

## Fabrication and Characterization of Nanofibrous Scaffold Based on Chitosan Containing Cerium Oxide Nanoparticles for Wound Healing Application

Adeleh Gholipour-Kanani<sup>1\*</sup>, Azadeh Asefnejad<sup>2</sup>, Kimiya Azadbakht<sup>2</sup>

1. Department of Textile Engineering, 2. Department of Biomedical Engineering; Science and Research Branch, Islamic Azad University, Postal Code 14778-93855, Tehran, Iran

Received: 5 March 2023, accepted: 24 May 2023

### ABSTRACT

#### Keywords:

chitosan,  
poly(vinyl alcohol),  
citric acid,  
cerium oxide nanoparticles,  
anti-bacterial activity

**Hypothesis:** Incorporating different types of nanoparticles, especially metal oxide nanoparticles, into the polymeric nanofiber substrate improves different properties of the web. In this research, citric acid is used as an environmentally friendly cross-linking agent to reduce the hydrophilic property of chitosan-polyvinyl alcohol web. Cerium oxide nanoparticles (nanoceria) as an antioxidant and antibacterial agent are used to increase the biological capabilities of the web for healing applications.

**Methods:** Chitosan (CS)/poly(vinyl alcohol) (PVA)/citric acid (CA) nanofibers with the mass ratios of 1:1:0.5 and 2:3:1 (CS:PVA:CA) were prepared and electrospun. Nanoceria was loaded into the optimal blend prepared for electrospinning. In continuation, the physical-morphological properties, cell compatibility, non-cytotoxicity, and antibacterial activity of the resulting webs were investigated.

**Findings:** Physical-morphological investigations show that the CS:PVA:CA (2:3:1) nanofiber which was electrospun under 15 kV and 18 cm is the optimal nanofiber with an average diameter of  $175 \pm 29$  nm. The contact angle is about 42 degrees, indicating a suitable decrease in hydrophilicity and maintaining the physical integrity of the web. The SEM images show a bead-less morphology with an average diameter of  $274 \pm 38$  nm for nanofibrous web containing 1.5% (by wt)  $\text{CeO}_2$ . The presence of nanoceria and interactions of the functional groups in the components were evident in their EDS and FTIR spectra, respectively. The results of the cell-culturing demonstrate the proper growth and proliferation of fibroblast cells on both with and without-nanoceria webs. The result of the MTT test confirms the non-toxicity of both scaffolds. The antibacterial investigations show improvements in antibacterial activities of the nanofibers containing cerium-oxide against both gram-positive and gram-negative bacteria. In general, the results determined that the presence of nanoceria in chitosan-polyvinyl-alcohol-citric acid electrospun nanofibers has clearly improved the biological properties, especially the antibacterial behavior of the obtained web, so it can be used as a suitable dressing for wound healing application.

(\* )To whom correspondence should be addressed.

E-mail: [a.gholipour@srbiau.ac.ir](mailto:a.gholipour@srbiau.ac.ir)

#### Please cite this article using:

Gholipour-Kanani A., Azadbakht K., Fabrication and Characterization of Nanofibrous Scaffold Based on Chitosan Containing Cerium Oxide Nanoparticles for Wound Healing Application, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **35**, 580-594, 2023.

# ساخت و مشخصه‌یابی داربست نانولیفی بر پایه کیتوسان دارای نانوذرات سریم اکسید برای کاربرد در ترمیم زخم

عادلہ قلی‌پور کنعانی<sup>۱\*</sup>، آزاده آصف‌نژاد<sup>۲</sup>، کیمیا آزادبخت<sup>۲</sup>

تهران دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، کد پستی ۱۴۷۷۸۹۳۸۵۵:

۱- دانشکده فنی و مهندسی، گروه مهندسی نساجی، ۲- دانشکده علوم و فناوری‌های پزشکی، گروه مهندسی پزشکی

دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۴، پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۳

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

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،

سال سی و پنجم، شماره ۶،

صفحه ۵۹۸-۵۸۵، ۱۴۰۱

ISSN: 1016-3255

Online ISSN: 2008-0883

DOI: 10.22063/JIPST.2023.3363.2220

## چکیده

**فرضیه:** جادادن انواع مختلف نانوذرات به‌ویژه نانوذرات فلز اکسید در زیرآیند نانوالیاف پلیمری سبب افزایش خواص لایه نانولیفی می‌شود. در این پژوهش از سیتریک اسید به‌عنوان عامل ایجاد اتصال عرضی دوست‌دار محیط‌زیست برای کاهش خاصیت آبدوستی لایه کیتوسان-پلی(وینیل الکل) استفاده شد. از نانوذرات سریم اکسید (نانوسریا) به‌عنوان عامل ضدآکسند و ضدباکتری به‌منظور افزایش قابلیت‌های زیستی لایه در کاربردهای ترمیم زخم استفاده شد.

**روش‌ها:** بدین منظور محلول‌های ترکیبی کیتوسان (CS)-پلی(وینیل الکل) (PVA)-سیتریک اسید (CA) با نسبت‌های وزنی ۱/۵:۱ و ۲/۳:۱ (CS:PVA:CA) تهیه و پس از الکتروریسی و تعیین نمونه بهینه، نانوسریا (CeO<sub>2</sub>) در محلول بهینه بارگذاری و الکتروریسی شدند. سپس، خواص شکل‌شناسی فیزیکی، زاویه تماس، یاخته‌سازگاری، نبود سمیت یاخته‌ای و خاصیت ضدباکتریایی لایه‌های حاصل بررسی شد.

**یافته‌ها:** بررسی‌های فیزیکی-شکل‌شناسی نشان می‌دهد، نمونه CS:PVA:CA با نسبت ۲/۳:۱ الکتروریسی شده در ولتاژ ۱۵ kV و فاصله ۱۸ cm با قطر متوسط ۱۷۵±۲۹ nm بهینه بوده و زاویه تماس حدود ۴۲° نشان‌دهنده کاهش مناسب خاصیت آبدوستی و امکان حفظ تمامیت فیزیکی لایه است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی شکل‌شناسی بدون دانه‌تسبیجی با قطر متوسط ۲۷۴±۳۸ nm برای لایه نانولیفی CS:PVA:CA دارای ۱/۵٪ از N<sub>2</sub>O را نشان داد. وجود نانوسریا در نمودار EDS و برهم‌کنش‌های بین گروه‌های عاملی در طیف‌های FTIR دیده شد. نتایج آزمون کشت یاخته‌ای حاکی از رشد و تکثیر مناسب یاخته‌های فیروبلاست روی نمونه‌های بدون نانوسریا و دارای نانوسریاست. نتیجه آزمون MTT تأییدکننده نبود سمیت در هر دو نمونه است. بررسی‌های ضدباکتری نشان‌دهنده بهبود فعالیت ضدباکتری نانوالیاف دارای سریم اکسید در برابر هر دو سویه باکتری گرم مثبت و گرم منفی است. به‌طور کلی نتایج نشان داد، وجود نانوسریا در نانوالیاف الکتروریسی‌شده کیتوسان-پلی(وینیل الکل)-سیتریک اسید به‌وضوح سبب بهبود خواص زیستی به‌ویژه رفتار ضدباکتریایی لایه نانولیفی به‌دست‌آمده شده است که می‌تواند به‌عنوان زخم‌پوش مناسب برای کاربرد در ترمیم زخم استفاده شود.

## واژه‌های کلیدی

کیتوسان،  
پلی(وینیل الکل)،  
سیتریک اسید،  
نانوذرات سریم اکسید،  
فعالیت ضدباکتریایی

\*مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:

a.gholipour@srbiau.ac.ir

## مقدمه

ترمیم جراحات‌های پوستی به دلیل نقش حیاتی پوست در محافظت از سایر اندام‌های بدن همواره یکی از مهم‌ترین چالش‌های پزشکان و دانشمندان علم زیست‌شناسی به‌شمار می‌آید. با توجه به اینکه پوست خارجی‌ترین عضو بدن بوده و همواره در تماس با محیط اطراف است، احتمال آلوده شدن زخم به عوامل بیماری‌زای عفونت‌زا که نقش مؤثری در کند شدن فرایند ترمیم دارند، بسیار زیاد است. از سوی دیگر، عوامل داخلی مانند ضعف سیستم ایمنی بدن به دلیل بیماری‌های زمینه‌ای و شرایط جسمانی فرد در گسترش و مزمن شدن عفونت نقش مهمی را ایفا می‌کند. بنابراین یکی از مهم‌ترین چالش‌ها در ترمیم انواع زخم‌های پوستی امکان کنترل عفونت است [۱]. در این راستا، طراحی و ساخت پوشش‌هایی با قابلیت‌های ضدباکتریایی زیاد بسیار حائز اهمیت است. در این میان تلاش‌های زیادی برای تولید انواع زخم‌پوش‌های ترمیم‌کننده با خاصیت ضدباکتریایی با استفاده از انواع مواد ضد میکروب همچون برخی از پلیمرهای طبیعی مانند کیتوسان، انواع داروها و آنتی‌بیوتیک‌ها، عصاره‌های طبیعی گیاهی یا حیوانی، ذرات معدنی، فلزی یا سرامیکی انجام شده است [۱، ۲]. کیتوسان پلی‌ساکارید طبیعی مشتق شده از کیتین است که از آب‌کافت پیوندهای N-استیل در کیتین و تبدیل آن‌ها به گروه‌های آمینو تشکیل می‌شود. این زیست‌پلیمر افزون بر ویژگی‌های زیست‌سازگاری، چسبندگی مناسب یاخته‌ای و ضد میکروبی، به دلیل شباهت ساختار شیمیایی به گلوکوز آمینوگلیکان‌های طبیعی موجود در ماتریس برون‌یاخته‌ای طبیعی پوست سبب سرعت‌دهی به مهاجرت زیست‌مولکول‌های حیاتی برای ترمیم به محل زخم می‌شود. همچنین با توجه به اندازه زنجیر پلیمری کیتوسان و پلی‌کاتیونی بودن آن قابلیت پوشاندن پایانه‌های عصبی و کنترل درد را نیز دارد. از این رو، این پلیمر دارای خواص زیستی و ذاتی شایان توجهی در ترمیم زخم است [۳]. امروزه، استفاده از نانوذرات اکسید فلزی مانند نانوذرات سریم اکسید به‌عنوان افزودنی برای ارتقای خواص زیستی داربست‌های ترمیم‌کننده و مهندسی بافت بسیار مورد توجه دانشمندان علم زیست‌شناسی قرار گرفته است. یکی از انواع بسیار کارآمد نانوذرات اکسید فلزی، نانوذرات سریم اکسید یا نانوسریا (CeO<sub>2</sub>, CeNPs) است که ماده سرامیکی با ساختار مکعبی فلوریت‌گونه و دارای شکل بلوری پایدار تا رسیدن به دمای ذوب خود (حدود ۲۷۰۰°C) است [۴، ۵]. یکی از ویژگی‌های شاخص این ماده وجود تعداد مؤثری از نقاط فعال کاهنده در ساختار آن است که قابلیت تبادل اکسیژن دارند. نانوسریا امروزه به‌عنوان عامل درمانی در پزشکی بازساختی و مهندسی بافت شناخته شده است. این نانوذرات سبب تحریک تکثیر یاخته‌ای در شرایط آزمایشگاهی و تسریع در بهبود جراحات‌ها در شرایط درون‌تنی و

بالینی می‌شوند [۴]. نتایج پژوهش‌های Ermakov و همکاران [۶] نشان می‌دهد، نانوسریا به دلیل خواص ضد اکسندگی خود سبب از بین رفتن گونه‌های اکسیژن فعال در ناحیه زخم می‌شوند و بدین ترتیب بازسازی بافت را بهبود می‌دهند. در واقع اگر عواملی در بدن سبب از بین رفتن تعادل بین گونه‌های فعال اکسیژن و مهارکننده‌های آن‌ها شود، سطح گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد و سبب ایجاد تنش اکسایشی (oxidative stress) می‌شود که عاملی در آسیب به یاخته‌ها به‌ویژه DNA و سایر زیست‌مولکول‌های بدن است [۷]. یکی از عواملی که سبب برهم‌خوردن این تعادل می‌شود، بروز جراحی و به دنبال آن عفونت در بدن است. بنابراین، نقش مواد ضد اکسندگی مانند نانوذرات سریم اکسید در این هنگام بسیار پررنگ‌تر می‌شود. از سوی دیگر، نانوسریا ماده معدنی با خواص ضدباکتریایی نسبتاً عالی است و اثرهای بسیار مثبتی در ارتقای متابولیسم و فرایند ترمیم زخم نشان می‌دهد [۸].

افزون بر اهمیت استفاده از مواد افزودنی ضد میکروب در ترکیب زخم‌پوش، نوع ساختار فیزیکی و شکل‌شناسی پوشش تولیدشده برای ترمیم زخم نیز بسیار مهم است. در این راستا با وجود اینکه زخم‌پوش‌هایی با انواع ساختارهای اسفنجی، فیلمی، هیدروژلی و لیفی ساخته و ارزیابی می‌شوند، اما زخم‌پوش‌ها با ساختارهای نانولیفی از توجه ویژه‌ای برخوردارند. در واقع، با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد ساختارهای نانولیفی و به دلیل شباهت ریزساختار آن‌ها به ماتریس برون‌یاخته‌ای و وجود تخلخل‌های شبکه‌ای به هم پیوسته، این ساختارها کاربردهای شایان توجهی در ترمیم و بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده دارند [۲]. تاکنون روش‌هایی چون خودگردایش (self-assembling)، جدایی فاز و الکتروریسی برای تولید نانوالیاف مصرفی در کاربردهای پزشکی مورد توجه قرار گرفته است که الکتروریسی و فنون تکمیلی آن متداول‌ترین این روش‌هاست [۹]. به‌طور کلی، زخم‌پوش‌های نانولیفی به دلیل شبیه‌سازی ماتریس برون‌یاخته‌ای پوست و امکان ایجاد مسیرهای انتقال سیگنال‌های زیست‌شیمیایی داربست‌های نانولیفی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. تاکنون پوشش‌های نانولیفی زیادی بر پایه مواد اولیه طبیعی و سنتزی معرفی شده‌اند که از جمله می‌توان به داربست‌های نانولیفی بر پایه کیتوسان، کلاژن، فیبروئین ابریشم، آلژینات، پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌(وینیل الکل) اشاره کرد [۱]. در این زمینه، به دلیل ویژگی‌های زیستی بسیار عالی کیتوسان در ترمیم زخم، یکی از پرتکرارترین مطالعات، روی داربست‌های نانولیفی بر پایه کیتوسان انجام شده است. کیتوسان به دلیل گران‌روی زیاد محلول و پلی‌کاتیونی بودن در محیط‌های آبی، به کنترل دافعه بارهای هم‌نام حین فرایند الکتروریسی

نیاز دارد. از این رو، محلول‌های دو یا سه جزئی کیتوسان در ترکیب با محلول‌های سایر پلیمرها مانند پلی(وینیل الکل)، پلی(اتیلن گلیکول) و پلی(اتیلن اکسید) تهیه و الکترورسی می‌شوند [۱۰]. از این رو، به دلیل آب دوستی زیاد اجزای ترکیب، نانوالیاف مخلوط حاصل به منظور قابلیت حفظ تمامیت فیزیکی در محیط بدن نیازمند فرایند اتصال عرضی برای کاهش خاصیت آب دوستی هستند [۱۱]. اکثر عوامل ایجاد اتصال عرضی مانند گلوترآلدهید از دسته مواد شیمیایی سمی به شمار می‌آیند که افزون بر کنترل دشوار مقدار اتصال‌های عرضی، حتی پس از بارها شست‌وشو امکان برجای ماندن مقادیر جزئی از آن در وب اتصال عرضی شده وجود دارد که می‌تواند سبب سمیت‌زایی یاخته‌ای و تحریک ایمنی‌زایی شود. بنابراین، امروزه یافتن اتصال‌دهنده‌های عرضی طبیعی یا زیست‌سازگار بدین منظور دارای اهمیت است. مائیک اسید، تارتاریک اسید و سیتریک اسید از جمله عوامل اتصال‌دهنده عرضی سبز و دوست‌دار محیط‌زیست هستند [۱۲]. Czubulya و همکاران [۱۳] موفق به تولید نانوالیاف کیتوسان-پلی(وینیل الکل) و اتصال عرضی آن با ورود سیتریک اسید در محلول پلیمری و انجام عملیات گرمایی پس از الکترورسی وب نانولیفی شده‌اند. آن‌ها گزارش کردند، سیتریک اسید به‌عنوان اتصال‌دهنده عرضی یونی با آغازگر گرمایی می‌تواند با حفظ قابلیت‌های زیستی وب سبب ارتقای نسبی آب‌گریزی شود. آن‌ها طبق نتایج به‌دست‌آمده گزارش کردند، نمونه دارای پلی(وینیل الکل) (۶/۵٪) - کیتوسان (۱/۳٪) - سیتریک اسید (۲/۹٪) نمونه بهینه است که زاویه تماس آن پس از اتصال عرضی به حدود ۴۲° رسیده است. نانوالیاف الکترورسی شده بستر بسیار مناسبی برای بارگذاری و انتقال کنترل‌شده دارو و مواد ضدباکتری است. از این رو، مطالعات زیادی روی بارگذاری انواع داروهای شیمیایی و نیز عوامل ضد میکروبی چون نانوذرات و عصاره‌های طبیعی در بستر نانوالیاف برای انواع مصارف به‌ویژه مصارف ترمیم بافت پوست انجام شده است [۱۴]. در این میان با توجه به ویژگی‌های نام‌برده از نانوالیاف و خواص زیستی عالی نانوذرات سریم اکسید به‌عنوان عامل درمانی، مطالعاتی درباره بارگذاری نانوسریا در ساختارهای نانولیفی پلیمری انجام شده است. در کار پژوهشی Joseph و همکاران [۱۵] موفق به ساخت نانوالیاف پلی‌کاپرلاکتون دارای نانوسریا و ارزیابی شکل‌شناسی و زیستی آن شدند. نتایج نشان داد، نانوالیاف دارای نانوذرات سریم اکسید سبب ارتقای چسبندگی یاخته‌ای و رگ‌زایی می‌شوند.

هدف اصلی در این پژوهش، تلفیق ویژگی‌های منحصر به فرد نانوالیاف با خواص زیستی مناسب کیتوسان و خواص عالی ضدباکتریایی نانوسریا به منظور ایجاد پوشش مناسب با قابلیت استفاده در ترمیم زخم است. بر اساس اطلاعات به‌دست‌آمده، تولید نانوالیاف کیتوسان دارای نانوسریا برای کاربرد در ترمیم زخم تاکنون گزارش نشده است. همچنین استفاده از سیتریک اسید به‌عنوان عامل اتصال‌دهنده عرضی دوست‌دار محیط‌زیست سبب عدم نیاز به فرایند اتصال عرضی در معرض بخارات و مواد سمی می‌شود. در این مطالعه، پس از تهیه لایه‌های نانولیفی، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی لایه‌های الکترورسی شده در هر دو حالت بدون نانوسریا و با آن ارزیابی شد. همچنین ویژگی‌های یاخته‌سازگاری، نبود سمیت یاخته‌ای و خاصیت ضدباکتریایی داربست‌های نانولیفی حاصل بررسی شد و در نهایت قابلیت کاربرد آن به‌عنوان زخم‌پوش ضد میکروب ارزیابی شد.

## تجربی

### مواد

در این پژوهش، کیتوسان، CS، با وزن مولکولی متوسط (۳۵۰-۲۰۰ kDa) و درجه دی‌استیل‌زدایی ۸۵٪ پلی(وینیل الکل) (PVA) نوع آزمایشگاهی با وزن مولکولی ۷۲۰۰۰ Da از شرکت Aldrich-Sigma خریداری شدند. سیتریک اسید (CA) و استیک اسید نوع آزمایشگاهی از شرکت Merck خریداری شدند. نانوپودر سریم اکسید (3-38-1306CAS number) با وزن مولکولی حدود ۱۷۲ Da کد ۵۴۴۸۴۱ از شرکت Aldrich-Sigma خریداری شد.

### تهیه وب نانولیفی کیتوسان-پلی(وینیل الکل)-سیتریک اسید

تولید داربست پلیمری کیتوسان (CS)-پلی(وینیل الکل)(PVA)-سیتریک اسید (CA) با روش الکترورسی انجام شده که در آن سیتریک اسید به‌عنوان عامل اتصال عرضی استفاده می‌شود [۱۳]. در این راستا، ابتدا محلول ۵٪ وزنی-حجمی از کیتوسان در استیک اسید ۲٪ حجمی تهیه شد و به مدت ۱۲ h تحت همزن مغناطیسی با دمای ۴۰°C هم‌زده شد تا محلول شفاف حاصل شود. سپس، محلول شفاف ۱۰٪ پلی(وینیل الکل) در آب مقطر در دمای ۳۰°C و پس از ۶ h هم‌زدن با همزن مغناطیسی تهیه شد. سپس، با اضافه کردن مقادیر مناسب از هر یک از محلول‌های کیتوسان و پلی(وینیل الکل) و سیتریک اسید ترکیباتی با نسبت‌های وزنی ۱/۵:۱:۰ و ۲:۳:۱ (CS:PVA:CA) تهیه شد و به مدت ۱ h دیگر در دمای محیط هم‌زده شد. محلول‌های ترکیبی حاصل در شرایط مختلف ولتاژ (۲۰ kV و ۱۵) و فاصله نازل تا جمع‌کننده (۱۲ و ۱۸ cm) الکترورسی شدند. به منظور تکمیل فرایند اتصال عرضی، نمونه‌های الکترورسی شده

پاشنده انرژی (EDS) و شکل‌شناسی نانوذرات با تصویربرداری میکروسکوپی الکترونی پویشی مجهز به آشکارساز پراکنش انرژی پرتو (SEM) X مدل XL-30 ساخت شرکت Philips آمریکا ارزیابی شد.

#### مشخصه‌یابی شکل‌شناسی و شیمیایی

برای بررسی شکل‌شناسی نانوالیاف حاصل از میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) استفاده شد. همچنین، به منظور بررسی ساختار شیمیایی و ارزیابی برهم‌کنش‌های احتمالی بین اجزای داربست از طیف‌سنج زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR) مدل Nexus 870 در محدوده عدد موجی  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$  استفاده شد. بدین منظور قرص‌های پتاسیم برمید (KBr) دارای نمونه‌ها تهیه شدند و مورد آزمون قرار گرفتند.

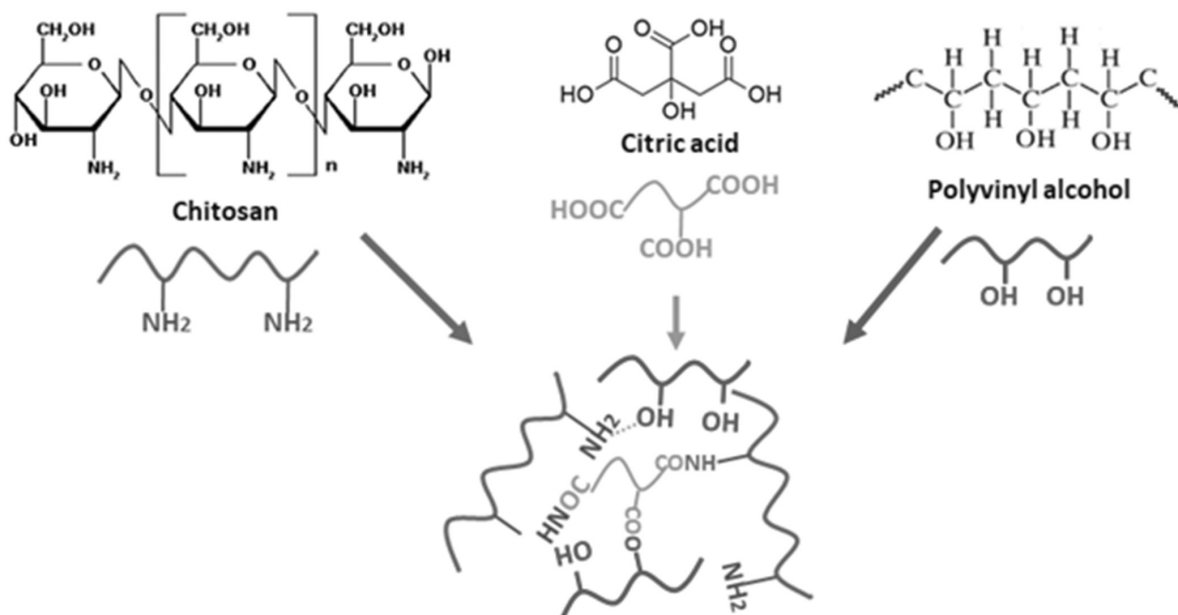
#### مشخصه‌یابی‌های فیزیکی و زیستی (برون تنی)

به منظور بررسی اثر سیتریک اسید به عنوان عامل اتصال عرضی مناسب و بدون سمیت در کاهش مقدار آب‌دوستی و افزایش قابلیت حفظ تمامیت فیزیکی لایه نانولیفی در برابر آب، از آزمون زاویه تماس استفاده شده است. بدین منظور لایه‌های نانولیفی با اندازه‌های  $1 \times 1 \text{ cm}$  آماده و روی پایه مدنظر قرار گرفت. سپس، قطره آب مقطر (با حجم  $0.04 \mu\text{L}$ ) با میکروپیپت روی نمونه قرار داده می‌شود و در ثانیه پنجم پس از قرارگیری قطره عکس‌برداری با دوربین دیجیتال عکس‌برداری شد. سپس، زاویه تماس قطره آب با سطح لایه نانولیفی اندازه‌گیری و متوسط نتایج سه مرتبه تکرار گزارش شد.

به مدت 4 h در دمای  $120^\circ\text{C}$  عملیات گرمایی درون آون قرار گرفتند [۱۳]. فرایند اتصال عرضی و برهم‌کنش بین اجزای پلیمر و اتصال‌دهنده عرضی (سیتریک اسید) در طرح ۱ مشخص شده است. به منظور تعیین ترکیب بهینه از نظر نسبت پلیمرها و شرایط الکترونیسی، وب‌های الکترونیسی شده با آزمون‌های شکل‌شناسی به کمک میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM)، مدل XL-30 ساخت شرکت Philips آمریکا بررسی شدند.

#### تهیه داربست نانولیفی کیتوسان-پلی(وینیل الکل)-سیتریک اسید دارای نانوسریا

به منظور تهیه داربست دارای نانوذرات سریم اکسید (نانوسریا)، محلول بهینه کیتوسان-پلی(وینیل الکل)-سیتریک اسید (نسبت CS:PVA:CA ۲:۳:۱) انتخاب شد و نانوسریا به مقدار ۱/۵٪ وزنی نسبت به وزن خشک پلیمرها به ترکیب افزوده شد و به مدت 1 h دیگر در دمای محیط روی همزن هم‌زده شد. مقدار بهینه نسبت کیتوسان به پلی(وینیل الکل) برای الکترونیسی بر اساس مطالعات پیشین نویسنده [۱۶] و مقدار بهینه وجود نانوسریا با توجه به مطالعه Hussein و همکاران [۱۷] انتخاب شد. سپس، محلول ترکیب پلیمری دارای نانوسریا تحت فرایند الکترونیسی در شرایط ولتاژهای ۱۵ و ۲۰ kV و فاصله ۱۸ cm قرار گرفت. در نهایت، وب نانولیفی دارای نانوسریا برای انجام فرایند اتصال عرضی، به مدت 4 h در دمای  $120^\circ\text{C}$  درون آون قرار گرفت. وجود نانوسریا در لایه با طیف‌سنجی



طرح ۱- فرایند اتصال عرضی بین کیتوسان و پلی(وینیل الکل) با سیتریک اسید به عنوان عامل ایجاد اتصال عرضی.

Schem. 1. The schematic of cross-linking between chitosan, PVA and citric acid as a cross-linker.

داده شد و مقدار ۱ mL از تعلیق باکتری به آن اضافه شد. پس از ۲۴ h تعداد باکتری‌های زنده به روش سوانگاری با Reader ELISA محاسبه شدند تا مقدار درصد کاهش کلونی و قابلیت ضدباکتریایی داربست‌ها ارزیابی شود [۱۸]. نتایج گزارش شده حاصل سه مرتبه تکرار است.

### تجزیه و تحلیل آماری

برای تعیین معنی‌داری آماری تفاوت‌های مشاهده‌شده بین گروه‌های مطالعه‌شده، از تحلیل واریانس ANOVA یک‌طرفه (Post hoc: Cheffè) استفاده شد.  $p\text{-value} > 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد، در حالی که  $p\text{-value} > 0.05$  نشان‌دهنده روند غیرمعنی‌دار است.

### نتایج و بحث

#### شکل‌شناسی داربست کیتوسان-پلی(وینیل الکل)-سیتریک اسید

به منظور بررسی اثر نسبت CS:PVA:CA، تصاویر SEM داربست‌های حاصل در دو نسبت ۱:۱/۵ و ۱:۳:۱ الکترورسی شده در شرایط ولتاژ ۲۰ kV و فاصله ۱۸ cm در شکل ۱ بررسی شدند. به منظور بررسی اثر وجود سیتریک اسید بر شکل‌شناسی، محلول‌های CS:PVA با نسبت‌های ۱:۱ و ۲:۳ بدون وجود سیتریک اسید نیز در شرایط مشابه با نمونه‌های دارای سیتریک اسید الکترورسی شدند و تصاویر میکروسکوپی الکترونی آن در مقایسه با نمونه‌های دارای سیتریک اسید در شکل ۱ دیده می‌شود. به طور کلی در این مطالعه نسبت بین کیتوسان و سیتریک اسید در هر دو ترکیب یکسان است و عامل اصلی تغییرات شکل‌شناسی اثر تغییر مقدار پلی(وینیل الکل) در ترکیب سه‌جزئی است. نتایج نشان می‌دهد، اندازه قطر متوسط نانوالیاف CS:PVA با نسبت ۱:۱ و ۲:۳ بدون سیتریک اسید به ترتیب  $150 \pm 28$  nm و  $205 \pm 32$  nm است و افزایش سیتریک اسید به محلول و الکترورسی آن سبب کاهش محسوس در قطر متوسط نانوالیاف حاصل می‌شود. نتایج حاصل با یافته‌های Czibulya و همکاران [۱۳] مطابقت دارد، به طوری که آن‌ها گزارش کردند، افزوده شدن سیتریک اسید به ترکیب کیتوسان-پلی(وینیل الکل) سبب کاهش نسبی گرانروی و ایجاد نانوالیاف ظریف‌تر می‌شود. همچنین طبق نتایج گزارش شد، عملیات گرمایی تغییر محسوسی بر شکل‌شناسی و قطر نانوالیاف حاصل نمی‌گذارد.

همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، اگرچه با افزایش مقدار پلی(وینیل الکل) در ترکیب CS:PVA:CA قطر متوسط نانوالیاف از

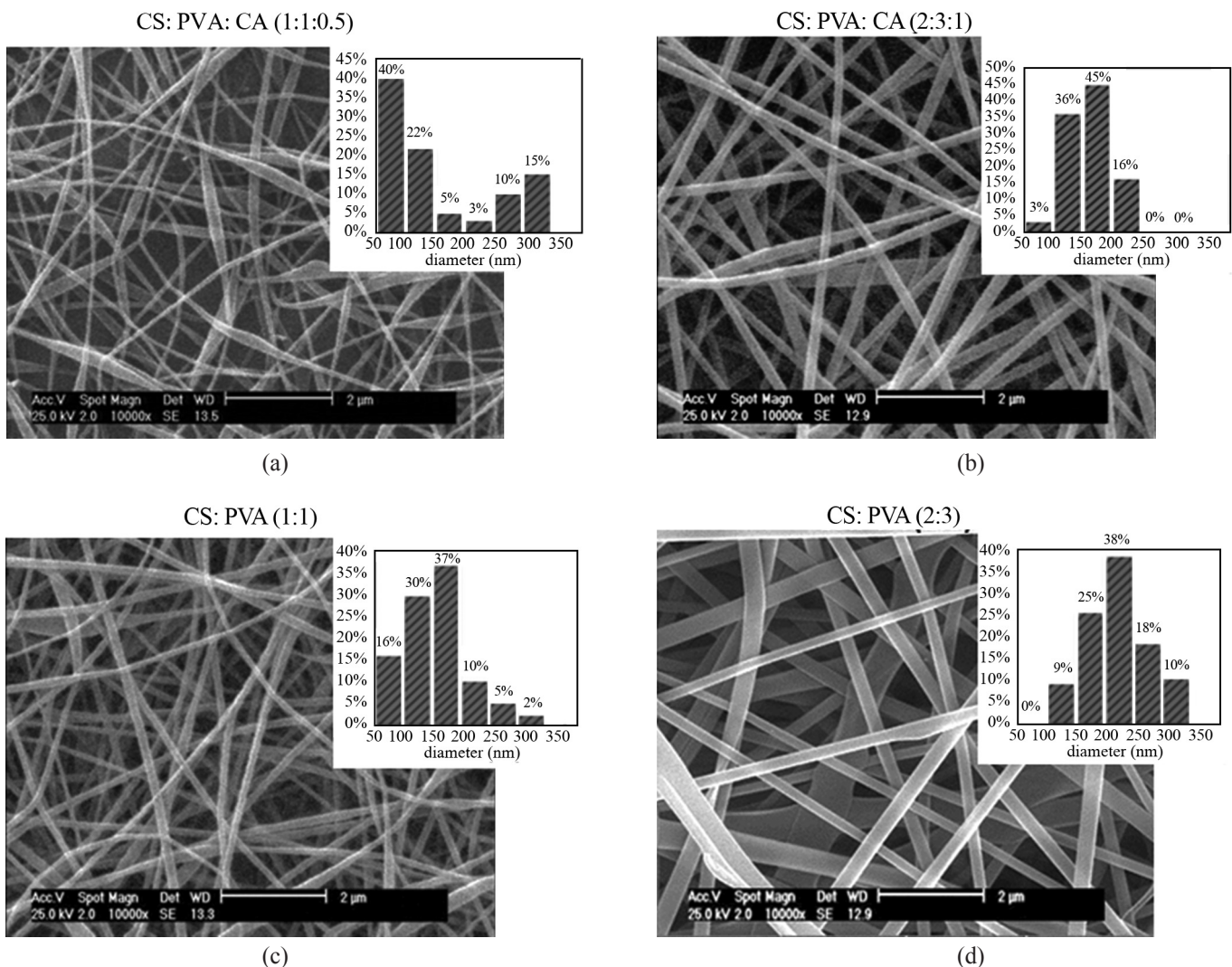
آزمون کشت یاخته‌ای با یاخته‌های فیروبلاست L929 دم موش مطابق با استاندارد ASTM-F813 انجام شد. این یاخته‌ها پیش از کشت یاخته‌ای در محیط رشد RPMI-1640 به همراه پنی‌سیلین،  $100 \text{ IU/mL}$  استرپتوسین و ۱۰٪ سرم جنینی گوساله (FCS) نگهداری شدند. نمونه‌ها پس از استرون‌سازی به روش گاز اتیلن اکسید و حذف باقی‌مانده گاز به روش هوادهی، درون ظرف کشت یاخته پلی‌استیرنی قرار داده شدند و در هر خانه ۱ mL از تعلیق یاخته شامل  $90000$  یاخته ریخته شد. یک خانه از آن نیز به عنوان شاهد منفی (بدون نمونه) نگه داشته شد. ظروف کشت به مدت ۷۲ h درون گرم‌خانه (incubator) مدل NB-203L ساخت شرکت N-BioTek، INC در شرایط ۵٪ کربن دی‌اکسید، ۹۵٪ رطوبت و دمای  $37^\circ\text{C}$  قرار داده شدند. پس از آن محلول تعلیق از درون تک‌تک خانه‌های ظروف کشت خارج شده و نمونه‌ها به ترتیب در الکل‌های ۷۰، ۸۰ و ۹۶٪ هر یک به مدت ۱۰ min نگه داشته شدند تا یاخته‌ها تثبیت شوند و تصویربرداری میکروسکوپی الکترونی انجام شود [۱۸].

آزمون MTT (میکروکشت نمک تترازولیوم) به منظور بررسی مقدار زنده‌مانی یاخته‌ها و نبود سمیت یاخته‌ای انجام شد. بدین منظور، یاخته‌های قرارگرفته روی لایه‌های حاصل در محیط کشت بدون سرم مورد لکه‌گذاری با MTT ( $150 \mu\text{L}$  محلول ۲۰٪) درون گرم‌خانه قرار می‌گیرند. به عبارت دیگر، تعداد یاخته‌های زنده با روش رنگ‌سنجی MTT تعیین می‌شود. سازوکار این روش بدین ترتیب است که یاخته‌های فعال از نظر متابولیسم با نمک تترازولیوم واکنش می‌دهند تا رنگ محلول فرمازون را تولید کنند و جذب آن با صفحه‌خوان طیف‌نورسنجی Reader ELISA مدل STAT FAX 2100 ساخت آمریکا در طول موج  $570 \text{ nm}$  خوانده می‌شود. نتایج شش مرتبه تکرار آزمون گزارش شد.

برای ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی داربست‌های دارای نانوسریا و بدون نانوسریا، آزمون کشت باکتری با دو دسته باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و باکتری گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* در محیط کشت سویا آگار و مطابق روش استاندارد مک فارلند انجام شد. بدین منظور، برای تهیه محیط کشت، مقدار ۲۰ g از محیط کشت سویا آگار تریپتیکیس به  $500 \text{ mL}$  آب مقطر افزوده شد. محیط کشت جوشانده شد تا کاملاً شفاف شود و سپس به مدت ۱۵ min در دمای  $120^\circ\text{C}$  اتوکلاو شد. باکتری‌های آماده‌شده در محیط کشت به مدت ۲۴ h کشت شدند. یک تعلیق از هر باکتری بر اساس کدورت ۰/۵ مک فارلند (تعداد باکتری‌های موجود در هر میلی‌لیتر از تعلیق برابر با  $10^8 \times 1/5$ ) آماده شد. از هر نمونه لایه نانولیفی به اندازه  $1 \times 1 \text{ cm}$  جدا شد و پس از سترون‌سازی در محیط سرم مناسب قرار

تصاویر میکروسکوپی الکترونی (شکل ۱) لایه نانولیفی CS:PVA:CA با نسبت ۲:۳:۱ به‌عنوان نسبت بهینه برای ادامه مطالعات انتخاب شد. مطابق داده‌های جدول ۱، به‌منظور بررسی اثر ولتاژ و فاصله لایه‌های الکترورسی شده CS:PVA:CA با نسبت ۲:۳:۱ در شرایط ولتاژهای ۱۵ و ۲۰ kV و فاصله‌های ۱۲ و ۱۸ cm بررسی شدند. نتایج نشان می‌دهد، در فاصله ثابت، افزایش ولتاژ سبب کاهش تعداد دانه‌تسییحی‌ها در شکل‌شناسی لایه نانولیفی می‌شود. در فاصله ۱۲ cm با افزایش ولتاژ از ۱۵ kV به ۲۰ kV، اگرچه قطر متوسط نانولیف‌ها افزایش یافته اما تعداد دانه‌تسییحی‌ها به‌طور محسوسی کاهش یافته است. این موضوع می‌تواند به‌دلیل افزایش قدرت میدان الکتریکی و ایجاد

باریک‌تر و یکنواخت‌تر می‌شود. افزایش مقدار PVA در ترکیب نیز سبب می‌شود که دانه‌تسییحی‌ها حذف شده و الیاف با قطر متوسط نسبتاً یکسان در تمام طول لیف ایجاد شود. این موضوع بدین دلیل است که زنجیرهای پلی‌(وینیل الکل) به‌طور یکنواخت‌تری بین زنجیرهای پلی‌کاتیونی کیتوسان قرار می‌گیرند و مانع از دفعه بارهای هم‌نام و تشکیل دانه‌تسییحی در طول الیاف می‌شوند. نتایج به‌دست‌آمده مطابق با نتایج Czibulya و همکاران [۱۳] است که گزارش کردند افزایش محتوای کیتوسان در ترکیب نسبت به پلی‌(وینیل الکل) سبب تشکیل دانه‌تسییحی و افزایش توزیع فراوانی قطری می‌شود. بر اساس نتایج از



شکل ۱- تصاویر SEM لایه نانولیفی CS:PVA:CA در نسبت‌های ۰/۵:۱:۱ و ۲:۳:۱ و لایه‌های CS:PVA در نسبت‌های ۱:۱ و ۲:۳ الکترورسی شده در شرایط ولتاژ ۲۰ kV و فاصله ۱۸ cm با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰۰x.

Fig. 1. SEM images of CS:PVA:CA (in mass ratios of 1:1:0.5 and 2:3:1) and CS:PVA (1:1 and 2:3) nanofibrous webs electrospun under applied voltage of 20 kV and distance of 18 cm; 10000x.

در ترکیب، نایکنواختی‌های قطری در طول نانولیف دیده می‌شود. اثر تغییرات ولتاژ در فاصله ثابت نشان می‌دهد، با افزایش ولتاژ از ۱۵ kV به ۲۰ kV قطر متوسط نانولیف دارای نانوسریا از  $325 \pm 56$  nm به  $274 \pm 38$  nm کاهش یافته است. این موضوع به دلیل افزایش قدرت میدان الکتریکی و ارتقای بار سطحی جت و کشیده شدن بیشتر آن در میدان مغناطیسی است [۱۸]. کاهش قطر نیز سبب شده است که نایکنواختی سطحی در طول الیاف بیشتر مشخص شود که حاکی از وجود نانوسریا در نانولیف حاصل است. همچنین شکل ۲ (c) تصویر SEM نانوذرات سریم اکسید با شکل‌شناسی شبه‌کروی و کمی کشیده و اندازه متوسط حدود ۱۸ nm است که نتایج حاصل با یافته‌های Hussein و همکاران [۱۷] مطابقت دارد. همچنین وجود نانوسریا در ترکیب و پراکندگی مناسب آن با نتایج EDS تأیید شده است. بر اساس نتایج حاصل از شکل ۲، داربست نانولیفی (۲:۳:۱) CS:PVA:CA دارای ۱/۵٪ وزنی نانوسریا الکترورسی شده در شرایط ولتاژ ۲۰ kV و فاصله ۱۸ cm به عنوان داربست بهینه انتخاب شد و برای ادامه مطالعات استفاده و ارزیابی شد.

#### نتایج طیف‌سنجی زیرقرمز تبدیل فوری

به منظور شناسایی گروه‌های عاملی و بررسی برهم‌کنش‌های احتمالی بین اجزای ترکیب از طیف‌سنجی زیرقرمز تبدیل فوری (FTIR) استفاده شد. بدین منظور، طیف‌های FTIR نانوذرات سریم اکسید ( $\text{NCEO}_2$ )، سیتریک اسید (CA)، لایه نانولیفی CS:PVA و لایه‌های نانولیفی CS:PVA:CA دارای نانوسریا و بدون نانوسریا در شکل ۳ بررسی شده است.

در طیف FTIR نانولیف CS:PVA، پیک پهن محدوده  $3800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$  به ارتعاش‌های کششی پیوندهای O-H و N-H موجود در گروه‌های هیدروکسیلی و آمینی پلی(وینیل الکل) و کیتوسان مربوط است. پیک‌های  $2887$  و  $2920 \text{ cm}^{-1}$  به ارتعاش‌های

کشش بیشتر جت پلیمری در مسیر پرواز باشد که سبب باز شدن دانه‌تسبیحی و پخش شدن یکنواخت حجم تجمع‌یافته محلول پلیمری محبوس به جای دانه‌تسبیحی در طول الیف باشد [۱۹]. همچنین، در فاصله ۱۸ cm افزایش ولتاژ سبب تغییر محسوسی در قطر متوسط نشده و تنها یک کاهش نسبی را نشان می‌دهد. اما، شکل‌شناسی بسیار یکنواخت و مناسبی حاصل شده است. اثر تغییر فاصله در ولتاژهای ثابت نیز روند مشخصی را دنبال نمی‌کند. اما آنچه مشخص است، افزایش فاصله سبب کاهش دانه‌تسبیحی‌ها شده است که این موضوع به دلیل افزایش فرصت کشش جت پلیمری است. طبق یافته‌ها، لایه نانولیفی (۲:۳:۱) CS:PVA:CA الکترورسی شده در شرایط ولتاژ ۲۰ kV و فاصله ۱۸ cm نمونه بهینه از نظر شکل‌شناسی و نیز قطر متوسط نانولیف حاصل است.

#### بررسی شکل‌شناسی داربست CS:PVA:CA دارای نانوسریا

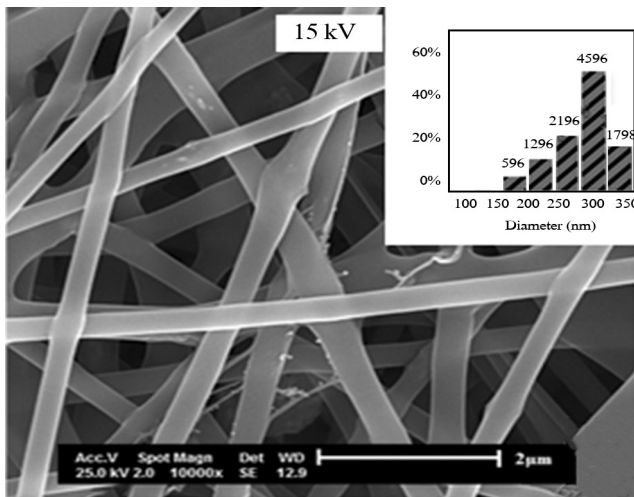
به منظور بررسی شرایط بهینه الکترورسی، محلول (۲:۳:۱) CS:PVA:CA دارای ۱/۵٪ وزنی نانوذرات سریم اکسید (نانوسریا)، در شرایط ولتاژهای ۱۵ و ۲۰ kV و فاصله ۱۸ cm الکترورسی شده و از لایه‌های حاصل پس از عملیات گرمایی تصویربرداری میکروسکوپی الکترونی پویشی انجام شد. شکل ۲ (a) و (b) تصاویر SEM داربست دارای نانوسریا در شرایط مختلف الکترورسی است. با افزودن نانوسریا به ترکیب قطر متوسط نانولیف نسبت به نمونه‌های بدون نانوذره افزایش یافته اما توزیع قطری نانولیف به طور چشمگیری تغییر نکرده است. به عنوان نمونه، در شرایط الکترورسی یکسان در ولتاژ ۲۰ kV و فاصله ۱۸ cm، قطر متوسط نانولیف در لایه CS:PVA:CA بدون نانوسریا  $175 \pm 29$  nm بوده که با افزایش نانوسریا به  $274 \pm 38$  nm رسیده است. این موضوع می‌تواند به دلیل ایجاد تجمع نانوذرات در لایه‌های زنجیرهای پلیمری و افزایش گرانروی محلول مخلوط دارای نانوسریا باشد. همچنین به دلیل وجود نانوسریا

جدول ۱- تغییرات شکل‌شناسی و قطر متوسط نانولیف (۲:۳:۱) CS:PVA:CA در شرایط ولتاژ و فاصله مختلف.

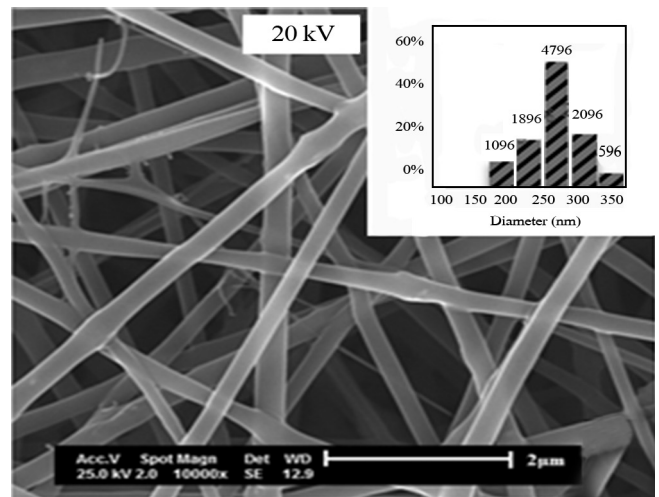
Table 1. changing in morphology and average diameters of CS:PVA:CA (2:3:1) nanofibers at different applied voltages and distances.

Distance (cm)	Voltage (kV)	
	15	20
12	38±107 nm Fibers with low surface density and a large number of spindle-shaped micrometer beads	60±190 nm Fibers with a wide diameter distribution and a small number of beads
18	30±180 nm Uniform fibers with a small number of beads	29±175 nm Uniform bead-less fibers

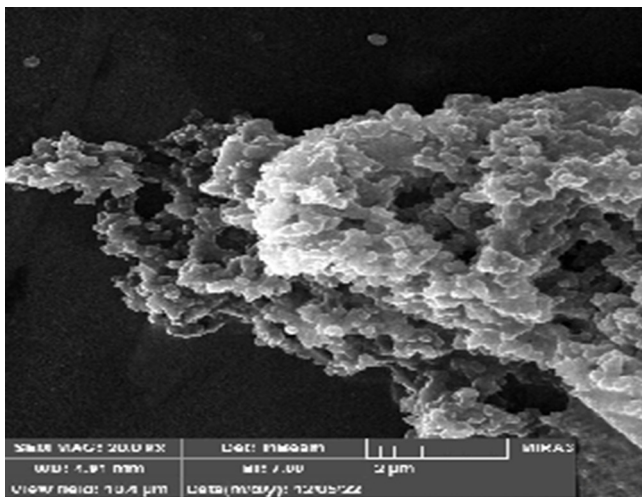




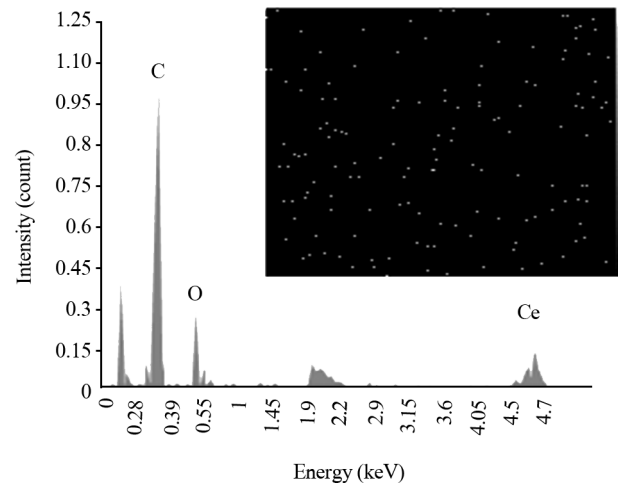
(a)



(b)



(c)



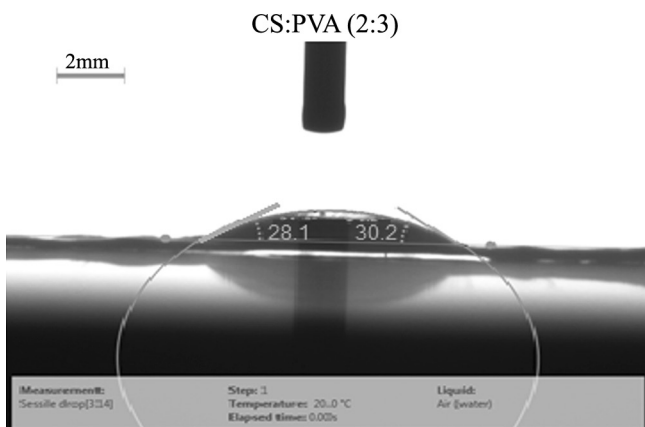
(d)

شکل ۲- تصاویر SEM داربست های نانولیفی (CS:PVA:CA (۲:۳:۱) دارای ۵٪ وزنی نانوسریا (NCeO<sub>2</sub>) الکترورسی شده در شرایط ولتاژ: (a) ۱۵ kV و (b) ۲۰ kV در فاصله ۱۸ cm با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰x. (c)، تصویر SEM نانوذرات سریا و (d) نتایج EDS لایه دارای نانوسریا.

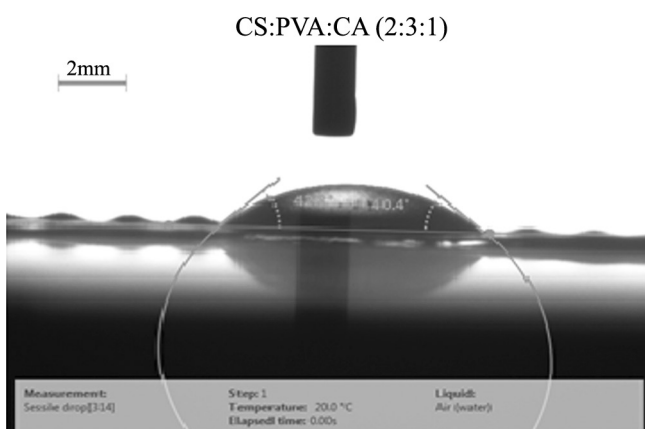
Fig. 2. SEM images of 5% Nanocereria-loaded CS:PVA:CA (2:3:1) electrospun nanofibrous scaffolds under applied voltages of (a) 15kV and (b) 20kV and distance of 18 cm, (c) SEM images of nanocereria; 10000x, and (d) EDS result.

[۱۲]. نکته حائز اهمیت در طیف FTIR نانوالیاف اتصال عرضی شده CS:PVA:CA، این است که از شدت پیک مربوط به گروه هیدروکسیل کاسته شده است و جابه‌جایی کمی به عدد موج‌های بیشتر دارد. پیک‌های گروه آمیدی و پیوندهای استری نیز به ترتیب به حدود ۱۷۲۴ cm<sup>-1</sup> و ۱۵۵۰ cm<sup>-1</sup> جابه‌جا شدند و افزایش نسبی در شدت دیده می‌شود. نتایج حاصل مطابق یافته‌های Czubulya و همکاران [۱۳] است. آن‌ها گزارش کردند، این افزایش نشان‌دهنده ایجاد اتصال‌های عرضی با سیتریک اسید است. در طیف FTIR نانوسریا پیک شاخص در ۳۴۹۳ cm<sup>-1</sup> مربوط به ارتعاش کششی پیوند O-H

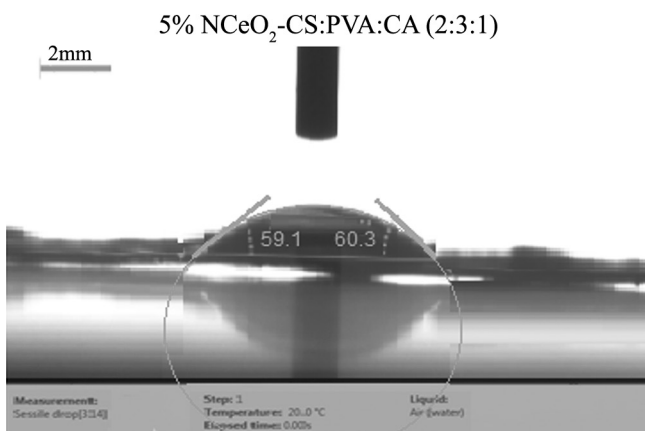
کششی پیوندهای C-H و پیک ۱۷۳۸ cm<sup>-1</sup> به ارتعاش‌های کششی پیوند C=O گروه‌های استری در کیتوسان و نیز گروه‌های استری آبکافت‌نشده در پلی(وینیل الکل) مربوط هستند. پیک شاخص در ۱۵۷۹ cm<sup>-1</sup> به ارتعاش‌های کششی پیوند C-N در آمید نوع اول در ساختار کیتوسان نسبت داده شده است [۲۰]. در طیف FTIR سیتریک اسید، پیک تیز با شدت شایان توجه در عدد موجی ۱۷۲۰ cm<sup>-1</sup> به گروه کربونیل کربوکسیلیک اسید و پیک پهن در ۳۴۱۲ cm<sup>-1</sup> به گروه‌های هیدروکسیلی در ساختار و پیک‌های ناحیه ۲۶۵۰ cm<sup>-1</sup> به پیوندهای C-H در گروه‌های آلکیلی مربوط هستند



(a)



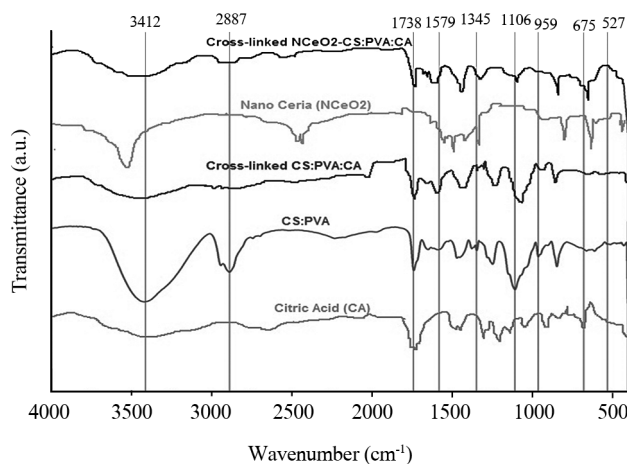
(b)



(c)

شکل ۴- تصاویر دیجیتالی اندازه‌گیری زاویه تماس قطره آب با نانوالیاف CS:PVA، نانوالیاف اتصال عرضی شده CS:PVA:CA و نانوالیاف اتصال عرضی شده CS:PVA:CA دارای ۱/۵٪ نانوسریا.

Fig. 4. Digital images of water contact angle on CS:PVA, cross-linked CS:PVA:CA and 1.5% NCeO<sub>2</sub> loaded CS:PVA:CA nanofibrous web.



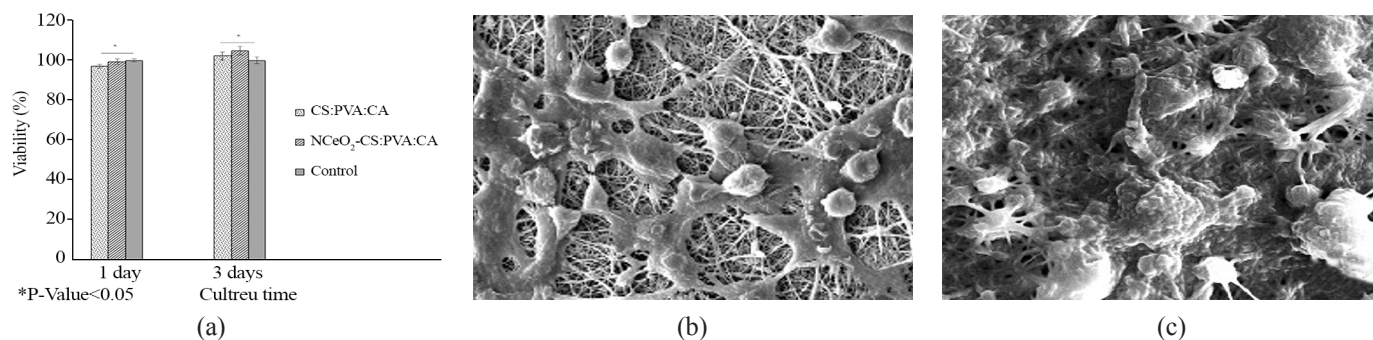
شکل ۳- طیف های FTIR سیتریک اسید، نانوسریا و لایه های نانولیفی CS:PVA:CA دارای نانوسریا و بدون نانوسریا.

Fig. 3. FTIR spectra of citric acid, nanoceria and nanofibrous webs of CS:PVA:CA with and without nanoceria.

گروه های هیدروکسیل می تواند به جذب آب یا رطوبت محتوا به کمک نانوذرات سریم اکسید نسبت داده شود. پیک در ناحیه زیر  $700 \text{ cm}^{-1}$  به ویژه در عدد موجی  $590 \text{ cm}^{-1}$  به پیوند O-Ce-O در نانوسریا مربوط است [۵]. وجود این پیک شاخص به همراه سایر پیک های شاخص نمونه CS:PVA:CA، نشان دهنده وجود این نانوذرات در ترکیب نانوالیاف CS:PVA:CA دارای نانوسریاست. تغییر مکان های کوچک ایجاد شده در پیک ها نشان دهنده برقراری پیوندهای هیدروژنی میان گروه های مختلف اجزای اصلی و نیز برقراری اتصال های یونی به کمک اسید سیتریک با گروه های عاملی کیتوسان و پلی (وینیل الکل) است.

#### نتایج آزمون آب دوستی

نتایج آزمون اندازه گیری زاویه تماس به عنوان معیاری برای تعیین مقدار خاصیت آب دوستی لایه های نانولیفی در شکل ۴ نشان داده شده است. پوشش های با زاویه تماس کمتر از  $10^\circ$  آب دوست، بین  $10^\circ$  تا  $90^\circ$  آب دوست، بین  $90^\circ$  تا  $120^\circ$  آب گریز و با زاویه تماس بیش از  $120^\circ$  آب گریز نامیده می شوند [۲۱]. نتایج نشان می دهد، وجود سیتریک اسید به عنوان عامل ایجاد اتصال عرضی یونی که با عملیات گرمایی فرایند اتصال عرضی به کمک آن آغاز می شود، سبب کاهش مناسب خاصیت آب دوستی نانوالیاف و عدم نیاز به استفاده از اتصال دهنده های عرضی سمی مانند بخار گلوترآلدئید شده است. بر این اساس زاویه تماس با قطره آب در نمونه نانوالیاف CS:PVA حدود  $29^\circ$  است که مطابق با نتایج Li و همکاران [۲۰] است. زاویه تماس نانوالیاف CS:PVA پس از اتصال عرضی با سیتریک اسید در



شکل ۵- (a) نتایج آزمون MTT برای بررسی درصد زنده‌مانی فیبروبلاست‌ها روی داربست‌های نانولیفی پس از گذشت یک روز و سه روز پس از کشت و تصاویر SEM رشد و چسبندگی فیبروبلاست‌ها پس از سه روز روی داربست نانولیفی (b) CS:PVA:CA و (c) CS:PVA:CA دارای نانوذرات سریم اکسید (NCEO<sub>2</sub>).

Fig. 5. (a) Results of MTT assay for fibroblast cell-viability on nanofibrous scaffolds after one and three days post-culturing.; SEM images of cell attachments and proliferations on (a) CS:PVA:CA and (b) NCEO<sub>2</sub> loaded CS:PVA:CA nanofibrous scaffolds.

فیزیکی ساختار را نیز در محیط مرطوب زخم دارند.

#### نتایج آزمون‌های زیستی برون‌تنی

نتایج بررسی‌های سمیت‌سنجی یاخته‌ای (آزمون MTT) و کشت یاخته‌های فیبروبلاست روی داربست‌های نانولیفی اتصال عرضی شده کیتوسان-پلی(وینیل الکل)-سیتریک اسید دارای نانوسریا و بدون آن و نمونه کنترل (ظرف کشت یاخته) در شکل ۵ دیده می‌شود. همان‌طور که در شکل ۵ (a) دیده می‌شود، زنده‌مانی یاخته روی هر دو نمونه داربست نانولیفی شایان توجه است، اگرچه به‌ویژه پس از گذشت سه روز از کشت درصد زنده‌مانی روی نمونه نانولیفی دارای سریم اکسید بیشتر و حتی بیشتر از نمونه کنترل است. نتایج حاصل با یافته‌های Hussein و همکاران [۱۷] مطابقت دارد. آن‌ها گزارش کردند، داربست هیبریدی پلی‌یورتان-پلی(وینیل الکل)-ژلاتین که

گرما به ۴۲° می‌رسد. یکی از مهم‌ترین اثرهای شبکه‌ای شدن کاهش تعداد گروه‌های عاملی آب‌دوست در کل نمونه و نیز در سطح آن است، این موضوع سبب افزایش زاویه تماس قطره آب بر نمونه شبکه‌ای شده می‌شود که خود می‌تواند به‌عنوان معیاری برای تعیین قابلیت حفظ تمامیت فیزیکی وب در محیط آبی مورد توجه قرارگیرد. همچنین، زاویه تماس نمونه نانوالیاف CS:PVA:CA دارای نانوذرات سریم اکسید نسبت به نمونه بدون نانوذرات بیشتر شده و به حدود ۶۰° رسیده است. نتیجه به‌دست‌آمده مطابق با یافته‌های Naruddin و همکاران [۲۲] است. آن‌ها گزارش کردند، وجود نانوسریا سبب کاهش خاصیت آب‌دوستی لایه نانولیفی PCL شده است [۲۲]. نتایج نشان می‌دهد، هر دو داربست CS:PVA:CA دارای نانوسریا و بدون آن از نظر خواص آب‌دوستی برای کاربردهای زخم‌پوش مناسب هستند و افزون بر حفظ خواص زیستی، قابلیت حفظ تمامیت

جدول ۲- درصد کاهش کلونی باکتری روی داربست نانولیفی دارای نانوسریا و نمونه کنترل (داربست نانولیفی بدون نانوسریا).

Table 2. The percentage of bacterial colony reduction on the nanofibrous scaffold containing nanoceria and the control sample (nanofibrous scaffold without nanoceria).

The bacteria	Type of sample	The number of live bacteria	Antibacterial activity (colony reduction) (%)
Staphylococcus aureus	Nanofibrous scaffold with nanoceria	$1.6 \times 10^4$	$99.99 \pm 0.01$
	Control (nanofibrous scaffold without nanoceria)	$8.7 \times 10^5$	$99.40 \pm 0.02$
Pseudomonasaeruginosa	Nanofibrous scaffold with nanoceria	$1.8 \times 10^5$	$99.80 \pm 0.01$
	Control (nanofibrous scaffold without nanoceria)	$4.5 \times 10^6$	$97.01 \pm 0.02$

در تعداد باکتری‌های زنده سویه گرم منفی را نشان می‌دهد و نتایج نشان‌دهنده افزایش معنادار فعالیت ضدباکتریایی نسبت به سویه گرم منفی در نمونه دارای نانوسریا نسبت به نمونه بدون نانوسریاست. بنابراین وجود نانوسریا سبب بهبود خاصیت ضدباکتریایی داربست در برابر هر دو سویه شده است [۱۷]. نتایج نشان می‌دهد، داربست دارای نانوسریا می‌تواند به‌عنوان زخم‌پوش با قابلیت ضد میکروب بسیار قوی در کاربردهای ترمیم زخم معرفی شود.

### نتیجه‌گیری

در این پژوهش، داربست نانولیفی از ترکیب کیتوسان-پلی(وینیل الکل)-سیتریک اسید به‌دو صورت با نانوذرات سریم اکسید و بدون این نانوذرات با روش الکتروریسی تهیه شد. لایه بهینه بدون نانوسریا از ترکیب (۲:۳:۱) CS:PVA:CA با قطر متوسط  $175 \pm 29$  nm حاصل شده است و در عملیات گرمایی برای تکمیل فرایند ایجاد اتصال عرضی به‌کمک عامل سیتریک اسید با ایجاد اتصال‌های یونی قرار گرفت. نتایج میکروسکوپی نشان‌دهنده دستیابی به شکل‌شناسی مناسب و بدون دانه‌تسیجی در نسبت ۲:۳:۱ (CS:PVA:CA) با افزودن ۱/۵٪ وزنی نانوسریا به ترکیب و الکتروریسی در شرایط ولتاژ ۲۰ kV و فاصله ۱۸ cm با قطر متوسط نانوالیاف  $274 \pm 38$  nm است. نتایج طیف‌سنجی پیک‌های شاخص هر دو پلیمر و نانوسریا را در ترکیب دیده نشان می‌دهد که حاکی از ایجاد برهم‌کنش هیدروژنی بین آن‌هاست. نتایج آزمون زاویه تماس نشان‌دهنده کاهش نسبی آب‌دوستی داربست با سیتریک اسید بوده و این کاهش در نمونه دارای نانوسریا بیشتر دیده شده به‌طوری که زاویه تماس به  $60^\circ$  رسیده است. نتایج کشت یاخته‌ای نشان‌دهنده رشد و تکثیر بسیار عالی یاخته‌های فیروبلاست روی هر دو داربست، به‌ویژه داربست دارای نانوسریاست. همچنین نتیجه آزمون MTT نیز نشان داد، در مدت زمان آزمون درصد زنده‌مانی یاخته‌های فیروبلاست روی نمونه دارای نانوسریا بیشتر بوده است. نتایج آزمون ضدباکتری در برابر دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی، حاکی از خاصیت ضدباکتری بسیار زیاد داربست دارای نانوسریاست. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت، داربست نانولیفی کیتوسان-پلی(وینیل الکل)-سیتریک اسید دارای نانوسریا با قابلیت ضد میکروبی بسیار زیاد و خواص زیستی عالی می‌تواند پوشش مناسب برای ترمیم زخم‌های پوستی باشد.

در جزء پلی(وینیل الکل)-ژلاتین دُز کمی از نانوذرات سریم اکسید بارگذاری شده است. نسبت به نمونه بدون نانوسریا خواص زیستی بهتری نشان می‌دهد [۱۷]. نبود سمیت‌زایی هر دو داربست به‌دلیل خواص زیستی قابل قبول پلیمرهای استفاده‌شده است و اثر زیستی مناسب و خواص زیستی نانوسریا در چسبندگی، ضد میکروب‌بودن و ضد اکسندگی سبب بهبود مقدار زنده‌مانی یاخته‌ای بیشتر از نمونه کنترل و نمونه بدون نانوسریا در روز سوم کشت شده است.

همان‌طور که در شکل ۵ (b) و (c) دیده می‌شود، چسبندگی و تکثیر یاخته‌ای مناسبی روی هر دو داربست ایجاد شده است. این موضوع افزون بر خواص زیستی و زیست‌سازگاری مناسب کیتوسان و پلی(وینیل الکل) می‌تواند به‌دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد نانوالیاف و وجود تخلخل و نیز ساختار نانولیفی در آن باشد. همچنین نتایج مؤید این است که اگرچه ایجاد اتصال عرضی با سیتریک اسید تا حدودی خواص آب‌دوستی را کاهش داده اما این کاهش اثر نامطلوبی بر خاصیت زیست‌چسبندگی داربست ایجاد نکرده و تنها سبب ارتقای خواص فیزیکی در حفظ تمامیت فیزیکی لایه نانولیفی در محیط مایعی بدن شده است. با توجه به شکل ۵ (c) وجود نانوسریا در ترکیب نانولیفی سبب بهبود مقدار چسبندگی و پهن‌شوندگی یاخته‌ها شده است، به‌طوری که یاخته‌ها با حفظ شکل‌شناسی طبیعی خود قابلیت گسترده‌شدن به‌خوبی روی سطح داربست نانولیفی دارند. این نتایج با یافته‌های Hussein و همکاران [۱۷] در یک راستاست.

### نتایج بررسی خاصیت ضدباکتریایی

خاصیت ضدباکتریایی داربست نانولیفی CS:PVA:CA دارای نانوسریا و بدون آن (به‌عنوان نمونه کنترل) در برابر دو باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و گرم منفی *Pseudomonasaeru-ginosa* ارزیابی شد. به‌منظور مطالعه دقیق خاصیت ضدباکتریایی، درصد کاهش کلونی برای هر دو نوع باکتری روی هر دو نوع داربست تعیین شد و نتایج در **جدول ۲** دیده می‌شود. محاسبات کاهش کلونی بر اساس کم‌شدن جمعیت باکتری‌ها با توجه به مقدار باکتری بارگذاری‌شده اولیه ( $10^8 \times 1/5$  باکتری زنده در ۱ mL تعلیق) انجام می‌شود. بر اساس نتایج محاسبات که در جدول ۲ آمده است، هر دو نوع داربست با توجه به مواد اولیه پلیمری (کیتوسان) استفاده‌شده در برابر هر دو سویه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی درصد کاهش کلونی شایان توجهی را نشان می‌دهند. البته نمونه بدون نانوسریا در برابر سویه گرم مثبت فعالیت بیشتری را نشان می‌دهد. از طرفی اضافه‌شدن نانوسریا به داربست سبب کاهش مقدار شایان توجهی

## مراجع

- Gholipour-Kanani A., Principles of Wound Healing and Advanced Dressing (Persian), ACECR, AUT Branch, Tehran, 1, 240, 2020.
- Rivero, G., Pereira da Cunha M.D.P., Caracciolo P.C., Abraham G.A., Nanofibrous Scaffolds for Skin Tissue Engineering and Wound Healing Applications, in *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers*, Boccaccini A.R., Ma P.X., and Liverani L. (Eds.), Woodhead, 3 th ed., 645-681, 2022.
- De Farias B.S., Sant'Anna Cadaval Junior T.R., and De Almeida Pinto L.A., Chitosan-Functionalized Nanofibers: A Comprehensive Review on Challenges and Prospects for Food Applications, *Int. J. Biol. Macromol.*, **123**, 210-220, 2019.
- Shcherbakov A.B., Reukov V.V., Yakimansky A.V., Krasnopeeva E.L., Ivanova O.S., Popov A.L., Ivanov V.K., CeO<sub>2</sub> Nanoparticle-Containing Polymers for Biomedical Applications: A Review, *Polymers*, **13**, 924, 2021.
- Farahmandjou M., Zarinkamar M., and Firoozabadi T.P., Synthesis of Cerium Oxide (CeO<sub>2</sub>) Nanoparticles Using Simple co-Precipitation Method, *Rev. Mex. De Fis.*, **62**, 496-499, 2016.
- Ermakov A., Popov A., Ermakova O., Ivanova O., Baranchikov A., Kamenskikh K., Shekunova T., Shcherbakov A., Popova N., and Ivanov V., The first Inorganic Mitogens: Cerium Oxide and Cerium Fluoride Nanoparticles Stimulate Planarian Regeneration via Neoblastic Activation, *Mater. Sci. Eng. C.*, **104**, 109924, 2019.
- Shields H.J., Traa A., and Van Raamsdonk J.M., Beneficial and Detrimental Effects of Reactive Oxygen Species on Lifespan: A Comprehensive Review of Comparative and Experimental Studies, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 2021.
- Samrot A.V., Ram Singh S.P., Deenadhayalan R., Rajesh V.V., Padmanaban S., and Radhakrishnan K., Nanoparticles, a Double-Edged Sword with Oxidant as Well as Antioxidant Properties and Mdash, A Review, *Oxygen*, **2**, 591-604, 2022.
- Ghajarieh A., Habibi S., and Talebian A., Biomedical Applications of Nanofibers, *Russ. J. Appl. Chem.*, **94**, 847-872, 2021.
- Ranjbar-Mohammadi M. and Tajdar F., Gelatin/Polycaprolactone and Polyvinyl Alcohol/Chitosan Hybrid Nanofibers: Determining Factors on Their Morphology, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **35**, 203-216, 2022.
- Al-Jbour N.D., Beg M.D., Gimbut J., and Moshul Alam A.K.M., An Overview of Chitosan Nanofibers and their Applications in the Drug Delivery Process, *Curr. Drug. Deliv.*, **16**, 272-294, 2019.
- Chen J., Han S., Huang M., ResearJ.L., Zhou M., and Hea J., Green Crosslinked Nanofibers Membrane Based on CS/PVA Combined with Polybasic Organic Acid for Tympanic Membrane Repair, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, **71**, 291-301, 2022.
- Czibulya Z., Csík A., Tóth F., Pál P., Csarnovics I., Zekó R., and Hegedüs C., The Effect of the PVA/Chitosan/Citric Acid Ratio on the Hydrophilicity of Electrospun Nanofiber Meshes, *Polymers*, **13**, 3557, 2021.
- Singh B., Kim K., and Park M.H., On-Demand Drug Delivery Systems Using Nanofibers, *Nanomater.*, **11**, 3411, 2021.
- Joseph B., Augustine R., Kalarikkal N., Thomas S., Seantier B., and Grohens Y., Recent Advances in Electrospun Polycaprolactone Based Scaffolds for Wound Healing and Skin Bioengineering Applications, *Mater. Today Commun.*, **19**, 319-335, 2019.
- Gholipour-Kanani A., Bahrami S.H., Samadi-Kochaksaraie A., Ahmadi-Tafti H., Rabbani S., Kororian A., and Erfani E., Effect of Tissue-Engineered Chitosan-Poly(vinyl alcohol) Nanofibrous Scaffolds on Healing of Burn Wounds of Rat Skin, *IET Nanobiotechnol.*, **6**, 129-135, 2012.
- Hussein M.A.M., Gunduz O., Sahin A., Grinhole M., Mohamed El-Sherbiny I., and Megahed M., Dual Spinneret Electrospun Polyurethane/PVA-Gelatin Nanofibrous Scaffolds Containing Cinnamon Essential Oil and Nanoceria for Chronic Diabetic Wound Healing: Preparation, Physicochemical Characterization and In-Vitro Evaluation, *Molecules*, **27**, 2022.
- Najafi S., Gholipour-Kanani A., Eslahi N., and Bahrami H., Study on Release of Cardamom Extract as an Antibacterial Agent from Electrospun Scaffold Based on Sodium Alginate, *J. Text. Inst. J. Text. I.*, **112**, 1482-1490, 2021.
- Can-Herrera L.A., Oliva A.I., Dzul-Cervantes M.A.A., Pacheco-Salazar O.F., and Cervantes-Uc J.M., Morphological and Mechanical Properties of Electrospun Polycaprolactone Scaffolds: Effect of Applied Voltage, *Polymers*, **13**, 662, 2021.
- Li T.T., Yan M., Zhong Y., Ren H.T., Lou C.W., Huang

- S.Y., and Lin J.H., Processing and Characterizations of Rotary Linear Needleless Electrospun Polyvinyl Alcohol (PVA)/hitosan (CS)/Graphene (Gr) Nanofibrous Membranes, *J. Mater. Res. and Technol.*, **8**, 5124-5132, 2019.
21. Salam, A., Khan M.Q., Hassan T., Hassan, N. Nazir A., Hussain T., Azeem M., and Kim I.S., In-Vitro Assessment of Appropriate Hydrophilic Scaffolds by co-Electrospinning of Poly(1,4-cyclohexane isosorbide terephthalate)/Polyvinyl Alcohol, *Sci. Rep.*, **10**, 19751, 2020.
22. Narruddin W.N.H.B., Jaganathan S.K., Khudzari A.Z.M., and Ismail A.F., Effect of Solvent on the Physicochemical Properties of Electrospun Nanocomposite with Gamat Oil and Cerium Oxide for Potential Medical Engineering Application, *J. Text. Inst. J Text. I.*, **112**, 1545-1554, 2021.