Research article

Available in: http://jips.ippi.ac.ir

Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian),
Vol. 34, No. 2, 173-190
June-July 2021
ISSN: 1016-3255
Online ISSN: 2008-0883
DOI: 10.22063/JIPST.2021.1812

Fibrous Structures Fabricated from Poly(lactic acid) and Nanofibrillated Chitosan/ Zinc Oxide Nanoparticles

Marziyeh Ranjbar-Mohammadi[1*], Parinaz Shakoori[1], Zahra Arab-Bafrani[2], and Erfan Zabihi[3]

1. Textile Engineering Group, Faculty of Engineering, University of Bonab, Postal Code 5551761167, Bonab, Iran
2. Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Postal Code 4934174515, Gorgan, Iran
3. Department of Polymer Engineering, Faculty of Engineering, Golestan University, Postal Code 49361-79142, Gorgan, Iran

Received: 20 January 2021, accepted: 9 June 2021

ABSTRACT

Hypothesis: Nowadays, the use of mixtures of natural and synthetic polymers in the production of biological scaffolds has been considered by researchers because of their ability to achieve the desired properties.
Methods: Nanofibers from poly(lactic acid) (PLA) and nanofibrillated chitosan/zinc oxide nanoparticles (CS/ZnO) with three different blend ratios of 1:1, 2:1 and 1:0 were fabricated by electrospinning method. In order to reduce the number of experiments and thus reduce the cost of materials and time, nine different experiments were performed using Taguchi test design method with three factors: PLA concentration (PLA 7, 9 and 11% by wt), CS/ZnO concentration (5, 10 and 20% by wt) and three different CS/ZnO ratios of 1:1, 2:1 and 1:0. Hydrophilicity of samples by measuring the contact angle and morphology of the produced scaffolds using scanning electron microscopy (SEM) were evaluated.
Findings: The results of scanning electron microscopy showed that with increasing PLA concentration, the beads and spindle-like morphologies are lost and the fibers are almost smooth and uniform. The results showed that by increasing the CS/ZnO concentration from 5% to 20%, the diameter of nanofibers first decreased and then slightly increased. The contact angle of fabricated samples decreased with increasing CS/ZnO concentration from 5% to 10%. Also from the samples obtained by Taguchi method, nanofiber sample containing PLA (7%, CS/ZnO 2:1) with CS/ZnO concentration of 10%, due to having a smaller diameter (345±30 nm), very thin structure and lower contact angle (101°) was reported as the optimal sample. The contact angle, morphology and surface roughness for the optimum sample were examined and the surface roughness for the optimal sample was about 178 nm. Cell culture studies on the optimal sample was successfully performed that this sample showed good biocompatibility behavior.

Keywords:
electrospinning,
chitosan nanofibrills,
poly(lactic acid),
bioscaffold,
ZnO nanoparticles

(*)To whom correspondence should be addressed.
E-mail: M.Ranjbar@ubonabu.ac.ir

Please cite this article using:
Ranjbar-Mohammadi M., Shakoori P., Arab-Bafrani Z., and Zabihi E., Fibrous Structures Fabricated from Poly(lactic acid) and Nanofibrillated Chitosan/Zinc Oxide Nanoparticles, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **34**, 173-190, 2021.

مقاله پژوهشی

ساختارهای لیفی ساخته‌شده از پلی(لاکتیک اسید) و کیتوسان نانولیفچه‌ای-نانوذرات روی اکسید

دسترس‌پذیر در نشانی: http://jips.ippi.ac.ir

مرضیه رنجبر محمدی[1*]، پریناز شکوری[1]، زهرا عرب‌بافرانی[2]، عرفان ذبیحی[3]

۱- بناب، دانشگاه بناب، دانشکده فنی و مهندسی، گروه مهندسی نساجی، کد پستی ۵۵۵۱۷۶۱۱۶۷
۲- گرگان، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گلستان، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، کد پستی ۴۹۳۴۱۷۴۵۱۵
۳- گرگان، دانشگاه گلستان، دانشکده فنی و مهندسی، گروه مهندسی پلیمر، کد پستی ۷۹۱۴۲-۴۹۳۶۱

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،
سال سی وچهارم، شماره ۲
صفحه ۱۹۰-۱۷۳، ۱۴۰۰
ISSN: 1016-3255
Online ISSN: 2008-0883
DOI: 10.22063/JIPST.2021.1812

دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱، پذیرش ۱۴۰۰/۳/۱۹

چکیده

فرضیه: امروزه استفاده از مخلوط پلیمرهای طبیعی و سنتزی در تولید داربست‌های زیستی به‌دلیل قابلیت دست‌یابی به ویژگی‌های مطلوب، مورد توجه پژوهشگران زیادی قرار گرفته است.

روش‌ها: در این پژوهش، مخلوط داربست‌های نانولیفی پلی(لاکتیک اسید) (PLA) با کیتوسان نانولیفچه‌ای-نانوذرات روی اکسید (CS/ZnO) با سه ترکیب درصد ۱:۰، ۱:۱ و ۲:۱ با روش الکتروریسی تهیه شدند. همچنین، برای کاهش تعداد آزمایش‌ها و در نتیجه کاهش هزینه مواد مصرفی و زمان، به‌کمک طراحی آزمایش تاگوچی با سه عامل غلظت PLA، غلظت CS/ZnO و ترکیب درصد CS/ZnO در سه سطح متفاوت، ۹ آزمایش مختلف طراحی شد. سپس، مقدار آب‌دوستی نمونه‌ها با اندازه‌گیری زاویه تماس و شکل‌شناسی داربست‌های تولیدی با میکروسکوپی الکترونی پویشی (SEM) ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج میکروسکوپی الکترونی پویشی نشان داد، با افزایش غلظت PLA، ساختار دانه‌تسبیحی، بیدمانند و دوکی نمونه‌ها از بین می‌رود و الیاف تقریباً صاف و یکنواختی به‌دست می‌آیند. طبق بررسی نتایج، با افزایش غلظت CS/ZnO از ٪۵ به ٪۲۰، قطر نانوالیاف ابتدا کاهش سپس کمی افزایش یافت. با افزایش غلظت CS/ZnO از ٪۵ به ٪۱۰ زاویه تماس کاهش یافت. همچنین، نمونه نانولیفی دارای ٪۱۰ (۲:۱) CS/ZnO و ٪wt ۸ PLA به‌عنوان نمونه بهینه پیشنهاد شد که به‌دلیل داشتن قطر کمتر (۳۴۵±۳۰ nm) و ساختاری خیلی نازک و زاویه تماس کمتر (°۱۰۱) به‌عنوان نمونه بهینه گزارش شد. سپس زاویه تماس، شکل‌شناسی و زبری سطح نمونه بهینه بررسی و گزارش شد. مقدار زبری سطح برای نمونه بهینه حدود ۱۷۸ nm بود. کشت سلول‌های فیبروبلاست روی نمونه بهینه نیز با موفقیت انجام شد که این نمونه رفتار زیست‌سازگاری مناسبی نشان داد.

واژه‌های کلیدی
الکتروریسی،
نانولیفچه‌های کیتوسان،
پلی(لاکتیک اسید)،
داربست زیستی،
نانوذرات روی اکسید

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:
M.Ranjbar@ubonabu.ac.ir

مقدمه

نانوفناوری، مطالعه و توسعه مواد در سطح نانو بوده که به‌دلیل ظرفیت بسیار زیاد برای تولید مواد جدید با خواص و کاربردهای متفاوت، در حال پیشرفت است [۱]. نانوالیاف از جمله نانومواد تک‌بعدی هستند که قطر کمتر از μm ۱ دارند [۲]. الکتروریسی از جمله روش‌های کارآمد برای تولید نانوالیاف است [۳،۴]. الکتروریسی، روشی آسان و پرکاربرد برای تولید نانوالیاف پلیمری پیوسته با استفاده از نیروهای الکتروستاتیک در مقیاس نانومتر بوده که در دو دهه اخیر به‌سرعت توسعه یافته است و برای تولید نانوالیاف با شکل‌شناسی متنوع از پلیمرهای طبیعی، سنتزی، مخلوط‌های پلیمری و نانوذرات به‌کار گرفته می‌شود [۷-۵]. یکی از مهم‌ترین عوامل در طراحی داربست، انتخاب زیست‌ماده مناسب برای ساختار با خواص مطلوب در کاربرد مدنظر است. پلی(لاکتیک اسید) (PLA) پلیمری زیست‌تخریب‌پذیر بوده که به‌دلیل خواص مکانیکی مناسب و آسانی تهیه، به‌طور گسترده مطالعه شده است. PLA پلی‌استر آلیفاتیک گرمانرم است که شفافیت و خواص بازدارندگی در برابر عبور پرتو فرابنفش دارد [۸،۹].

نانوذرات روی اکسید (ZnONPs)، به‌عنوان یکی از نانوذرات چندمنظوری غیرآلی برای از بین‌بردن رشد میکروب‌ها شناخته شده‌اند که خواص منحصربه‌فردی همچون فعالیت ضدمیکروبی زیاد برای گستره‌ای از میکروارگانیسم‌ها، محافظت در برابر پرتو UV، سمی‌نبودن در غلظت‌های کم، پایداری زیاد و خاصیت نورکاتالیزی مناسب را دارند. از این نانوذره در پزشکی، داروسازی و صنایع مختلف استفاده می‌شود [۱۰]. همچنین، این نانوذرات نسبت به عوامل ضدباکتریایی آلی با ثبات‌تر بوده و از نسبت سطح به حجم زیاد و اثرهای مثبت خوب بر خواص مکانیکی فیلم‌های نانوکامپوزیتی برخوردار هستند [۱۱]. امجدی و همکاران [۱۱] نانوالیاف زئین-کاراگینان به‌همراه نانوذرات روی اکسید-رزماری را با روش الکتروریسی برای کاربرد در بسته‌بندی مواد غذایی تهیه کردند. نانوالیاف تهیه‌شده شکل‌شناسی صاف و بدون بید، خواص مکانیکی مناسب، ویژگی‌های گرمایی مطلوب، آب‌گریزی زیاد و نیز فعالیت زیاد در مهار باکتری‌ها را نشان دادند. همچنین، نانوالیاف نام‌برده هیچ سمیت سلولی را نشان ندادند که نشانگر زیست‌سازگاری خوب آن‌هاست.

کیتوسان به‌عنوان زیست‌پلیمری ارزان‌قیمت [۱۲] مشتق از کیتین است که در پوسته‌های سخت‌پوستان و قارچ‌ها یافت می‌شود. این پلیمر با استیل‌زدایی جزئی کیتین به‌دست می‌آید [۱۳،۱۴]. در فرایند تهیه کیتوسان، گروه‌های استیل کیتین آبکافت شده و به گروه‌های آمین آزاد تبدیل می‌شوند [۱۲]. وجود گروه‌های هیدروکسیل و آمینو در ساختار کیتوسان موجب سرعت‌یافتن زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، فعالیت ضدباکتریایی و بازسازی بافت می‌شود. کیتوسان در حلال‌های آلی یا اسیدهای آلی مانند استیک اسید یا تری‌فلوئورواستیک اسید (TFA) حل می‌شود [۱۵]. وجود دو گروه عاملی کیتوسان یعنی آمینو و هیدروکسیل سبب شده است که این پلیمر قابلیت پیوند با یون‌های فلزی را داشته باشد [۱۶].

قابلیت استفاده از کیتوسان در ساختار محلول پلیمری برای تهیه نانوالیاف در کاربردهای زیستی مختلف به‌وفور بررسی شده است، اما تهیه نانوالیاف به‌تنهایی از این پلیمر به‌راحتی امکان‌پذیر نیست. مجیدی و همکاران [۱۷] روش مناسبی را برای کاهش سمیت و افزایش فعالیت ضدباکتریایی گرافن اکسید (GO) با کیتوسان (CS) پیشنهاد دادند. در این پژوهش، انواع مختلفی از نانوهیبریدهای GO-CS با اتصال انواع مختلف ساختارهای کیتوسان با گرافن اکسید سنتز شدند. برای این کار ابتدا گرافن اکسید طبق روش تغییریافته Hummer تهیه و سپس نانوهیبرید GO-CS سنتز شد. انواع مختلف نانوهیبرید GO-CS با پیوندزدن GO به انواع ساختار کیتوسان نیز برای دست‌یابی به خواص مطلوب سنتز شدند. نتایج نشان داد، روش پیوندزنی GO با CS خواص زیستی به آن بخشیده و برای سلول‌های فیبروبلاست پوست بدون سمیت بوده است

در مطالعه دیگری، نانوهیبرید کیتوسان-روی اکسید فعالیت ضدباکتریایی بهتر و درجه سمیت سلولی کمتری نسبت به نانوذرات روی اکسید در غلظت‌های یکسان در برابر باکتری‌های گرم منفی و مثبت نشان دادند [۱۸]. با وجود استفاده از پلیمر کیتوسان در مخلوط با سایر پلیمرها برای تولید نانوالیاف، در مطالعات محدودی، قابلیت استفاده از نانولیفچه‌های کیتوسانی مطالعه شده است. به‌نظر می‌رسد، استفاده از نانولیفچه‌های کیتوسان با نسبت سطح به حجم زیاد در ساختار نانوالیاف بتواند کارایی آن‌ها را در کاربردهای مختلف افزایش دهد.

فدایی و همکاران [۱۹] با روش الکتروریسی زیست‌نانوکامپوزیت متشکل از پلی‌کاپرولاکتون (PCL) و کیتوسان نانولیفچه‌ای‌شده را برای کاربرد به‌عنوان داربست ارائه دادند. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد، افزودن نانولیفچه‌های کیتوسان به محلول PCL در اثر متغیرهای الکتروریسی ثابت، موجب اصلاح گرانروی و تغییرات چشمگیر در رسانندگی آن و در نهایت افزایش قابلیت الکتروریسی شد. داربست‌های معرفی‌شده خواص مکانیکی، ترشدگی و سازگاری سلولی مناسبی نشان دادند. از نانوکامپوزیت‌های لیفی آلژینات-ویسکرهای (whiskers) کیتوسان زخم‌پوش با خواص ضدباکتریایی زیاد تهیه شد. ویسکرهای کیتوسان از استیل‌زدایی ویسکرهای کیتین به‌دست آمدند. ترکیب ویسکرهای کیتوسان حتی با ابعاد کوچک (۱٪ وزنی) موجب افزایش رفتار مکانیکی و نیز فعالیت ضدباکتریایی

نانوالیاف آلژینات شد [۲۰]. نانوکامپوزیت ZnO-کیتوسان، با روش سنتز درجا به‌عنوان جاذب رنگ قرمز مایع (کنگو) از محلول‌های آبی به‌کار گرفته شد. عکس‌های FE-SEM و TEM، شکل‌شناسی کروی ماده را نشان داد و متوسط اندازه منافذ نانوکامپوزیت، ۱۲/۲ nm گزارش شد [۲۱]. امجدی و همکاران [۲۲] نانوکامپوزیت‌های بر پایه ژلاتین دارای نانولیفچه کیتوسان (CHNF) به‌همراه نانوذرات روی اکسید (ZnONPs) را برای بسته‌بندی مواد غذایی پیشنهاد دادند که به‌دلیل متراکم‌بودن، خواص مکانیکی و دفع آب خوبی نشان دادند. همچنین، اثر هم‌افزایی CHNF و ZnONPs، اثر ضدباکتریایی نانوکامپوزیت را بهبود بخشید.

در پژوهش حاضر، نانولیفچه‌های کیتوسان با ذرات روی اکسید با غلظت‌های مختلف در محلول PLA بارگذاری شد و اثر آن بر خواص شکل‌شناسی و آب‌دوستی PLA بررسی شد. نانولیفچه‌های کیتوسان برای تأمین خواص ضدمیکروبی و زیستی مطلوب، پلیمر سنتزی PLA برای تأمین خواص مکانیکی و پایداری در محیط آبی و نانوذرات روی اکسید به‌دلیل داشتن خواص ضدمیکروبی و ضدقارچ به‌کار گرفته شدند تا داربست مناسبی تهیه شود. همچنین به‌دلیل کاهش تعداد آزمایش‌ها و در نتیجه کاهش هزینه مواد مصرفی و زمان، با استفاده از طراحی آزمایش تاگوچی با سه عامل غلظت PLA، غلظت CS/ZnO و ترکیب درصد در سه سطح مختلف، ۹ آزمایش مختلف انجام شد. پس از تعیین نمونه بهینه، زبری سطح و کشت سلولی روی آن نیز بررسی شد.

تجربی

مواد

از پلی(لاکتیک اسید) (PLA) نوع D3251 محصول شرکت Nature-Works آمریکا با M_n و M_w به‌ترتیب برابر ۲۹۰۰۰ و ۲۵۰۰۰ g/mol استفاده شد. ژل ٪۲/۵ آبی کیتوسان از شرکت نانونوین پلیمر با درجه استیل‌زدایی ٪۸۵ تهیه شد که دارای وزن مولکولی Da ۸۰۰۰۰-۵۰۰۰۰، قطر نانولیفچه nm ۴۳-۴۲ و طولی بیش از µm ۵ بود. دی‌کلرومتان، با خلوص ٪۹۸ نیز برای حل‌کردن PLA استفاده شد. ترکیب درصدهای ۲:۱ و ۱:۱ CS/ZnO از دانشگاه گلستان تهیه شد که به‌ترتیب شامل g ۰/۶ نانولیفچه‌های کیتوسان (نانوژل ٪۲/۵ وزنی) و g ۰/۳ روی اکسید و g ۰/۳ نانولیفچه‌های کیتوسان (نانوژل ٪۲/۵ وزنی) و g ۰/۳ روی اکسید بود.

جدول ۱- آزمایش‌های گزارش‌شده با تاگوچی برای طراحی آزمایش.
Table 1. Experiments reported by Taguchi for experimental design.

Sample	Factor A	Factor B	Factor C
S_1	1	1	1
S_2	1	2	2
S_3	1	3	3
S_4	2	1	2
S_5	2	2	3
S_6	2	3	1
S_7	3	1	3
S_8	3	2	1
S_9	3	3	2

دستگاه‌ها و روش‌ها

تهیه محلول‌های لازم برای الکتروریسی

PLA با سه غلظت ۷، ۹ و ٪wt ۱۱ در دی‌کلرومتان به‌همراه یکی از ترکیب درصدهای CS/ZnO با غلظت وزنی ۵، ۱۰ و ٪۲۰ بر اساس وزن خشک پلیمر استفاده‌شده در ساختار محلول پلیمری طبق طراحی آزمایش تهیه شدند و مرحله همزدن به‌منظور دست‌یابی به محلول پلیمری یکنواخت و همگن به‌مدت h ۱۲ انجام شد. سپس، محلول تهیه‌شده در سرنگ mL ۱۰ با دستگاه الکتروریسی با فاصله ریسندگی mm ۱۴۰، ولتاژ kV ۱۵ و سرعت تغذیه mL/h ۱ ریسیده شده و نانوالیاف روی جمع‌کننده چرخان به‌صورت شبکه بی‌بافت جمع شدند. سپس قطر، شکل‌شناسی و زاویه تماس نانوالیاف بررسی شد.

طراحی آزمایش

روش تاگوچی رویکردی منسجم و کارآمد، برای انجام آزمایش و تعیین بهینه تقریبی متغیرهاست. در این روش از آرایه‌های متعامد (orthogonal) برای مطالعه تعداد زیادی از متغیرها با استفاده از تعداد کمی آزمایش‌ها، استفاده می‌شود. با این رویکرد به‌طور شایان توجهی تعداد آزمایش‌های لازم برای مطالعه نیز کاهش می‌یابد. نتایج حاصل از آزمایش‌های مقیاس‌کوچک روی کل منطقه آزمایشی محاسبه می‌شوند که به‌کمک عوامل کنترل و تنظیمات آن‌ها درنظر گرفته شده است. در این روش، می‌توان هزینه‌های پژوهش و توسعه را به‌طور هم‌زمان با مطالعه تعداد زیادی عوامل کاهش داد. به‌منظور تحلیل نتایج، در تاگوچی از تحلیل عملکرد واریانس (ANOVA) استفاده می‌شود [۲۳،۲۴].

برای بررسی اثر مهم‌ترین عوامل اثرگذار بر خواص الیاف تشکیل‌شده، غلظت PLA در سه سطح ۷، ۹ و ۱۱٪ وزنی، غلظت CS/ZnO در سه سطح ۵، ۱۰ و ۲۰٪ و ترکیب درصد CS/ZnO در سه سطح ۱:۰، ۲:۱ و ۱:۱ تغییر یافتند و از روش طراحی آزمایش تاگوچی برای کمترکردن تعداد آزمایش‌های ممکن استفاده شد. جدول ۱ طراحی آزمایش گزارش‌شده با روش تاگوچی و جدول ۲ متغیرها و سطوح بررسی‌شده را نشان می‌دهد. پس از طراحی آزمایش، تعداد ۹ آزمایش با نرم‌افزار Minitab 18 پیشنهاد داده شد.

بررسی خواص نمونه‌ها

برای تهیه داربست‌های نانولیفی از دستگاه الکتروریسی ساخت شرکت اطلس‌سازه آریا استفاده شد. از جمله خواص تعیین‌کننده داربست‌های نانولیفی برای استفاده در کاربردهای زیستی، ویژگی‌های آب‌دوستی و آب‌گریزی آن‌هاست. در این مطالعه، به‌منظور تشخیص مقدار آب‌دوستی نمونه‌ها از روش چکاندن قطره آب روی سطح نانوالیاف با اندازه مربعی به مساحت $1\ cm^2$ و تهیه تصویر از شکل قطره استفاده شد. نحوه قرارگیری قطره روی سطح الیاف با تجهیزات ویدئویی مدل CAG10-9610IL58300 ساخت شرکت JIKAN CAG-10 تصویربرداری شد. سپس، با اندازه‌گیری زاویه تماس میان قطره آب و سطح، ماهیت آب‌دوستی یا آب‌گریزی داربست‌ها بررسی شد. برای گزارش مقدار زاویه آب‌دوستی از نرم‌افزار Image J استفاده شد. میکرسکوپ الکترونی پویشی مدل TESCAN Vega ساخت شرکت Tescan جمهوری چک برای مطالعه شکل‌شناسی و اندازه‌گیری قطر نانوالیاف تهیه‌شده به‌کار گرفته شد. از آنجا که SEM شعاع‌های الکترونی را به سطح نمونه می‌تاباند. بنابراین، سطح نمونه باید دارای رسانندگی الکتریکی باشد. از این‌رو، لایه نازکی از طلا روی سطح نمونه‌ها نشانده شد. سپس، از نرم‌افزار Web Plot Digitalizer برای اندازه‌گیری قطر نانوالیاف الکتروریسی‌شده استفاده شد. اندازه‌گیری زبری با میکروسکوپ کاونده پویشی (Scaning Probe Microscope) مدل DME-95-50 E ساخت شرکت DME دانمارک انجام شد.

جدول ۲- عوامل طراحی آزمایش و سطوح تغییر آن‌ها.

Table 2. Factors for experiment desig and their levels of change.

Factors	Level 1	Level 2	Level 3
A: PLA concentration (%)	7	9	11
B: CS/ZnO concentration (%)	5	10	20
C: CS/ZnO composition	1:0	2:1	1:1

سپس، با نرم‌افزار DME عکس‌های دو و سه‌بعدی و نیز درجه زبری آن به‌دست آمد.

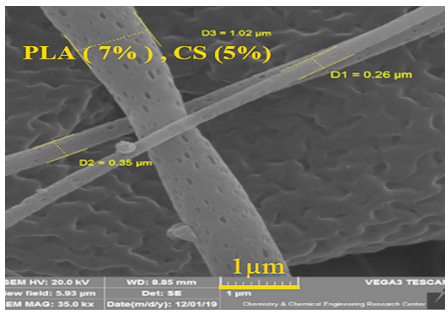
برای بررسی سمیت سلولی، مقدار زیست‌پذیری سلول‌های فیبروبلاست کشت داده‌شده روی داربست‌های نانولیفی با روش رنگ‌سنجی به‌کمک آزمون MTT ارزیابی شد. بدین منظور، سلول‌های فیبروبلاست موش رده L929 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM غنی‌شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و آنتی‌بیوتیک پنیسلین استروپتومایسن (۱٪) کشت داده شدند. سلول‌ها درون انکوباتور با دمای ۳۷°، رطوبت ۹۵٪ و کربن دی‌اکسید ۵٪ نگه‌داری شدند. وقتی سلول‌ها حدود ۸۰٪ از کف فلاسک را پُر کردند، با استفاده از تریپسین از کف فلاسک جدا و در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای پوشش‌یافته با نانوالیاف سترون‌شده PLA، PLA/CS/ZnO و PLA/CS کشت داده شدند. پس گذشت ۴۸ h، مطابق با آزمون MTT ابتدا محیط رویی برداشته شد و سلول‌ها دو مرتبه با بافر PBS شست‌وشو داده شدند. به‌دنبال آن، سلول‌ها با ۲۰ µL محلول MTT و ۱۰۰ µL محیط کشت انکوبه شدند. پس از گذشت ۴ h، محیط رویی برداشته شد و ۱۰۰ µL محلول DMSO به هر چاهک اضافه و به‌مدت ۳۰ min درون انکوباتور تکانه‌دار قرار داده شدند. مقدار جذب نوری با دستگاه ELISA Reader در طول موج ۵۷۰ nm تعیین شد. مقدار زیست‌پذیری سلول نسبت به گروه کنترل از معادله (۱) به‌دست آمد:

$$\text{مقدار بقای سلولی (٪)} = \frac{\text{میانگین جذب نوری در گروه بررسی‌شده}}{\text{میانگین جذب نوری در گروه کنترل}} \quad (۱)$$

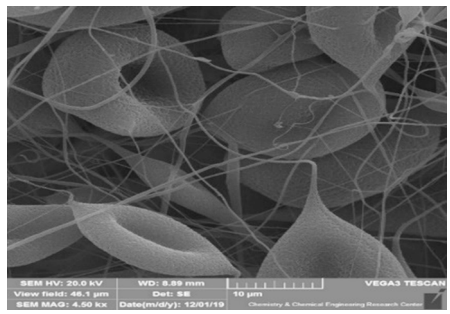
نتایج و بحث

بررسی قطر و شکل‌شناسی نمونه‌ها

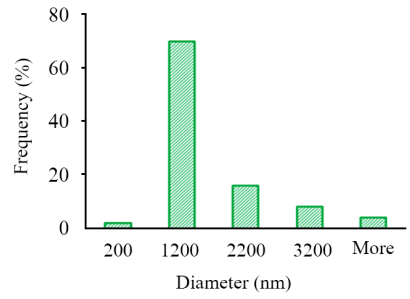
شکل‌شناسی نانوالیاف بر خواص مکانیکی، فیزیکی و زیستی داربست‌های تولیدی مؤثر است. عواملی مانند قطر و یکنواختی قطری الیاف بر خواص شکل‌شناسی الیاف اثرگذارند. با طراحی آزمایش تاگوچی و تغییر عامل‌های مؤثر و تعیین‌شده، ۹ آزمایش مختلف انجام شد و نانوالیاف مدنظر تهیه شدند. در شکل ۱ عکس‌های میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) و نمودار ستونی (histogram) قطر و در جدول ۳ آزمایش‌های حاصل از طراحی با روش تاگوچی و قطر الیاف به‌دست‌آمده نشان داده شدند که نتایج نشانگر قطر الیاف در محدوده میکرومتر و نانومتر هستند.



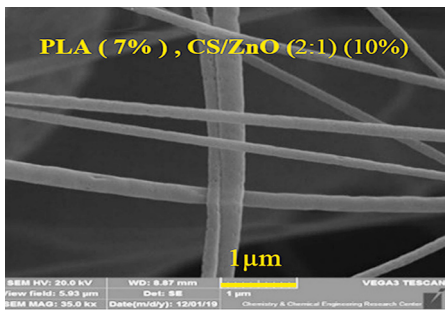
(a1)



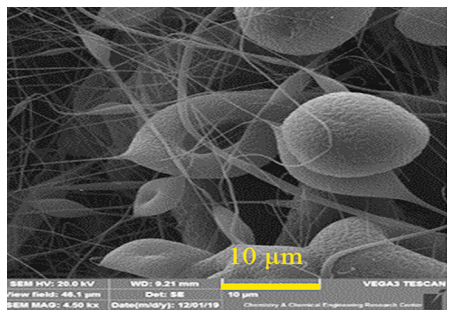
(a2)



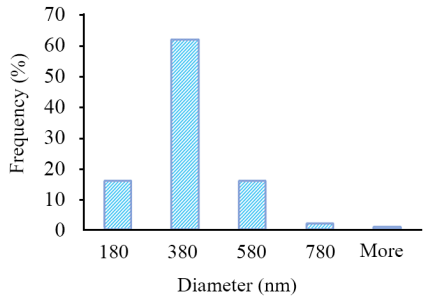
(a3)



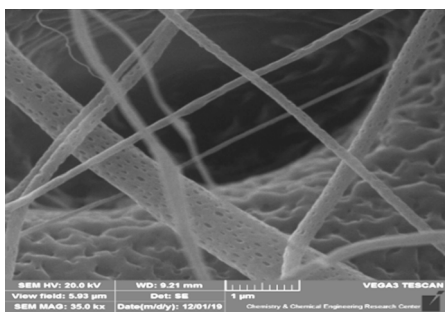
(b1)



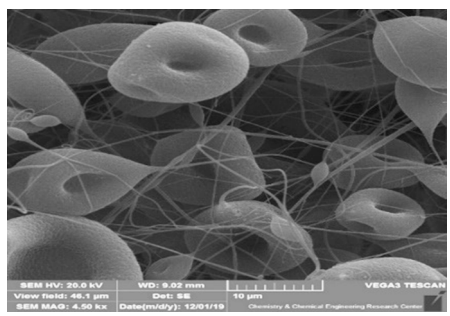
(b2)



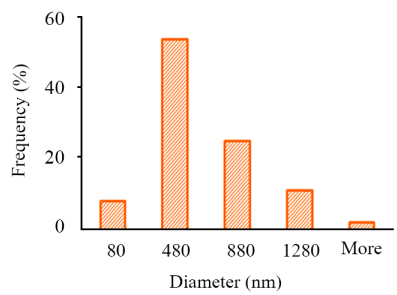
(b3)



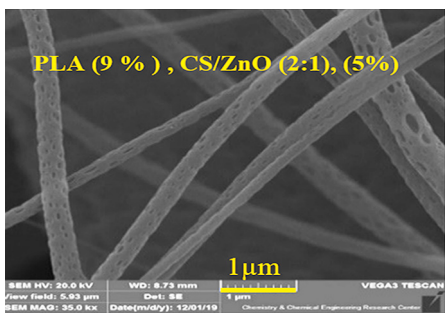
(c1)



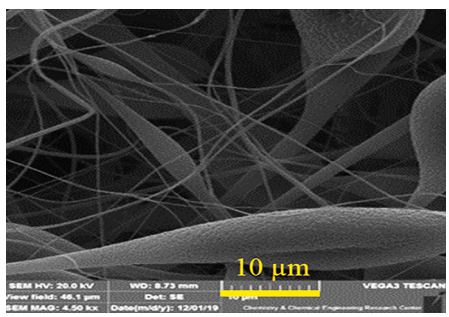
(c2)



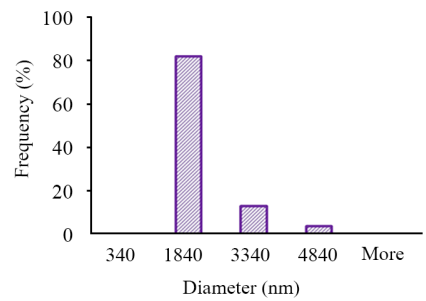
(c3)



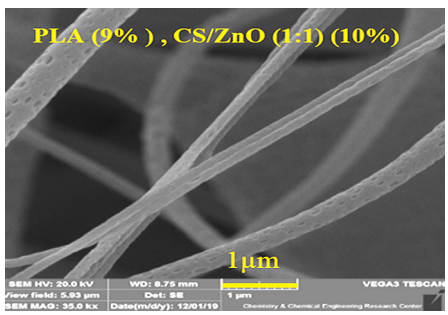
(d1)



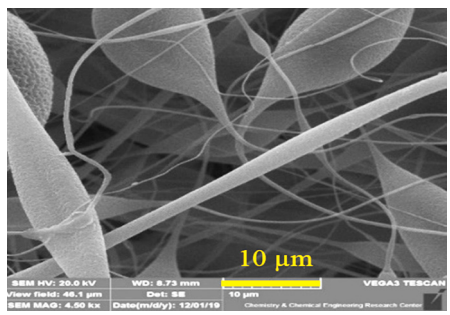
(d2)



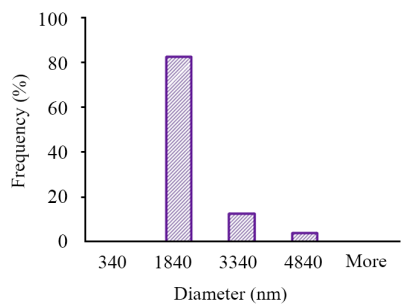
(d3)



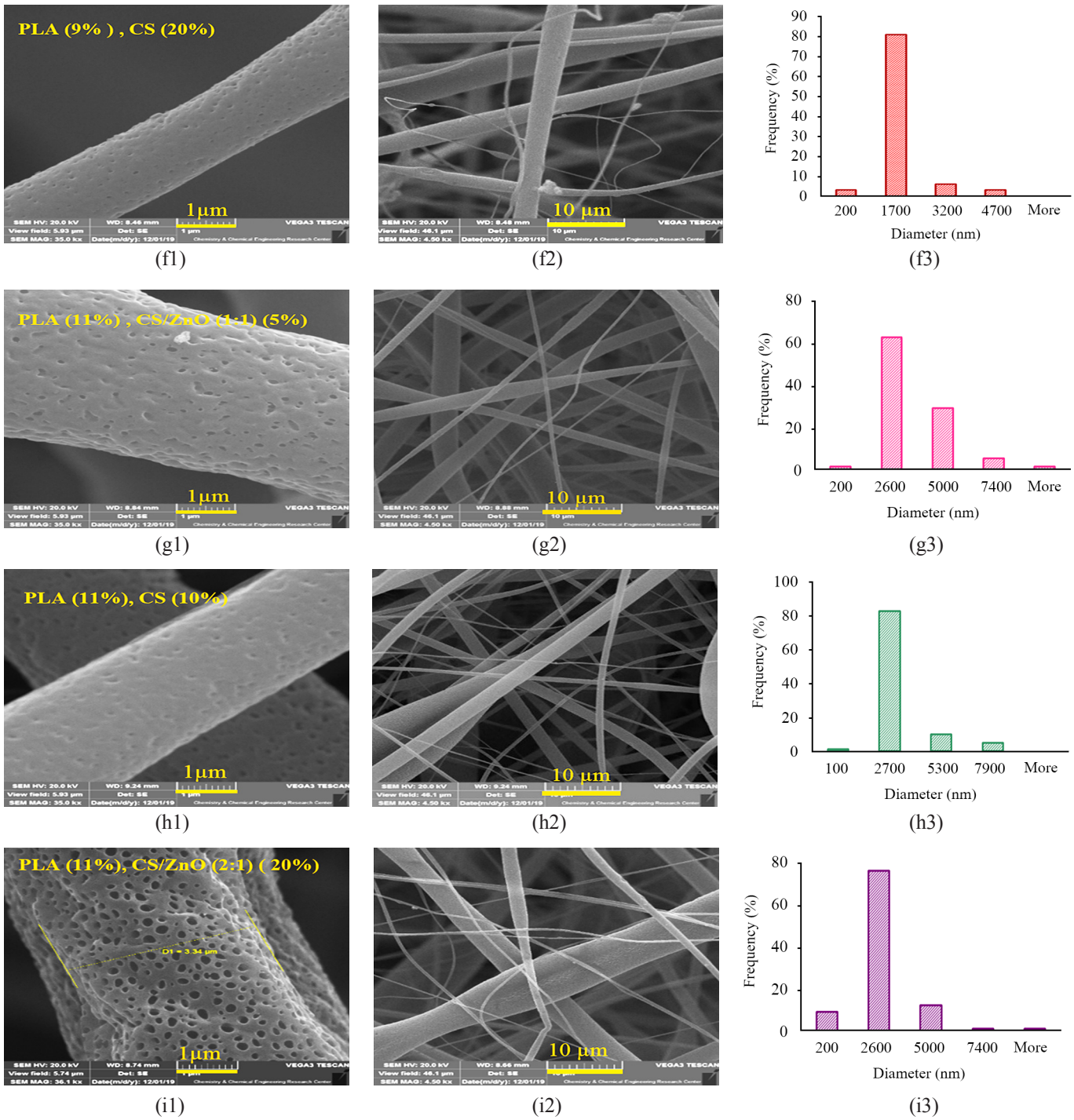
(e1)



(e2)



(e3)



شکل ۱- عکس‌های میکروسکوپی الکترونی پویشی (SEM) و نمودارهای ستونی قطر نمونه‌ها.

Fig. 1. Scanning electron microscopy (SEM) images and diameter histogram diagrams of sampls.

بررسی اثر متغیرهای آزمایش بر قطر الیاف

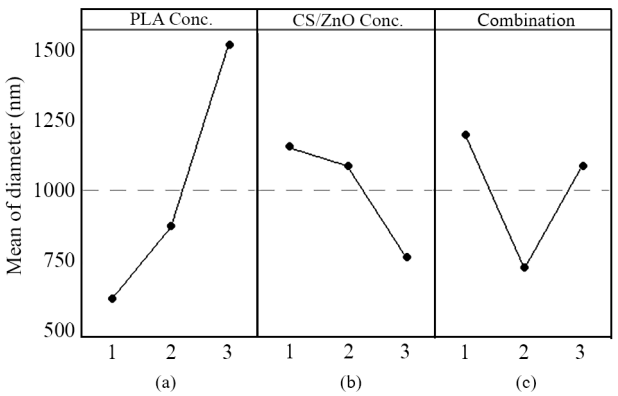
در فرایند الکتروریسی برای تشکیل الیاف، به مقدار کمینه‌ای از غلظت پلیمر نیاز است. در کمتر از این مقدار بحرانی، با اعمال ولتاژ ناپایداری به‌وجود می‌آید که به تشکیل دانه‌تسبیحی منجر می‌شود. به‌عبارتی در غلظت‌های کم، گره‌خوردگی زنجیر پلیمری کافی نیست. با افزایش غلظت، مخلوط دانه‌تسبیحی و زنجیر لیفی تولید می‌شود. افزایش بیشتر غلظت به تشکیل الیاف پیوسته منجر می‌شود. گفتنی است، در غلظت خیلی زیاد، الیاف یکنواخت بلندتر به‌دلیل افزایش گرانروی محلول، قابل تهیه نیست [۲۵]. شکل ۲ بررسی اثر عامل‌های اصلی بر قطر الیاف تولیدشده را نشان می‌دهد. در شکل ۱ (a) مشخص

جدول۳- نتایج آزمایش‌های طراحی آزمایش با روش تاگوچی و قطر الیاف به‌دست‌آمده.

Table 3: Experiments results from the design of the experiment by Taguchi method and the diameter of the resulting fibers.

Combination	PLA (%)	CS/ZnO (%)	Diameter (nm)
CS	7	5	89±1010
CS/ZnO (1:2)	7	10	42±411
CS/ZnO (1:1)	7	20	74±436
CS/ZnO (1:2)	9	5	10±700
CS/ZnO (1:1)	9	10	74±1090
CS	9	20	84±840
CS/ZnO (1:1)	11	5	71±1775
CS	11	10	10±1755
CS/ZnO (1:2)	11	20	12±1050

است، افزایش غلظت PLA موجب افزایش معنادار ($P\ value < 0.05$) قطرنانوالیاف تولیدی شده است (جدول ۴). برای توجیه این موضوع می‌توان گفت، افزایش غلظت محلول پلیمری همراه با افزایش گرانروی و درهم‌گیری زنجیرهای پلیمری بوده، اما به نیروی زیادی برای بازکردن گره‌ها و کشش نیاز است و نیروهای الکتروستاتیک اعمال‌شده ثابت و در فاصله ریسندگی ثابت قابلیت ظریف‌ترکردن جت پلیمری را ندارد، در نتیجه قطر تولیدی افزایش می‌یابد [۲۶،۲۷]. همچنین، افزایش غلظت موجب وجود بیشتر مواد در جت و افزایش جرم پلیمر در آن می‌شود و قطر نانوالیاف افزایش می‌یابد [۲۸]. در این مطالعه، سه نوع غلظت (۷، ۹ و ۱۱ wt٪) برای PLA درنظر گرفته



شکل ۲- اثر عوامل تعیین‌شده بر قطر نانوالیاف.

Fig. 2. The effect of the determined factors on the diameter of nanofibers.

جدول ۴- جدول ANOVA و تحلیل متغیرهای اثرگذار بر قطر داربست‌ها.

Table 4. ANOVA table and analysis of variables affecting the diameter of scaffolds.

Factors	P-value amount	F ratio	Degree of freedom
PLA concentration	0.010	94.76	2
CS/ZnO concentration	0.049	19.28	2
Type of composition	0.036	26.55	2

شده است. نتایج عکس‌های SEM نانوالیاف نشان داد، نانوالیاف PLA با غلظت ۷٪، معمولاً دارای ساختار دانه‌تسبیحی هستند (نمونه‌های ۵٪ CS-، ۷٪PLA، ۱۰٪ CS/ZnO (۲:۱)-۷٪PLA و ۲۰٪ CS/ZnO (۱:۱)-۷٪ PLA) و با افزایش غلظت به ۹٪ (نمونه‌های ۵٪ CS/ZnO (۲:۱)-۹٪ PLA، ۱۰٪ CS/ZnO (۱:۱)-۹٪ PLA و ۲۰٪ CS-۹٪PLA)، این ساختارها تبدیل به دوک شده و در غلظت ۱۱٪، دوک‌ها از بین رفته‌اند (نمونه‌های ۵٪ CS/ZnO (۱:۱)-۱۱٪ PLA، ۵٪ (۲:۱) CS/ZnO-۱۱٪ PLA و ۱۰٪ CS-۱۱٪PLA). زیرا، با افزایش غلظت پلیمر و درهم‌گیری زنجیرهای پلیمری، گرانروی محلول نیز افزایش می‌یابد. از این‌رو، افزایش در نیروی گرانروکشسان موجب متعادل‌شدن نیروی کششی کولمبی شده که به تولید نانوالیاف با بید کمتر منجر شده است. در نهایت، نانوالیاف با شکل‌شناسی صاف و بدون دوک یا دانه‌تسبیحی حاصل می‌شود [۲۹].

در شکل ۲ (b) نیز مشخص است، افزایش غلظت CS/ZnO (۵، ۱۰ و ۱۵ wt٪) در ترکیب موجب کاهش معنادار قطر الیاف تولیدی شده است. از آنجا که ZnO ماده نیمه‌رسانایی است، طی فرایند الکتروریسی محلول پلیمری با ZnONPs ظرفیت بار بیشتری دارد و باعث ایجاد نیروی الکتریکی قوی‌تر حین تولید الیاف می‌شود. بنابراین، قطر الیاف تولیدی کوچک‌تر می‌شود [۳۰]. قلی‌پور و همکاران [۳۱] از نتایج SEM دریافتند، با افزایش مقدار کیتوسان در ترکیب مخلوط CS/PVA، نانوالیاف ظریف‌تری تولید شدند. زیرا، با افزایش مقدار کیتوسان در مخلوط، تعداد گروه‌های آمینه‌ای افزایش یافتند که می‌توانند در محیط اسیدی دارای بار مثبت شوند. بنابراین، چگالی بارهای الکتریکی روی سطح جت بیشتر شده، جت تحت تأثیر میدان الکتریکی قوی‌تر، بیشتر کشیده می‌شود و قطر نانوالیاف تولیدی کاهش می‌یابد. اثر غلظت ترکیب CS/ZnO طبق نتایج جدول ۴ بر کاهش قطر، معنادار است. با توجه به شکل ۱ که عکس‌های SEM نانوالیاف را نشان می‌دهد، با افزایش غلظت CS/ZnO نیز الیاف یکنواخت‌تری به‌دست می‌آیند. ذبیحی و همکاران [۱۸]

گزارش کردند، سطح کیتوسان خالص کاملاً صاف است و در ترکیب هیبرید کیتوسان-نانوذرات روی اکسید (CS-ZnO-NPs)، ورقه‌های نانوذرات روی اکسید توزیع بسیار خوبی را در سطح ماتریس کیتوسان نشان می‌دهند.

یکی از عوامل اثرگذار بر قطر و شکل‌شناسی الیاف تولیدشده، نوع ترکیب و مواد بارگذاری‌شده در ساختار محلول پلیمری است. شکل ۲ (c) نیز روند اثر نوع ترکیب بر قطر نانوالیاف تولیدی را نشان می‌دهد. بدین منظور، اثر ترکیب درصد شامل ژل CS، CS/ZnO ۲:۱ و CS/ZnO ۱:۱ بر خواص شکل‌شناسی و قطر الیاف بررسی شد. طبق شکل۲ (c)، افزودن ترکیب CS/ZnO ۲:۱ در مقایسه با افزودن ژل کیتوسان، موجب کاهش قطر الیاف تولیدی شده است که این را می‌توان به اثر نانوذرات روی اکسید بر افزایش مقدار بار الکتریکی و رسانندگی محلول نسبت داد. با اضافه‌کردن ترکیب CS/ZnO ۱:۱ به محلول پلیمری، قطر الیاف به‌طور تقریبی از ۷۰۰ nm به ۱۱۰۰ nm افزایش یافت. این روند افزایشی با تغییر ترکیب درصد CS/ZnO از ۲:۱ به ۱:۱ را می‌توان به وجود بیشتر کیتوسان در ترکیب ۲:۱ در مقایسه با ۱:۱ نسبت داد. همچنین، کاهش قطر نانوذرات پلیمری را می‌توان به افزایش بار الکتریکی و رسانندگی ترکیب پلیمری نسبت داد که به کاهش اندازه نانوالیاف منجر می‌شود [۳۲،۳۳]. Hardiansyah و همکاران [۳۴] از نتایج بررسی شکل‌شناسی و قطر نانوالیاف به این نتیجه رسیدند که نانوالیاف PLA خالص بیشترین قطر متوسط (۸۸۱ nm) را دارند و افزودن کیتوسان به ترکیب موجب کاهش آن می‌شود. بنابراین، با توجه به جدول ۴ هر سه عامل مدنظر اثر معناداری را بر قطر داشته و اثر غلظت PLA بیشتر از سایر پارامترهاست، زیرا مقدار P (P-value) کمتری دارد.

اثر متقابل غلظت PLA و CS/ZnO بر قطر نانوالیاف

شکل ۳ نمودار دوبعدی اثر متقابل غلظت‌های PLA و CS/ZnO را بر قطر نانوالیاف نشان می‌دهد. طبق شکل ۳ (a1) با کاهش غلظت PLA از ٪۱۱ به ٪۷ و افزایش غلظت CS/ZnO به ٪۲۰، قطر کاهش یافته است. همچنین، بر اساس این نمودار بیشترین مقدار قطر برای غلظت ٪۱۱ PLA و غلظت ٪۵ CS/ZnO دیده شده است. شکل ۳ (a2)، نمودار سه‌بعدی اثر متقابل غلظت‌های PLA و CS/ZnO را بر قطر نشان می‌دهد. طبق این نمودار با افزایش غلظت PLA و کاهش غلظت CS/ZnO، بیشترین قطر برای نانوالیاف دیده می‌شود. هر چقدر مقدار غلظت PLA کمتر (٪wt ۷) و مقدار CS/ZnO بیشتر باشد (٪wt ۲۰)، در این حالت قطر نانوالیاف دارای کمترین مقدار است.

اثر متقابل غلظت PLA و ترکیب درصد بر قطر نانوالیاف

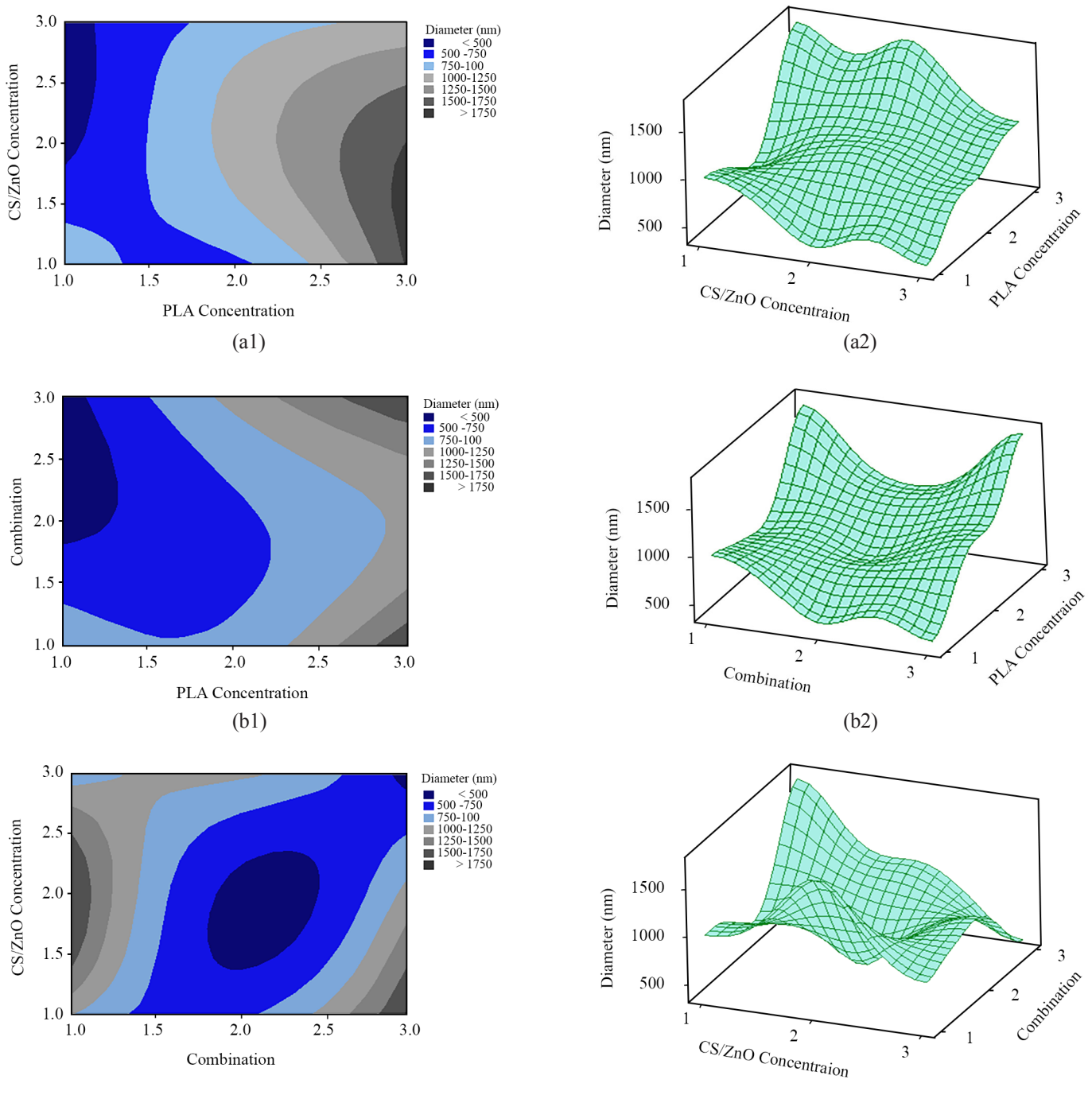
شکل ۳ (b1) نیز نمودار دوبعدی اثر متقابل غلظت PLA و ترکیب درصد را بر قطر نشان می‌دهد که با کاهش غلظت PLA از ٪۱۱ به ٪۷ در ترکیب درصد CS/ZnO ۲:۱ کمترین قطر برای نانوالیاف دیده شده است. همچنین، با افزایش غلظت PLA از ٪۷ به ٪۱۱ در ترکیب درصد CS/ZnO ۱:۱ بیشترین قطر برای نانوالیاف دیده می‌شود. شکل۳ (b2) نیز نمودار سه‌بعدی اثر متقابل غلظت PLA و ترکیب درصد را بر قطر نشان می‌دهد. با افزایش غلظت PLA، از ٪۷ به ٪۱۱ در ترکیب CS/ZnO ۱:۱ بیشترین قطر برای نانوالیاف دیده شد.

اثر متقابل غلظت CS/ZnO و ترکیب درصد بر قطر نانوالیاف

شکل ۳ (c1) نمودار دوبعدی اثر متقابل غلظت CS/ZnO و ترکیب درصد را بر قطر نشان می‌دهد. طبق این نمودار با افزایش غلظت CS/ZnO از ٪۵ به ٪۲۰ در ترکیب CS/ZnO ۲:۱ قطر نانوالیاف کمترین مقدار است. زیرا، با افزایش کیتوسان در ترکیب به‌دلیل خواص پلی‌کاتیونی کیتوسان و باردارشدن محلول پلیمری در اثر اعمال نیروهای الکتروستاتیکی، کشش بیشتر شده و نانوالیاف با قطر کم تولید می‌شوند [۳۱]. شکل ۳ (c2) نمودار سه‌بعدی اثر متقابل غلظت CS/ZnO و ترکیب درصد آن را بر قطر نشان می‌دهد. با توجه به این نمودار با افزایش غلظت CS/ZnO از ٪۵ به ٪۱۰ و در ترکیب درصد CS/Zn ۲:۱ قطر نانوالیاف کاهش می‌یابد.

بررسی مقدار آب‌دوستی نمونه‌ها

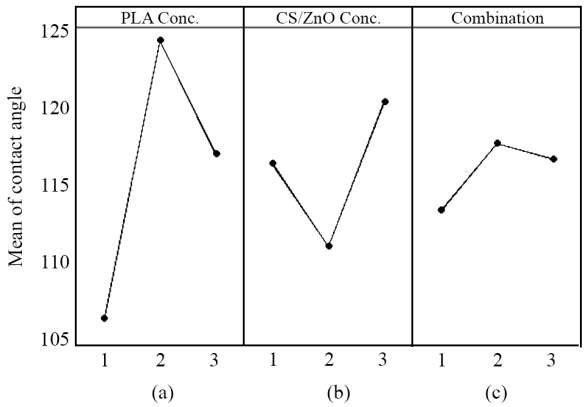
قابلیت سطح نانوالیاف در جذب آب با اندازه‌گیری زاویه تماس میان سطح نانوالیاف و قطره آب به‌دست می‌آید. اگر زاویه تماس میان سطح نانوالیاف و قطره آب کمتر از ۹۰° باشد، در این حالت، نانوالیاف تشکیل‌شده آب‌دوست بوده و اگر بیش از ۹۰° باشد، در این صورت، نانوالیاف تشکیل‌شده آب‌گریز هستند [۳۵]. شکل ۴، اثر کلی عوامل بر زاویه تماس و شکل ۵ عکس‌های مربوط به زاویه تماس نانوالیاف را نشان می‌دهد. در شکل ۴ (a) اثر غلظت PLA بر زاویه تماس نشان داده شده و همان‌طورکه مشخص است، افزایش غلظت PLA از ٪۷ به ٪۹، موجب افزایش معنادار زاویه تماس نانوالیاف تولیدی شده است. برای توجیه این موضوع می‌توان گفت، PLA پلیمری آب‌گریز بوده و با افزایش مقدار آن در ساختار نهایی، به‌دلیل افزایش مقدار ماده جامد این پلیمر، زاویه تماس افزایش می‌یابد [۳۶]. نتایج این مطالعه نشان داد، با افزایش غلظت PLA از ٪۷ به ٪۹، زاویه تماس نانوالیاف ٪۵ CS و ٪۷ PLA از ۱۰۴° به ۱۲۷° (٪۵ (۲:۱) CS/ZnO و ٪۹ PLA) افزایش یافت.



شکل ۳- نمودارهای (a1)، (b1) و (c1) دوبعدی و (a2)، (b2) و(c2) سه‌بعدی اثر متقابل عوامل بر قطر نانوالیاف.

Fig. 3. Diagrams of (a1), (b1),(c1) two-dimensional and (a2), (b2), (c2) three-dimension from the interaction effect of factors on the diameter of nanofibers.

شکل ۵ (b) نیز اثر غلظت ترکیب CS/ZnO را بر زاویه تماس نانوالیاف نشان می‌دهد. طبق این نمودار با افزایش غلظت CS/ZnO از ٪۵ به ٪۱۰ زاویه تماس از °۱۲۷ (٪۵ (۲:۱) CS/ZnO و ٪۹ PLA) به °۱۲۰ (٪۱۰ (۱:۱) CS/ZnO و ٪۹ PLA) کاهش می‌یابد. زیرا، با افزایش مقدار کیتوسان در ساختار نانولیفی دارای گروه‌های آب‌دوستی مانند کربوکسیل و آمین، خاصیت آب‌دوستی الیاف افزایش می‌یابد. اما، با افزایش غلظت ترکیب CS/ZnO از ٪۱۰ به ٪۲۰ افزون بر افزایش مقدار کیتوسان در ترکیب، مقدار نانوذرات

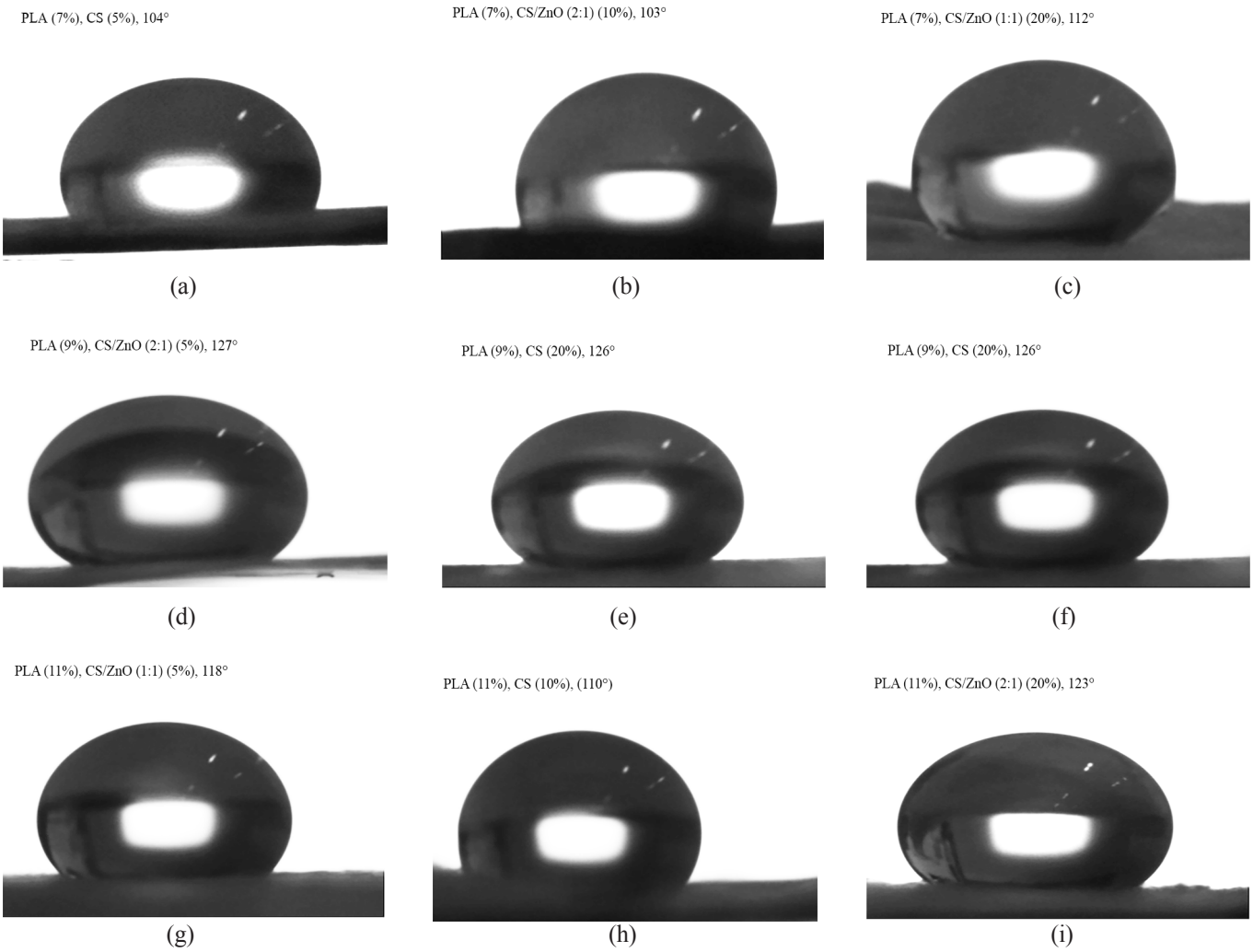


شکل ۴- اثر عامل‌های اصلی بر زاویه تماس نانوالیاف تولیدی.

Fig. 4. Effect of the main factors on the contact angle of the produced nanofibers.

روی اکسید نیز افزایش یافته و به‌دلیل داشتن ماهیت آب‌گریزی نانوذرات روی اکسید، آب‌گریزی نمونه‌ها نیز افزایش می‌یابد [۳۷]. یافته‌های Amitha و همکاران [۳۷] نشان داد، زاویه تماس نانوالیاف سلولوز استات خالص ۳۱° بود که با افزودن نانوذرات روی اکسید، به ۱۲۴° افزایش یافت.

شکل ۵ (c) روند اثر ترکیب درصد ژل CS، ۲:۱ و ۱:۱ CS/ZnO را بر زاویه تماس نانوالیاف تولیدی نشان می‌دهد. طبق این نمودار، مقدار زاویه تماس نمونه دارای ژل حدود ۱۱۰° بود که با تغییر ترکیب به ۲:۱ CS/ZnO، به حدود ۱۲۳° افزایش یافت. علت این موضوع را می‌توان به افزایش مقدار نانوذرات روی اکسید در ترکیب نسبت داد که حرکت زنجیرهای پلیمری کیتوسان را محدود می‌کند. در نمونه دارای ۱:۱ CS/ZnO، زاویه تماس حدود ۱۱۸° و مقدار



شکل ۵- نتایج زاویه تماس نانوالیاف.

Fig. 5. Contact angle results of nanofibers.

جدول ۵- جدول ANOVA و تحلیل متغیرهای اثرگذار بر زاویه تماس داربست‌ها.

Table 5. ANOVA table and analysis of variables affecting the contact angle of scaffolds.

Factors	Degree of freedom	P-value	F ratio
PLA concentration	2	0.002	553.00
CS/ZnO concentration	2	0.007	148.00
Composition	2	0.028	13.75

کاهش جزئی بود. Liu و همکارن [۳۸] دریافتند، نانوالیاف اتیل سلولوز-ژلاتین (EG)، زاویه تماس حدود ۱۱۹/۳° نشان دادند و افزودن نانوذرات روی اکسید موجب افزایش خاصیت آب‌گریزی نانوالیاف تولیدی می‌شود. جدول ۵ نتایج تحلیل عامل‌ها بر زاویه تماس میانگین نانوالیاف الکتروریسی‌شده را پس از گذشت زمان ۳، ۶ و ۹ s از تماس قطره نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است، هر سه عامل بررسی‌شده اثر مهمی بر زاویه تماس دارند.

اثر متقابل عامل‌ها بر مقدار زاویه تماس نانوالیاف

شکل ۶ (a1)، نمودار دوبعدی اثر متقابل غلظت‌های PLA و CS/ZnO را بر زاویه تماس نانوالیاف نشان می‌دهد. با توجه به نمودار با کاهش غلظت PLA به ٪۷ و با افزایش غلظت CS/ZnO از ٪۵ به ٪۱۰ کمترین زاویه تماس دیده می‌شود. زیرا، PLA به‌طور ذاتی پلیمری آب‌گریز است [۳۶]. در شکل ۶ (a2)، نمودار سه‌بعدی اثر متقابل غلظت‌های PLA و CS/ZnO بر زاویه تماس نانوالیاف نشان داده شده است. این نمودار نیز تأییدکننده موارد مطرح‌شده در نمودار دوبعدی است. شکل ۶ (b1) نمودار دوبعدی اثر متقابل غلظت CS/ZnO و ترکیب درصد را بر زاویه تماس نانوالیاف نشان می‌دهد. با افزایش غلظت CS/ZnO از ٪۵ به ٪۱۰ و ترکیب CS/ZnO ۲:۱ کمترین زاویه تماس دیده می‌شود. در واقع، مقدار کیتوسان دو برابر مقدار ZnO بوده و از آنجا که کیتوسان پلیمری آب‌دوست است، پس زاویه تماس کاهش می‌یابد. در شکل ۶ (b2) نیز نمودار سه‌بعدی اثر متقابل غلظت CS/ZnO و ترکیب درصد بر زاویه تماس نانوالیاف و در شکل ۶ (c1)، نمودار دوبعدی اثر متقابل غلظت PLA و ترکیب درصد بر زاویه تماس نانوالیاف نشان داده شده است. با توجه به نمودار، با کاهش مقدار غلظت PLA از ٪۱۱ به ٪۷ در ترکیب CS/ZnO ۲:۱ زاویه تماس کاهش می‌یابد. شکل ۶ (c2) نیز نمودار سه‌بعدی اثر متقابل غلظت PLA و ترکیب درصد را بر زاویه تماس نانوالیاف نشان می‌دهد.

تعیین نمونه بهینه

برای یافتن نمونه بهینه سعی شد، در طراحی، کمترین زاویه تماس و کمترین قطر با بهترین شکل‌شناسی برای الیاف بررسی‌شده به‌دست آیند تا نمونه با خاصیت آب‌دوستی بیشتر و خاصیت نانولیفی برای شبیه‌سازی ماتریس خارج سلولی طبیعی بدن تهیه شود. برای دست‌یابی به این هدف، نمونه با مشخصات ٪۱۰ (۲:۱) CS/ZnO و ٪۸ PLA تولید و نمونه تهیه‌شده از نظر شکل‌شناسی و زاویه تماس ارزیابی شد.

بررسی قطر و شکل‌شناسی نمونه بهینه

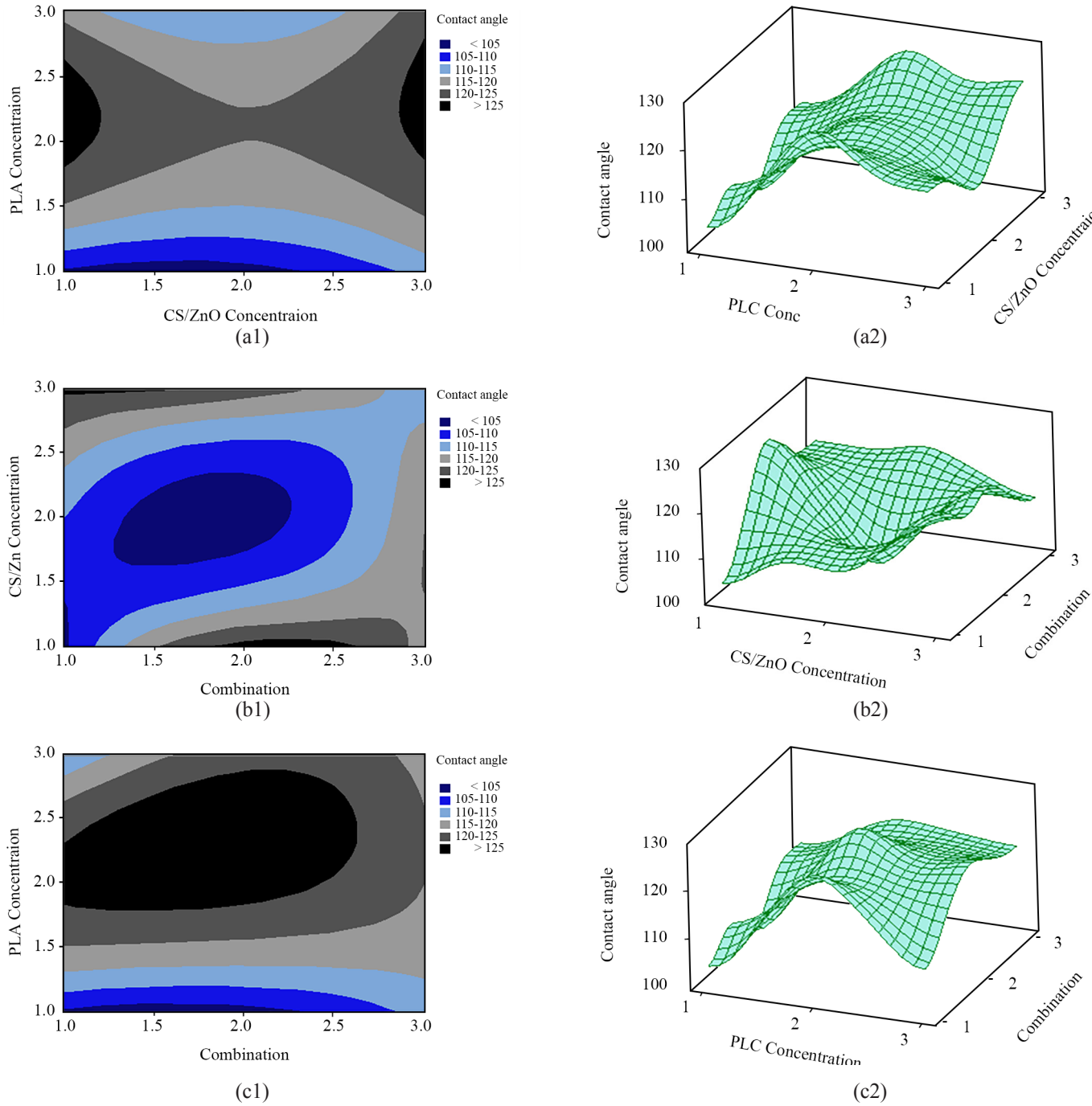
شکل ۷ (a) تصویر شکل‌شناسی، نمودار ستونی و زاویه تماس نمونه بهینه را نشان می‌دهد. قطر نمونه بهینه ۳۰±۳۴۵ nm است و نانوالیاف تقریباً صاف و یکنواخت تولید شدند. از نمودار ستونی نیز مشخص است، قطر در محدوده نانومتر و تک‌قله‌ای است. شکل ۷ (b) نیز تصویر آزمون زاویه تماس نمونه بهینه را نشان می‌دهد که ۱۰۱° است.

بررسی درجه زبری نمونه بهینه

یکی از مشخصه‌های اصلی ساختارهای لیفی، زبری سطح آن‌ها بوده که می‌تواند بر خاصیت ترشدگی آن‌ها اثرگذار باشد [۳۹]. بررسی زبری سطح مربوط به نمونه بهینه، با میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) انجام شد. تصاویر دو و سه‌بعدی حاصل از AFM با نرم‌افزار DME به‌دست آمد که در شکل ۸ دیده می‌شود. مقدار زبری سطح گزارش‌شده برای نمونه بهینه ۱۷۸ nm است. نتایج مطالعه عادلی و همکاران نشان داد، درجه زبری سطح نانوالیاف الکتروریسی‌شده پلی(وینیل الکل)-کیتوسان-نشاسته با نسبت‌های مختلف، در محدوده ۲۶۲ nm تا ۴۳۵ nm بوده که این مقدار برای چسبندگی و رشد سلولی مناسب است. نتایج آن‌ها نشان داد، با افزایش مقدار کیتوسان در ترکیب، درجه زبری کم می‌شود. دلیل آن را می‌توان به قطر کم این نانوالیاف نسبت داد [۴۰،۴۱]. Râpă و همکاران [۴۲] با بررسی عکس‌های AFM فیلم‌های PLA-نانوذرات نقره بیان کردند، درجه زبری سطح برای این فیلم ۴۶/۵ nm بوده و به‌دلیل وجود نانوذرات نقره ساختاری شبیه به جزیره در دریا نشان داده است

بررسی رفتار سلولی نمونه PLA دارای هیبرید CS/ZnO

در چند دهه اخیر استفاده از نانوالیاف بر پایه پلیمرهای سنتزی در مهندسی بافت به‌دلیل شباهت زیاد به ماتریس خارج سلولی به‌عنوان داربست مناسب برای بازسازی پوست بسیار مورد توجه بوده است. در ساخت داربست‌های سلولی، مقدار چسبندگی سلول روی داربست

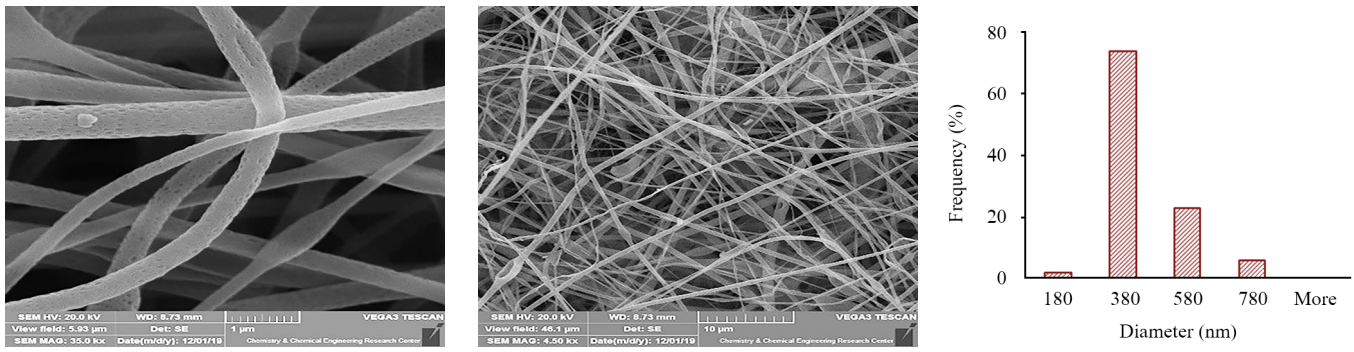


شکل۶- نمودارهای (a1)، (b1)، (c1) دوبعدی و (a2)، (b2)، (c2) سه‌بعدی اثر متقابل عوامل بر زاویه تماس نانوالیاف.

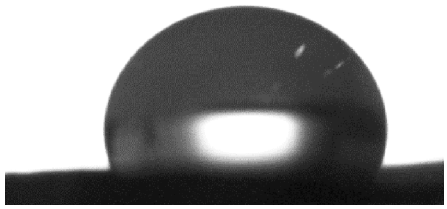
Fig. 6. Diagrams of (a1), (b1), (c1) two-dimensional and (a2), (b2), (c2) three-dimensiona from the interaction effect of factors on the contact angle of nanofibers.

به‌منظور شروع رشد سلول، یکی از مواردی است که باید مورد توجه قرار گیرد. پلیمرهای سنتزی اگرچه خاصیت مکانیکی خوب و پایداری زیاد در محیط آبی دارند، اما به‌دلیل خاصیت آب‌دوستی کم، قابلیت ایجاد پایگاه‌های مناسب برای چسبیدن سلول را ندارند [۴۵-۴۳].

در توافق با مطالعات پیشین [۴۶،۴۷] مقدار زیست‌پذیری سلول‌های فیبروبلاست روی نانوالیاف PLA نسبت به گروه کنترل به کمتر از ۷۰٪ کاهش یافت. بر اساس مطالعات گذشته [۴۸،۴۹]، اضافه‌کردن گروه‌های آب‌دوست نیز همانند پلیمرهای طبیعی زیست‌سازگار



(a)

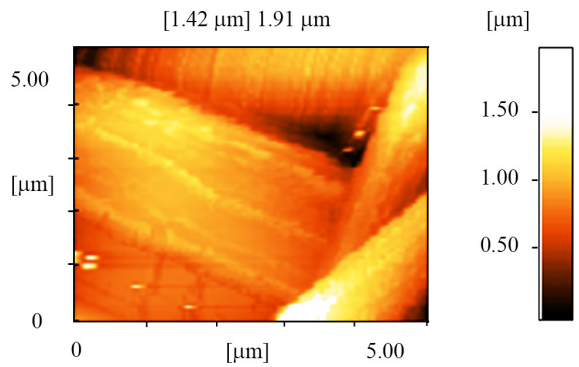


(b)

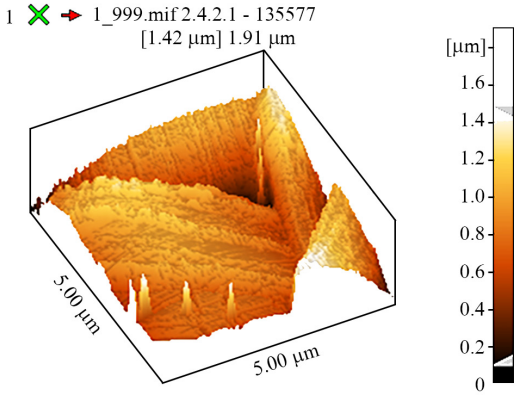
شکل ۷- (a) عکس‌های SEM نمونه بهینه (۲:۱) ٪۱۰ wt-CS/ZnO ٪۸ PLA و نمودار ستونی قطر آن و (b) زاویه تماس نمونه بهینه.

Fig. 9. (a) SEM images of optimized sample PLA 8% wt-CS/ZnO 10% (2:1) and histogram diagram of samples, and (b) contact angle of optimized sample.

مانند کیتوسان موجب افزایش مقدار چسبندگی سلول روی داربست می‌شود. در این پژوهش نیز، با اضافه‌کردن کیتوسان به ترکیبات نانوالیاف بر پایه PLA زاویه تماس کاهش یافته است. این موضوع می‌تواند موجب افزایش آب‌دوستی داربست شود. همان‌طور که انتظار می‌رفت، مقدار زیست‌پذیری سلول‌های فیبروبلاست روی داربست نانوالیاف PLA/CS به‌طور معناداری افزایش یافت، به‌طوری که به حدود ۱/۴ برابر گروه کنترل بود. مسئله دیگری که در ساخت داربست‌های پوستی باید به آن توجه شود، رشد سریع و کنترل‌نشده باکتری‌هاست که می‌تواند به بروز مشکلات جدی منجر شود. بنابراین، داربست‌های پوستی افزون بر اینکه باید جایگاه‌های مناسبی را برای کشت سلول‌های فیبروبلاستی ایجاد کنند، باید دارای مواد ضدباکتریایی نیز باشند. امروزه نشان داده شده است، نانوذرات فلزی از جمله نانوذرات روی اکسید خاصیت ضدباکتریایی زیادی دارند. اما، وجود این نانوذرات در ترکیبات داربست نه فقط موجب خاصیت ضدباکتریایی ترکیب می‌شود، بلکه زیست‌پذیری داربست را به‌دلیل تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن کاهش می‌دهد [۱۸،۵۰]. برای انجام آزمایش سمیت سلولی افزون بر نمونه کنترل و بهینه (۲:۱) ٪۱۰ CS/ZnO و ٪۸ PLA) داربست‌های PLA خالص، ٪۱۰ CS و ٪wt ۸ PLA نیز تولید شدند. در شکل ۹ (a) آزمون MTT برای سمیت سلولی نمونه‌ها و در شکل ۹ (b) نیز شکل‌شناسی سلول روی داربست‌ها نشان داده شده است. همان‌طور که نتایج سمیت سلولی نشان می‌دهد، مقدار زیست‌پذیری سلول‌های فیبروبلاست



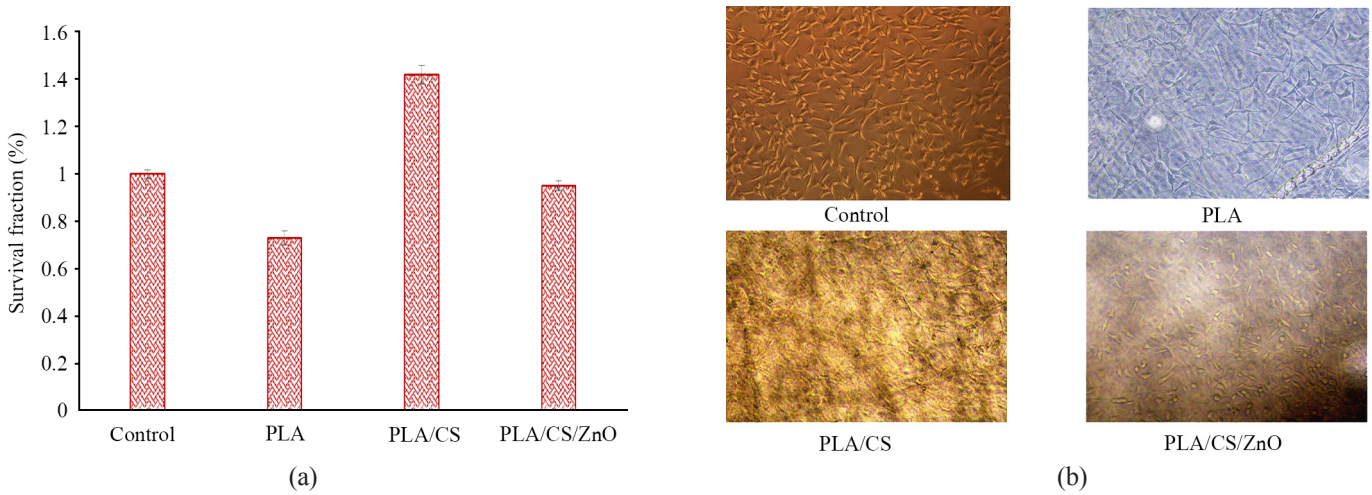
(a)



(b)

شکل ۸- عکس‌های دوبعدی و سه‌بعدی AFM از نمونه بهینه.

Fig. 8. Two- and three-dimensional AFM images of optimized sample.



شکل ۹- (a) بررسی سمیت سلولی نمونه‌ها با آزمون MTT و (b) شکل‌شناسی سلول بر داربست‌های ساخته‌شده.

Fig. 9. (a) Evaluation of cytotoxicity of samples by MTT test and (b) cell morphology on the fabricated scaffolds.

روی نانوالیاف PLA/CS/ZnO نسبت به نانوالیاف PLA/CS کاهش یافته است که می‌تواند به‌دلیل سمیت نانوذرات باشد، اما از سوی دیگر، تفاوت معنی‌داری میان گروه PLA/CS/ZnO و گروه کنترل دیده نشد. این پدیده می‌تواند به ویژگی‌های منحصربه فرد کیتوسان و خواص زیستی عالی آن مربوط باشد که تا حد شایان توجهی سمیت ناشی از نانوذرات روی اکسید را کاهش داده است.

نتیجه‌گیری

نانوالیاف PLA-کیتوسان-روی اکسید دارای غلظت‌های مختلف با روش الکتروریسی تولید و خواص شکل‌شناسی و آب‌دوستی آن‌ها ارزیابی شد. استفاده از نانولیفچه‌های کیتوسان و هیبریدهای کیتوسان-روی اکسید برای تولید داربست نانولیفی با موفقیت انجام شد. نانولیفچه‌های کیتوسان برای تأمین خواص ضدمیکروبی و زیستی مطلوب، پلیمر سنتزی PLA برای تأمین خواص مکانیکی و نانوذرات روی اکسید به‌دلیل داشتن خواص ضدمیکروبی، برای تهیه داربست مناسب به‌کار گرفته شدند که می‌تواند برای کاربردهای مهندسی بافت مناسب باشد. همچنین، به‌دلیل کاهش تعداد آزمایش‌ها، کاهش هزینه مواد مصرفی و زمان، به‌کمک طراحی آزمایش تاگوچی با سه عامل غلظت PLA، غلظت هیبرید CS/ZnO و ترکیب درصد در سه سطح، ۹ آزمایش مختلف انجام شد. نتایج شکل‌شناسی نانوالیاف تولیدی نشان داد، با افزایش غلظت PLA، ساختار دانه‌تسبیحی و بیدمانند نمونه‌ها از بین می‌رود و نانوالیاف صاف و بدون بید به‌دست می‌آید. ترکیب درصد CS/ZnO ۲:۱ به‌دلیل داشتن مقدار نانولیفچه کیتوسان بیشتر نسبت به نانوذرات روی اکسید با غلظت ٪۱۰ نتایج بهتری روی قطر و زاویه تماس نشان داد. همچنین، نتایج اندازه‌گیری قطر نانوالیاف نشان داد، قطر نانوالیاف مزبور در محدوده نانومتر و میکرومتر است. افزون بر این، مقدار کیتوسان به‌کاررفته در محلول پلیمری، خواص آب‌دوستی را بهبود بخشید. نمونه با مشخصات ٪۱۰ (۲:۱) CS/ZnO و ٪۸ PLA، زاویه تماس °۱۰۱، قطر nm ۳۰±۳۴۵ و درجه زبری nm ۱۷۸ به‌عنوان نمونه بهینه انتخاب شد. با بررسی خواص شکل‌شناسی سلول‌های فیبروبلاست روی نمونه، رفتار سلولی مناسبی از آن‌ها روی ساختارهای تهیه‌شده، دیده شد.

علائم اختصاری

PLA: Polylactic acid

CS: Nanofibrilated chitosan

ZnO: Zinc oxide nanoparticles

SEM: Scanning electron microscopy

AFM: Atomic force microscope

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

مراجع

1. Subbiah T., Bhat G.S., Tock R.W., Parameswaran S., and Ramkumar S.S., Electrospinning of Nanofibers, *J. Appl. Polym. Sci.,* **96**, 557-569, 2005.
2. Huang Y., Song J., Yang C., Long, Y., and Wu H., Scalable Manufacturing and Applications of Nanofibers, *Mater. Today*, **28**, 98-113, 2019.
3. Supaphol P., Mit-uppatham C., and Nithitanakul M., Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effects of Solvent System and Emitting Electrode Polarity on Morphology and Average Fiber Diameter, *Macromol. Mater. Eng.,* **290**, 933-942, 2005.
4. Alborzi S., Lim L.T., and Kakuda Y., Electrospinning of Sodium Alginate-Pectin Ultrafine Fibers*, J. Food Sci.,* **75**, C100-C107, 2010.
5. Casanova M.R., Reis R.L., Martins A., and Neves N.M., The Use of Electrospinning Technique on Osteochondral Tissue Engineering, *Adv. Exp. Med. Biol*., 247-263, 2018.
6. Kalantari K., Afifi A.M., Jahangirian H., and Webster T.J., Biomedical Applications of Chitosan Electrospun Nanofibers as a Green Polymer-Review, *Carbohydr. Polym.,* **207**, 588-600, 2019.
7. Lee J., Chen N., Peng S., Li L., Tian L., Thakor N., and Ramakrishna S., Polymer-based Composites by Electrospinning: Preparation and Functionalization with Nanocarbons, *Prog. Polym. Sci.,* **86**, 40-84, 2018.
8. Quintavalla S. and Vicini L., Antimicrobial Food Packaging in Meat Industry, *Meat. Sci.,* **62**, 373-380, 2002.
9. Chumeka W., de la Thèse Amélioration de la Compatibilité de l'acide Polylactique, *Prog. Polym. Sci.,* **35**, 338-356, 2004.
10. Mahmoud Koushesh S. and Amini R., Nano-ZnO/ Carboxymethyl Cellulose-based Active Coating Impact on Ready-to-Use Pomegranate during Cold Storage, *Food Chem.,* **232**, 721-726, 2017.
11. Amjadi S., Almasi H., Ghorbani M., and Ramazani S., Reinforced ZnONPs/Rosemary Essential Oil-incorporated Zein Electrospun Nanofibers by κ-Carrageenan, *Carbohydr. Polym.,* **232**, 115800, 2020**.**
12. Vakili M., Rafatullah M., Salamatinia B., Zuhairi Abdullah A., Ibrahim M., Tan K., Gholami Z., and Amouzgar P., Application of Chitosan and Its Derivatives as Adsorbents for Dye Removal from Water and Wastewater: A Review, *Carbohydr. Polym*., **113**, 115-130, 2014.
13. Fadaie M. and Esmaeil M., Nanofibrillated Chitosan/ Polycaprolactone Bionanocomposite Scaffold with Improved Tensile Strength and Cellular Behavior, *Nanomed. J.,* **5**, 77-89, 2018.
14. Yeniay E., Öcal L., Altun E., Oktar F.N., Talat Inan A., Ekren N., Kilic O., and Gunduz O., Nanofibrous Wound Dressing Material by Electrospinning Method*, Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, **68**, 11-18, 2018.
15. Shan X., Li F., Liu C., and Gao Q., Electrospinning of Chitosan/ Poly(lactic acid) Nanofibers: The Favorable Effect of Nonionic Surfactant, *J. Appl. Polym. Sci.,* **131**, 41098, 2014.
16. Crini G., Recent Developments in Polysaccharide-based Materials Used as Adsorbents in Wastewater Treatment, *Prog. Polym. Sci.,* **30**, 38-70, 2005.
17. Majidi H.J., Babaei A., Arab Bafrani Z., Shahrampour D., Zabihi E., and Jafari S.M., Investigating the Best Strategy to Diminish the Toxicity and Enhance the Antibacterial Activity of Graphene Oxide by Chitosan Addition, *Carbohydr. Polym.,* **225**, 115220, 2019.
18. Zabihi E., Babaei A., Shahrampour D., Arab Bafrani Z., Mirshahidi K.S., and Majidi H.J., Facile and Rapid In-Situ Synthesis of Chitosan-ZnO Nano-hybrids Applicable in Medical Purposes; A Novel Combination of Biomineralization, Ultrasound, and Bio-safe Morphology-Conducting Agent, *Int. J. Biol. Macromol.,* **131**, 107-116, 2019.
19. Fadaie M., Esmaeil M., Geramizadeh B., and Asvar Z., Incorporation of Nanofibrillated Chitosan into Electrospun PCL Nanofibers Makes Scaffolds with Enhanced Mechanical and Biological Properties, *Carbohydr. Polym.,* **199**, 628-640, 2018.
20. Watthanaphanit A., Supaphol P., Tamura H., Tokura S., and Rujiravanit R., Wet-Spun Alginate/Chitosan Whiskers Nanocomposite Fibers: Preparation, Characterization and Release Characteristic of the Whiskers, *Carbohydr. Polym.,* **79**, 738-746, 2010.
21. Nguyen N.T., Nguyen N.T., and Nguyen V.A., In Situ Synthesis and Characterization of ZnO/Chitosan Nanocomposite as an Adsorbent for Removal of Congo Red from Aqueous Solution, *Adv. Polym, Technol.,* **2020**, 1-8, 2020**.**

22. Amjadi S., Emaminia S., Heyat Davudian S., Pourmohammad S., Hamishehkar H., and Roufegarinejad L., Preparation and Characterization of Gelatin-based Nanocomposite Containing Chitosan Nanofiber and ZnO Nanoparticles, *Carbohydr. Polym.,* **216**, 376-384, 2019.
23. Esmizadeh E., Naderi G., Ghoreishy M.H.R., and Bakhshandeh G.R., Optimal Parameter Design by Taguchi Method for Mechanical Properties of NBR/PVC Nanocomposites, *Iran. Polym. J.,* **20**, 587-596, 2011.
24. Khoei A., Masters I., and Gethin D.T., Design Optimisation of Aluminium Recycling Processes Using Taguchi Technique, *J. Mater. Process. Technol.,* **127**, 96-106, 2002.
25. Feng L., Li S., Li H., Zhai J., Song Y., Jiang L., and Zhu D., Super-hydrophobic Surface of Aligned Polyacrylonitrile Nanofibers, *Angew. Chem., Int. Ed.,* **41**,1221-1223, 2002.
26. Baghersad S., Bahrami S.H., Ranjbar Mohammadi M., Mohaddes Mojtahedi M.R., and Brouki Milan P., Development of Biodegradable Electrospun Gelatin/Aloe-Vera/Poly (ε-caprolactone) Hybrid Nanofibrous Scaffold for Application as Skin Substitutes, *Mater. Sci. Eng. C*, **93**, 367-379, 2018.
27. Burger C., Hsiao B.S., and Chu B., Nanofibrous Materials and Their Applications, *Annu. Rev. Mater. Res.,* **36**, 333-368, 2006.
28. Moghe A.K. and Gupta B.S., Co-Axial Electrospinning for Nanofiber Structures: Preparation and Applications, *Polym. Rev.,* **48**, 353-377, 2008.
29. Casasola R., Thomas N.L., Trybala A., and Georgiadou S., Electrospun Polylactic Acid (PLA) Fibres: Effect of Different Solvent Systems on Fibre Morphology and Diameter, *Polymer*, **55**, 4728-4737, 2014.
30. Choi J.S., Lee S.W., Jeong, L., Bae S.H., Min B.C., Youk J.H., and Park W.H., Effect of Organosoluble Salts on the Nanofibrous Structure of Electrospun Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), *Int. J. Biol. Macromol.,* **34**, 249-256, 2004.
31. Gholipour Kanani A., Bahrami S.H., and Nouri M., Chitosan-Poly(vinyl alcohol) Blend Nanofibers: Morphology, Biological and Antimicrobial Properties, *e-Polymer,* **9**, 1-12, 2009.
32. Saquing C.D., Manasco J.L., and Khan S.A., Electrospun Nanoparticle–Nanofiber Composites via a One-Step Synthesis, *Small,* **5**, 944-951, 2009.
33. Son W.K.,Youk J.H., Lee T.S., and Park W.H., The Effects of Solution Properties and Polyelectrolyte on Electrospinning of Ultrafine Poly(ethylene oxide) Fibers, *Polym*er, **45**, 2959-2966, 2004.
34. Hardiansyah A., Tanadi H., Yang M.C., and Liu T.Y., Electrospinning and Antibacterial Activity of Chitosan-Blended Poly(lactic acid) Nanofibers, *J. Polym. Res.,* **22**, 2015.
35. Alhusein N., Blagbrough I.S., and De Bank P.A., Electrospun Matrices for Localised Controlled Drug Delivery: Release of Tetracycline Hydrochloride from Layers of Polycaprolactone and Poly(ethylene-*co*-vinyl acetate), *Drug Deliv. Transl. Res.,* **2**, 477-488, 2012.
36. Ryu Y.S., Kim I.S., and Kim S.H., Effect of Modified ZnO Nanoparticle on the Properties of Polylactide Ultrafine Fibers, *J. Appl. Polym. Sci.,* **136**, 47446, 2019.
37. Anitha S., Brabu B., Thiruvadigal D.J., Gopalakrishnan C., and Natarajan T.S., Optical, Bactericidal and Water Repellent Properties of Electrospun Nanocomposite Membranes of Cellulose Acetate and ZnO, *Carbohydr. Polym.,* **87**, 1065-1072, 2012.
38. Liu Y., Li Y., Deng L., Zou L., Feng F., and Zhang H., Hydrophobic Ethylcellulose/Gelatin Nanofibers Containing Zinc Oxide Nanoparticles for Antimicrobial Packaging, *J. Agric. Food Chemm.,* **66**, 9498-9506, 2018.
39. Szewczyk P.K., Ura D.P., Metwally S., Knapczyk-Korczak J., Gajek M., Marzec A., Bernasik M.M., and Stachewicz U., Roughness and Fiber Fraction Dominated Wetting of Electrospun Fiber-based Porous Meshes*, Polymers,* **34**, 1-17, 2019.
40. Adeli H., Khorasani M.T., and Parvazinia M., Wound Dressing Based on Electrospun PVA/Chitosan/Starch Nanofibrous Mats: Fabrication, Antibacterial and Cytocompatibility Evaluation and In Vitro Healing Assay, *Int. J. Biol. Macromol.,* **122**, 238-254, 2019.
41. Alavarse A.C., de Oliveira Silva F.W., Colque J.T., da Silva V.M., Prieto T., Venancio E.C., and Bonvent J.J., Tetracycline Hydrochloride-Loaded Electrospun Nanofibers Mats Based on PVA and Chitosan for Wound Dressing, *Mater. Sci. Eng. C,* **77**, 271-281, 2017.
42. Râpă M., Stefan L.M., Zaharescu T., Seciu A.M., Ţurcanu A.A., Matei E., Predescu A.M., Antoniac I., and Predescu C., Development of Bionanocomposites Based on PLA, Collagen, and AgNPs and Characterization of Their Stability and In Vitro Biocompatibility, *Polymer,* **10**, 2265, 2020.
43. Vickers N.J., Animal Communication: When I'm Calling You, Will You Answer Too?, *Curr. Biol.,* **27**, R713-R715, 2017.

44. Johnson J., Nowicki M.O., Lee C.H., Chiocca E.A., Viapiano M.S., Lawler S.E., and Lannutti J.J., Quantitative Analysis of Complex Glioma Cell Migration on Electrospun Polycaprolactone Using Time-Lapse Microscopy, *Tissue Eng. Part C: Methods,* **15**, 531-540, 2009.
45. Dhanaraj B., Papanna M.K., Adinarayanan S., Vedachalam C., Sundaram V., Shanmugam S., Sekar G., Menon P.A., Wares F., and Swaminathan S., Prevalence and Risk Factors for Adult Pulmonary Tuberculosis in a Metropolitan City of South India, *PloS One,* **10**, e0124260, 2015.
46. Ma H., Su W., Tai Z., Sun D., Yan X., Liu B., and Xue Q., Preparation and Cytocompatibility of Polylactic Acid/ Hydroxyapatite/Graphene Oxide Nanocomposite Fibrous Membrane, *Sci. Bull*., **57**, 3051-3058, 2012.
47. Zadeh K.M., Luyt A.S., Zarif L., Augustine R., Hasan A., Messori M., Hassan M.K., Yalcin H.C., Electrospun Polylactic Acid/Date Palm Polyphenol Extract Nanofibres for Tissue Engineering Applications, *Emerg. Mater. Res.,* **2**, 141-151, 2019.
48. Luna S.M., Silva S.S., Gomes M.E., Mano J.F., and Reis R.L., Cell Adhesion and Proliferation onto Chitosan-based Membranes Treated by Plasma Surface Modification, *J. Biomater. Appl.,* **26**, 101-116, 2011.
49. Kafi M.A., Aktar K., Todo M., and Dahiya R., Engineered Chitosan for Improved 3D Tissue Growth through Paxillin-FAK-ERK Activation, *Regen. Biomater.,* **7**, 141-151, 2020.
50. Kazemi-Pasarvi S., Golshan Ebrahimi N., Shahrampour D., and Arab Bafrani Z., Reducing Cytotoxicity of Poly(lactic acid)-based/Zinc Oxide Nanocomposites while Boosting Their Antibacterial Activities by Thymol for Biomedical Applications, *Int. J. Biol. Macromol.,* **164**, 4556-4565, 2020.