام نور تهران شرق برای ارایه خدمات و تجهیزات آزمایشگاهی سپاسگزاری می نمایند.

تأییدیه اخلاقی: در این پژوهش هیچ گونه نمونه گیری یا آزمونی بر انسان و حیوان یا مواد با منشا انسانی یا حیوانی انجام نشده است. رده های سلولی مورد استفاده در این پژوهش استاندارد بوده و از انستیتو پاستور ایران خریداری شده اند.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می دارند که هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: ترانه پیمان عابدی محتسب (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۴۵٪)؛ الناز تمجید (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۵٪)؛ رضا حاجی حسینی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)

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

منابع

- 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.
- Mahdavi Shahrī 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]
- 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.

نتایج تست MTT نیز نشان دهنده اختلاف معنی دار میان دو گروه بررسی شونده سلول های سرطانی انسانی است. در این مطالعه مشاهده شد که تیمار با نانوالیاف پلی کاپرولاکتون، تعداد سلول های سرطانی فیبروبلاست انسانی را در ۲۴ ساعت اول کشت کاهش می دهد و بیشترین تاثیر را در ۴۸ ساعت بعد از کشت و تیمار با نانوالیاف پلی کاپرولاکتون داشت. در مقایسه تاثیر این نانوالیاف بر سلول های کشت شده سرطانی هلا تغییر محسوسی در ۲۴ ساعت اول تیمار نشان نداده ولی در ۴۸ ساعت بعد از تیمار اثرات خوبی را نشان می دهد. در واقع بسته به میزان غلظت عصاره نانوالیاف پلی کاپرولاکتون بیشترین تاثیر بر سلول های سرطانی را می توان در ۴۸ ساعت پس از قرارگیری با تیمار مشاهده نمود که نیاز به بررسی های بیشتری با غلظت عصاره بیشتر دارد. نتایج این بررسی با مشاهدات بالاکریشنا و همکاران سال ۲۰۱۸ که روی نانوالیاف پلی کاپرولاکتون الکترورسی شده با دوکسوروبیسین با فعالیت طولانی مدت دارو انجام شده تطابق دارد [11]. پس از ۷۲ ساعت میزان زنده ماندن سلول های هلا مجدداً افزایش می یابد که در تطابق با نتایج گزارش شده قبلی است [21-24] که به نظر می رسد ناشی از سرعت بسیار بالای رشد این رده سلولی و نامیرایی آن است [24, 25]. به این ترتیب به نظر می رسد علی رغم مرگ تعداد قابل توجهی از سلول ها در بازه ۴۸ ساعت و رسیدن تعداد سلول های زنده به ۷۳٪، همان میزان سلول باقی مانده نیز با سرعت تکثیر بسیار بالا پس از ۷۲ ساعت جمعیت قابل توجهی خواهند داشت. اما نکته شایان توجه آن است که علی رغم آن که این رده سلولی دارای زمان دوبرابر شدن ۲۴ ساعت است انتظار می رود که در صورت عدم تیمار تعداد سلول های زنده در ساعت ۷۲، جمعیت سلول های زنده به دوبرابر ساعت ۴۸ یعنی ۱۱۳٪ برسد، حال آن که تعداد سلول های زنده تیمار شده با عصاره رقیقی از نانوالیاف بدون تغییر فاحش باقی مانده که این نتیجه نشان دهنده اثر قابل توجه عصاره بر مهار رشد این رده سلولی است.

محدودیت مطالعه حاضر استفاده از عصاره نانوالیاف برای آزمون های سلولی بود که در صورت انجام آزمون به صورت مستقیم می توان اثرات ساختار نانوالیافی بر کشت سلول ها را نیز مورد مطالعه قرار داد. در مطالعات آینده، در نظر است آزمون های برون تنی علاوه بر رده های سرطانی، بر رده های نرمال پوست نیز انجام شود. همچنین می توان با انجام آزمون های درون تنی از زیست سازگاری زخم پوش های بر پایه نانوالیاف مورد مطالعه در این پژوهش برای کاربردهای بالینی اطمینان حاصل نمود.

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که نانوالیاف پلی کاپرولاکتونی الکترورسی شده بالقوه می تواند گزینه مناسبی برای زخم پوش های با قابلیت ترمیم زخم و مهندسی بافت باشد. این نانوالیاف پلیمری زیست تخریب پذیر خواص ضدباکتریایی مواد را بهبود داده اند اما بر سويه های مختلف میزان اثر متفاوتی داشته اند به طوری که در

- 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, Shokrollahi F. Effect of interface on mechanical properties and biodegradation of PCL HAp supramolecular nanocomposites. *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 nanofiber 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, Kioekli 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- Mourinho 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- Lubner P, Bartelt E, Genschow E, Wagner J, Hahn H. Comparison of broth microdilution, E test, and agar