

کلوئید غیر سمی پلی‌کاپرولاکتون برای نانوکپسوله کردن جنیستین از طریق روش کوآسرواسیون و الکترواسپینینگ در داربست آبدوست

سکینه اسماعیل نیا^۱، راهبه امیری دهخوارقانی^۲، سهیلا زمانلوی بنیسی^۳

^۱ دانشجوی دکترای شیمی کاربردی، دانشکده شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

^۲ دانشیار، دکترای شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

^۳ دانشیار پایه ۶، دکترای مهندسی بافت، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

نام و نشانی ایمیل نویسنده مسئول:

راهبه امیری دهخوارقانی

rahebeha@gmail.com

چکیده

در این تحقیق، بستر زیست‌سازگار حاوی ماده موثره گیاهی به منظور بهبود تکثیر و رفتار سلولی در شرایط آزمایشگاهی برای کاربردهای مهندسی بافت در پزشکی طراحی شده‌اند. در این راستا، جنیستین از کنجاله سویا استخراج و با استفاده از پلی‌کاپرولاکتون (PCL) از طریق روش کوآسرواسیون (coacervation) نانوکپسوله شد. در نهایت، نانوالیافی زیست‌سازگار ژلاتین (GE) و پلی‌وینیل الکل (PVA) با ترکیب نانوکپسول‌های جنیستین از طریق روش الکترورسی سنتز گردیدند. آزمایشات با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، طیف‌سنج مرئی فرابنفش (UV-Vis)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، طیف‌سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) و آزمون مکانیکی انجام شد. تأثیرات بیولوژیکی و زنده‌مانی سلول بر روی داربست جنیستین محصور شده با روش MTT بررسی شد. عدم سمیت نمونه سنتز شده با تکثیر و چسبندگی قابل توجه روی رده سلولی L929 به دست آمد. نتیجه‌گیری نشان داد که سیستم زیست‌سازگار توصیف شده می‌تواند به عنوان یک ابزار هوشمند رهاسازی دارو در شرایط آزمایشگاهی برای مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: پلی‌کاپرولاکتون، جنیستین، نانوکپسول، الکترورسی، کوآسرواسیون، رده سلولی L929

مقدمه

استفاده از فناوری نانو برای دارورسانی یکی از روش‌هایی است که امروزه توجهات بسیاری را به خود جلب کرده است. نانوالیاف الکتروریسی می‌تواند علاوه بر کنترل مقدار داروی آزاد شده، از سمیت و آسیب به سلول‌های سالم جلوگیری کند. مساحت سطح بالا، رهش طولانی مدت دارو، راندمان کپسولاسیون بالا، زیست‌سازگاری و مقرون به صرفه بودن از ویژگی‌های این فناوری می‌باشند. از طرفی دیگر داروهای طبیعی می‌تواند به دلیل ایمن بودن و هزینه‌های کمتر سنتز جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی باشند [۱، ۲]. جنیستین از طریق متابولیت‌های گیاهان از جمله سویا بدست می‌آید [۳]. جنیستین یک ایزوفلاون است که عملکردهای مشابه استروژن را در سلول‌ها اعمال می‌کند. این ترکیب با گیرنده‌های استروژن باند شده و اثرات دوگانه ای را می‌تواند اعمال کند. جنیستین به صورت دارویی به عنوان یک مکمل رژیمی و جایگزینی برای هورمون‌های درمانی استفاده می‌شود [۴]. چندین اثر بیولوژیکی جنیستین مانند فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی [۵]، ضد التهابی [۶]، ضد باکتریایی و ضد ویروسی و فعالیت‌های دارویی بر دیابت گزارش شده است [۳]. اثرات جنیستین بر روی فیبروبلاست‌های بیماران مبتلا به موکولیدوزا [۷]، مهار تیروزین کیناز [۸]، برای محافظت پوست در معرض نور UV [۹]، کاهش تشکیل لخته [۱۰] و تقویت کننده استئوبلاستوسیت‌ها و بلوغ [۱۱] بررسی شده است.

پلی‌کاپرولاکتون یک پلیمر زیست تخریب پذیر است که به دلیل زیست‌سازگاری و زیست تخریب پذیری در مهندسی بافت به عنوان ماده داربست استفاده شده است [۱۲]. همچنین به عنوان یک ماتریس پلیمری برای سیستم‌های دارورسانی استفاده شده است. این مواد توانایی برای تجزیه شدن توسط میکروارگانیزم‌هایی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها به مواد طبیعی مانند آب، دی‌اکسید کربن و زیست توده را دارند. همچنین سازگار با محیط زیست هستند زیرا می‌توانند توسط فرآیندهای طبیعی تجزیه شوند و در محیط انباشته نشوند [۱۳، ۱۴]. جهت جلوگیری از عفونت غشا، الکتروریسی پلی‌کاپرولاکتون/ژلاتین/مترنیدازول [۱۵] و پلی‌کاپرولاکتون/پلی‌وینیل‌الکل/داکسی‌سایکلین [۱۶] توسعه داده شده است و سرعت تجزیه زیستی عالی و خواص مکانیکی قابل قبول را ایجاد کرده است [۱۵]. پلی‌وینیل‌الکل (PVA) و ژلاتین دو ماده ای هستند که در کاربردهای مهندسی بافت مورد استفاده قرار گرفته اند. ترکیب این مواد اثرات هم افزایی خود را در کاربردهای ترمیم زخم به اثبات رسانده است [۱۷]. داربست‌های نانوالیاف الکتروریسی شده بر پایه پلی‌وینیل‌الکل در زیست پزشکی استخوان، غضروف، پوست، عروق، عصبی و قریه استفاده شده است [۱۸].

ترکیب الکتروریسی و پلیمرهای کپسوله شده، امکانات جدیدی را در زمینه بازسازی بافت به ارمان آورده است. داربست‌های نانوالیافی PCL/Ge و ذرات پلی‌آنیلین (PAni) پس از انحلال در مخلوط اسید فرمیک/استیک از طریق الکتروریسی گزارش شده است [۱۹].

ارتباط این پلیمرها برای تنظیم ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی داربست‌ها منجر به ساختار نانوالیاف یکپارچه، در دسترس بودن، هزینه کم و زیست‌سازگاری بالا در شرایط آزمایشگاهی درون تنی شده است. یکی از عوامل مهم استفاده از مواد پلیمری دیگر در ترکیب با پلی‌کاپرولاکتون می‌تواند نبود گروه‌های عاملی آبدوست در ساختار پلی‌کاپرولاکتون باشد که باعث عدم ترکیب آن با مواد آبدوست و زیست‌سازگار شده است [۱۹]. در نتیجه افزایش پلیمرهای آبدوست آبدوست سیگنال‌های بیوشیمیایی را برای ترویج چسبندگی، مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولی ارائه می‌دهند. در این راستا داربست‌های نانوالیافی دو جزئی PCL/Ge به عنوان یک بستر همه کاره برای بازیابی پوست پیشنهاد شده است [۲۰]. یکی از دلایل ساخت داربست‌های چند لایه با خاصیت ضد باکتریایی طولانی مدت، وجود زخم‌های عفونتی است که بهبود آنها به زمان طولانی نیازمند است. داربست‌های نانوالیافی دولایه آموکسی‌سیلین/نانوذرات اکسید روی بر پایه پلی‌کاپرولاکتون و ژلاتین با استفاده از آزمایش‌های *in vivo* روی مدل‌های موش علاوه بر تسریع انقباض زخم، رسوب کلاژن و رگ‌زایی را افزایش می‌دهند و از تشکیل اسکار جلوگیری می‌کنند [۲۱، ۲۲]. دستیابی به تحویل داروی کنترل شده برای بازسازی بافت از اهمیت زیادی برخوردار است و یک چالش بزرگ است. سیستمی متشکل از نانوالیاف الکتروریسی شده می‌تواند اجزای مواد در لایه‌های مختلف را به خوبی تنظیم کند. نانوالیاف اجازه کنترل و آزادسازی دارو در لایه‌های مختلف و همچنین دستکاری محل دارو را می‌دهد. در تحقیقی گزارش شده است که پلی‌کاپرولاکتون را برای ساختن اولین لایه خارجی و ژلاتین برای ساختن دومین لایه خارجی نانوالیاف اعمال شده است [۲۳]. در یک تحقیق

موکسی فلوکساسین، نوعی داروی ضد باکتری در لایه‌های مختلف نانوالیاف چهار محوری جایگزیده شده و کنترل مؤثری را بر تحویل دارو انجام می‌دهد [۲۳]. تحقیقات زیادی با استفاده از نانوالیاف برای کاربردهای متفاوت از جمله، نانوالیاف متخلخل پلی (ال-لاکتیک اسید)، برای کنترل خواص کامپوزیت و پاسخ‌های بیولوژیکی [۹]، نانوالیاف موکچسب حاوی برینزولامید برای جایگزین درمان گلوکوم [۲۴]، نانوالیاف پلی لاکتید قابل جذب برای درمان پریدنتیت [۱۰]، نانوالیاف پلی وینیل الکل/صمغ عربی الکترورسی شده برای رشد سلول‌های آزمایشگاهی و تحویل نانودارو سرطان [۱۱]، نانوالیاف فتوترمال برای تسریع بهبود زخم دیابتی [۲۵]، نانوالیاف آلژینات-سلولز با چاپ سه بعدی برای تجویز موضعی کورکومین [۱۴] و نانوفیبر برپایه ی فوم-فیلم (nanofiber-on-foam-on-film) مبتنی بر کیتوزان برای انتقال پپتید غیر تهاجمی [۱۳] بکار برده شده است. روش‌های جدیدی با استفاده از نانو الیاف فوق نازک، برای توسعه سریع سیستم تحویل نانودارو به صورت زیست سازگار، کارایی مناسب در به دام انداختن دارو، رهاسازی کنترل شده، تحویل به صورت مداوم و از نظر بالینی آسان، ارائه شده است [۸].

سنجش MTT، بر اساس تبدیل MTT به کریستال‌های فورمازان توسط سلول‌های زنده است که فعالیت میتوکندری را تعیین می‌کند [۲۶]. سلول‌های L929 یک رده سلولی فیروبلاست موش هستند که از یک موش نر C_3H/An مشتق شده است. آنها همچنین به عنوان سلول‌های Earles، سلول‌های L یا سلول‌های کلون ۹۲۹ NCTC شناخته می‌شوند. آنها یک فاکتور رشد ماکروفاژ به نام M-CSF ترشح می‌کنند [۲۷]. در این کار، ما توجه خود را به یک پوشش غیر سمی زیستی که ساختار ایمنی دارد، جلب کرده‌ایم. ما همچنین پلی‌کاپرولاکتون را به عنوان حامل جنیستین در نظر گرفته‌ایم. ترکیب‌های متعادل از پلی‌وینیل الکل و ژلاتین با درصد وزنی برابر ۵۰/۵۰، انتخاب شدند. در نتیجه، هدف این مطالعه، به دست آوردن یک داربست آبدوست از ژلاتین/پلی‌وینیل الکل که با نانوکپسوله‌های PCL حاوی جنیستین تقویت شده و ارزیابی رفتار آنها برای تحویل پایدار دارو است. ارزیابی نانوالیاف از نظر ساختار شیمیایی، مورفولوژی، خواص مکانیکی انجام شد. همچنین، رفتار آزمایشگاهی داربست‌ها و مطالعه زیست سازگاری، سمیت سلولی و تکثیر سلولی در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت.

بخش آزمایشگاهی

موادها

مواد مورد استفاده در این پژوهش هیدروکلریدریک اسید (HCl)، اتانول (C_2H_6O)، اتیل استات ($C_4H_8O_2$)، نرمال هگزان ($CH_3(CH_2)_4CH_3$)، پلی‌کاپرولاکتون ($(C_6H_{10}O_2)_n$)، استون ($(CH_3)_2CO$)، اسپان ۸۰ ($C_{24}H_{44}O_6$)، تئوین ($C_{64}H_{124}O_{26}$)، ژلاتین ($C_6H_{12}O_6$)، اسید لاکتیک ($C_3H_6O_3$)، اسید استیک (CH_3COOH) و پلی وینیل الکل ($(CH_2CH(OH))_n$) می‌باشد. همه مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در مراحل پژوهش و سنتز از شرکت مرک آلمان خریداری شد. پودر سویا و روغن آفتاب گردان از مزارع ایران خریداری گردید.

بدست آوردن عصاره گیاهی جنیستین از پودر دانه سویا

برای بدست آوردن عصاره گیاهی جنیستین از روش ترکیبی اولتراسونیک و روتاری با مخلوط اتانول/آب [۲۸] استفاده گردید. با توجه به نتایج بدست آمده از روش‌های استخراج متفاوت، روش ترکیبی اولتراسونیک و روتاری با مخلوط اتانول/آب به عنوان بهترین روش بهینه استخراج عصاره گیاهی جنیستین استفاده گردید. در این روش، یک گرم پودر سویا را با اتانول/آب (۷۰ درصد و ۳۰ درصد) داخل ارلن مخلوط کرده و درب آن را مهر و موم، در حمام اولتراسونیک قرار داده شد. سپس آن را از صافی عبور داده و برای تبخیر حلال آن در روتاری در دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم.

نانوکپسوله سازی جنیستین

نانوکپسول‌ها با استفاده از روش کوآسرواسیون [۲۶] و با استفاده از پلی‌کاپرولاکتون تهیه شدند. مقدار مناسبی از PCL/استون (۰/۲۵) گرم: ۶۷ میلی‌لیتر) مخلوط و با فویل پوشانده شد. سپس در حمام اولتراسونیک با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در مرحله دوم، ۰/۸ میلی‌لیتر روغن آفتابگردان (SFO) با ۰/۱۹۶ میلی‌لیتر اسپان ۸۰ (حلال در آب) مخلوط و با یک سرنگ روی

یک همزن مغناطیسی به مرحله اول اضافه شد. سپس جنیستین (۰/۰۰۳۲۳ گرم) تحت اتمسفر نیتروژن به مرحله قبلی اضافه شد و با فویل مهر و موم شد. این مخلوط را برای ۲ ساعت تحت همزن مغناطیسی قرار دادیم تا مخلوط همگن شود. یک محلول اسید لاکتیک (محلول کوآسرواسیون) به صورت قطره-قطره در حمام اولتراسونیک اضافه شد تا pH زیر نقطه ایزوالکتریک (۴/۰) برسد. سپس کلوئید به دست آمده را به سرعت به ۱۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب خنک کردیم تا با همزدن با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه نانوکپسول‌ها بهتر شکل گیرند و کلوئید پایدار شود. نانوکپسول‌ها را فیلتر کردیم و با یک خشک‌کن انجمادی (۷۲ ساعت در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد) خشک کردیم.

الکتروریسی جنیستین کپسوله

مقدار ۰/۰۹ گرم پلی وینیل الکل به ۱ میلی لیتر آب تقطیر مضاعف با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد افزوده شد و در حمام آب با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۴۰۰ به مدت ۱ ساعت حل شد. سپس ۰/۰۹ گرم ژلاتین را با ۱ میلی لیتر اسید استیک در حمام آب با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۴۰۰ به مدت ۴۰ دقیقه مخلوط شدند. هر دو محلول تا دمای محیط سرد شدند و مخلوط شدند. سپس مقادیر ۰/۰۲، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۰۱ گرم از داروی کپسوله شده که از مراحل قبل به دست آمده بود را به آن اضافه کرده و ماده حاصله را درون یک سرنگ ریخته و در دستگاه الکتروریسی قرار داده شد. برای جلوگیری از عبور نور، جمع کننده با فویل پوشانده شد. مقدار بهینه برای الکتروریسی دبی (۰/۶ میلی متر در ساعت)، ولتاژ (۲۸ ولت)، فاصله نازل تا جمع کننده (۱۰ سانتی متر) و مقدار ۰/۰۲ گرم محصول نهایی به دست آمد [۲۹، ۲۸].

آماده سازی نمونه‌ها برای طیف UV-Vis

ابتدا، میکروسول‌ها به طور کامل شسته شده و به آن‌ها استونیتریل به عنوان شاهد اضافه شد. سپس طیف مربوطه در طول موج ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد تا درصد خطا کاهش یابد. نمونه بدون دارو به عنوان نمونه در دستگاه قرار گرفت و طول موج آن اندازه‌گیری شد. برای این منظور، مقدار ۰/۱ گرم از ماده حاصله با ۵ میلی لیتر استونیتریل مخلوط و به عنوان نمونه درون میکروسول قرار گرفت. سپس مجدداً استونیتریل به عنوان شاهد داخل میکروسول ریخته و دستگاه را صفر کرده، سپس در کنار نمونه دارای دارو، طیف گرفته شد. همچنین، مقدار ۰/۰۱ گرم داروی استخراج شده از کنجاله سویا را در ۱۵ میلی لیتر حلال اتانول حل کرده و طیف UV گرفته شد. طیف UV جنیستین حاصل از کنجاله سویا دارای طول موج جذبی ۲۶۳ نانومتر بود. همچنین ماده کپسوله‌شده با دارو با مقدار ۰/۰۵ گرم در ۴۵ میلی لیتر حلال استونیتریل حل شده و طیف UV گرفته شد.

رهایش داروی نانوکپسوله الکتروریسی در محیط خنثی، اسیدی و بازی

مرحله اول محیط اسیدی: ۴۰ میلی لیتر آب مقطر با ۰/۴۹۵ گرم سیترات دوآبه با ۰/۶۴ گرم سیتریک اسید تا pH به حدود عدد ۲ برسد و با ۵ میلی گرم از نمونه الکتروریسی شده حاوی ۲۰٪ دارو در مقدار ۱۰ میلی لیتر از حلال (۸۰٪ متانول و ۲۰٪ آب) مخلوط شد سپس داخل اپندروف ریخته و وارد انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کرده تا شروع به چرخش نماید و در طول موج ۲۶۳ نانومتر، از نمونه در زمان‌های مختلف تا ۴۸ ساعت HPLC گرفته شد.

مرحله دوم محیط خنثی: ۵ میلی گرم از نمونه الکتروریسی شده حاوی ۲۰٪ دارو در مقدار ۵۵ میلی لیتر از حلال (۸۰٪ متانول و ۲۰٪ آب) حل شد سپس داخل اپندروف ریخته و وارد انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کرده تا شروع به چرخش نماید و در طول موج ۲۶۳ نانومتر، از نمونه در زمان‌های مختلف HPLC گرفته شد.

مرحله سوم محیط بازی: ۴۰ میلی لیتر آب مقطر با ۰/۳۸۵ گرم سدیم بی کربنات با ۰/۰۴۵ کربنات سدیم تا pH به حدود عدد ۸ تا ۹ برسد و با ۵ میلی گرم از نمونه الکتروریسی شده حاوی ۲۰٪ دارو در مقدار ۱۰ میلی لیتر از حلال (۸۰٪ متانول و ۲۰٪ آب) مخلوط شد سپس داخل اپندروف ریخته و وارد انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کرده تا شروع به چرخش نماید و در طول موج ۲۶۳ نانومتر، از نمونه در زمان‌های مختلف تا ۴۸ ساعت HPLC گرفته شد [۳۱، ۳۰].

آماده سازی نمونه برای تست HPLC

ابتدا یک گرم از نمونه استاندارد را به ۱ میلی لیتر متانول با غلظت ۶۵٪ اضافه کرده، با افزودن آب به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و آن را حل کرده، سپس به دستگاه تزریق کرده و همین مراحل را برای نمونه حقیقی نیز انجام داده شد. در صورتی که زمان تزریق نهایتاً یک روز باشد، نمونه‌ها را درون یخچال نگهداری می‌کنیم و آنها را از نور مستقیم دور نگهداریم؛ اما اگر زمان بیشتری مورد نیاز باشد، نمونه‌ها را در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می‌کنیم.

آماده سازی تست مکانیکی کشش

در این روش، ابتدا نمونه‌ها با ولتاژ ۲۸ و دبی ۰/۶ و فاصله ۱۰ سانتی متر به مدت ۴ ساعت الکترورسی شده، سپس ضخامت و عرض بافت الکترورسی شده اندازه‌گیری شد و به ابعاد ۱ سانتی متر در ۵ سانتی متر بریده شده و جهت انجام تست مکانیکی درون قاب از جنس ورق آلومینیوم قرار گرفت. برای انجام تست مکانیکی، لازم است الکترورسی با زمان ۴ ساعت انجام شود و ضخامت ۰/۸ میلی متر بدست آید.

ایزوترم‌های کالیبراسیون رهائش داروی کپسوله شده توسط HPLC

در اینجا به بررسی ایزوترم‌های رهائش جنیستین کپسوله شده می‌پردازیم. در ابتدا، محلول استوک با ترکیب ۸۰٪ متانول و ۲۰٪ آب در یک بالن ژوژه حاصل شد. سپس مقدار ۰/۱ گرم از نمونه کپسوله شده حاوی جنیستین را برداشته و با مخلوط‌های مختلف به حجم درصد ۸۰ متانول و ۲۰ آب تا حجم موردنیاز رسانده شد؛ بنابراین، دو نمونه شاهد و یک نمونه اصلی آماده شدند. سپس به مقدار ۱ میلی لیتر از نمونه اصلی و مقدار ۹ میلی لیتر از محلول شاهد را برداشته و به دستگاه HPLC تزریق می‌شوند. محلول الوشن با ترکیب ۸۵٪ استونیتریل و ۱۵٪ آب ساخته شده و در طول موج ۲۶۶ نانومتر و در زمان ۱۰ دقیقه، سطح زیر پیک‌ها بررسی می‌شود. در نتیجه، نمونه کپسوله شده را روی نمودار کالیبراسیون برده و غلظت داروی بارگذاری شده به دست می‌آید.

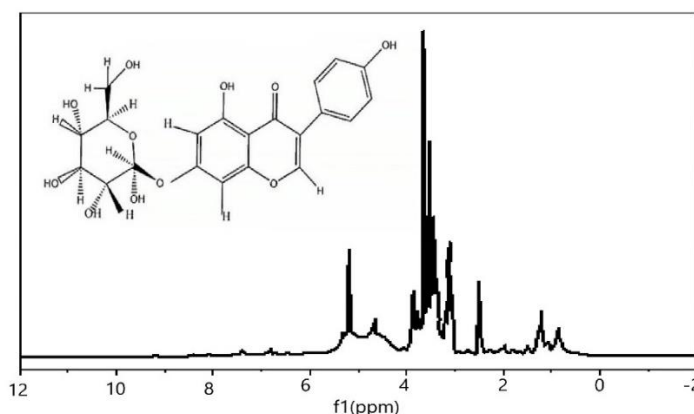
آزمون MTT

بلورهای نامحلول فورمازان در حلال مناسب توسط دی متیل سولفوکساید (DMSO) به صورت محلول در می‌آیند و به روش‌های اسپکترومتری مقدار سنجی می‌شود. مقدار بلور فورمازان ایجاد شده می‌تواند نشان دهنده درصد سلول‌های زنده باشد. هرچه سلول‌ها فعال‌تر و تعدادشان بیشتر باشد میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. جذب نوری رنگ ارغوانی ظاهر شده در طول موج ۵۴۰ با استفاده از دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری می‌شود [۳۳، ۳۲]. داربست بدست آمده روی پلیت ۹۶ خانه قرار داده شد و دوطرف داربست به مدت ۲۰ دقیقه توسط اشعه UV استریل شدند سپس داربست دوبار با PBS هر بار به مدت ۵ دقیقه شست و شو شدند. بدین منظور از سلول L929 فیبروبلاست موشی، به تعداد 5×10^3 در هر چاهک، پلیت ۹۶ خانه محتوی داربست‌های استریل شده و خانه‌های بدون داربست (به عنوان گروه کنترل) کشت داده شدند. محیط کشت حاوی DMEM حاوی ۱۰٪ PBS روی داربست ریخته و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و یک اتمسفر مرطوب با ۵٪ CO₂ انکوبه شد. پس از گذشت زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت محیط کشت سلول‌ها دور ریخته شد. رنگ MTT (با غلظت ۰/۰۵ g/L) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر روی سلول‌ها ریخته شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس مایع رویی روی سلول‌ها برداشته شده و کریستال‌های فورمازان در ۱۰۰ μl/well از DMSO حل شدند. در پایان غلظت فورمازان با دستگاه خوانش میکرو پلیت ریدر ELX800 در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. مقدار $P < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. کنترل اتصال و رشد سلولی با میکروسکوپ نوری معکوس و SEM برای تعیین سازگاری سلولی و مشاهده مورفولوژی استفاده شد [۳۴].

بحث و نتایج

تحلیل و تفسیر طیف سنجی $^1\text{H-NMR}$ نانوکپسوله‌های PCL حاوی جنیستین

۵ میلی‌گرم از نمونه با مقدار ۰/۵ سی سی از حلال DMSO کامل حل شد، سپس نمونه در درون دستگاه قرار داده شد و مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که از شکل (۱) مشخص شده است جنیستین یک گلیکوزید می‌باشد که بخش گلیکوزیل آن دارای پروتون‌های آلیفاتیک بوده و از ناحیه ۳ تا ۴/۵ ppm قرار دارند و بخش آگلیکون دارای پروتون‌های آروماتیک است که در محدوده ۶/۵ تا ۸/۵ ppm قرار گرفته است ولی معمولاً در این ترکیبات پروتون‌های آروماتیک با شدت ضعیفتری خود را نشان می‌دهند که به دلیل عدم حلالیت خوب آن است. همچنین پروتون وینیلی موجود در موقعیت β حلقه کربونیل دار با انتگرال یک در $\delta = 5/18\text{ppm}$ قرار گرفته است که تایید وجود بخش فلاونی ترکیب می‌باشد. مابقی سیگنال‌ها در طیف $^1\text{H-NMR}$ نمونه کپسوله شده مربوط به پروتون‌های آلیفاتیک پلی‌کاپرولاکتون می‌باشد [۳۵].

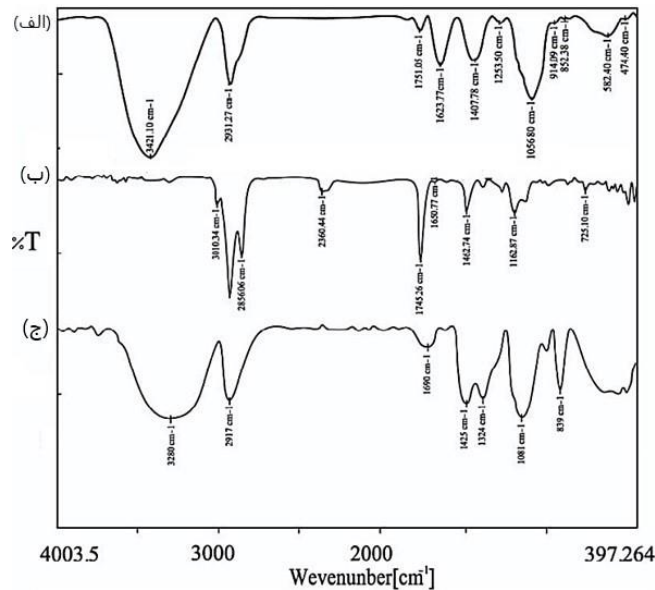


شکل ۱- طیف $^1\text{H-NMR}$ داروی نانوکپسوله شده

تحلیل و تفسیر آنالیز FT-IR

حدود ۵ میلی‌گرم از نمونه اولیه را در مقدار ۵۰ میلی‌گرم پتاسیم برمید مخلوط و به صورت پودر در می‌آوریم و در دستگاه مخصوص قرار داده و فشار می‌دهیم تا قرص شفاف به دست بیاید. سپس قرص را در قسمت محفظه نمونه دستگاه FTIR قرار داده و تنظیمات دستگاه را انجام می‌دهیم تا نتیجه حاصل شود. با مقایسه طیف FTIR ترکیب موثره جنیستین شکل (۲ الف) و نمونه کپسوله شده شکل (۲ ب) درمی‌یابیم که ارتعاش کششی گروه عاملی OH - حذف شده است که می‌تواند بر اثر پوشش دهی باشد در حالیکه شدت پیک ارتعاشی گروه C=O - افزایش یافته که مربوط به وجود این گروه عاملی در پوشش پلی‌کاپرولاکتون می‌باشد اما مابقی ارتعاشات با کاهش شدت روبرو هستند که مربوط به پوشش دهی آنها است. همچنین در شکل (۳ ج) الیاف الکترورسی ژلاتین و PVA در ناحیه ۳۲۸۰ یک نوار وسیع و قوی را نشان می‌دهد که حاصل برهمکنش‌های بین مولکولی قوی گروه هیدروکسیل PVA با گروه آمید ژلاتین می‌باشد در حالیکه باند کوچک در ناحیه ۲۹۱۷ به نوارهای مشخصه ارتعاشی کششی CH آلیفاتیک اختصاص دارد. کاهش شدت نوار ارتعاشی کششی C=O و جابه‌جایی آن به عدد موجی پایین‌تر در ناحیه ۱۶۹۰ نشان دهنده پوشش دهی پلی‌کاپرولاکتون با لایه ژلاتینی و PVA می‌باشد.

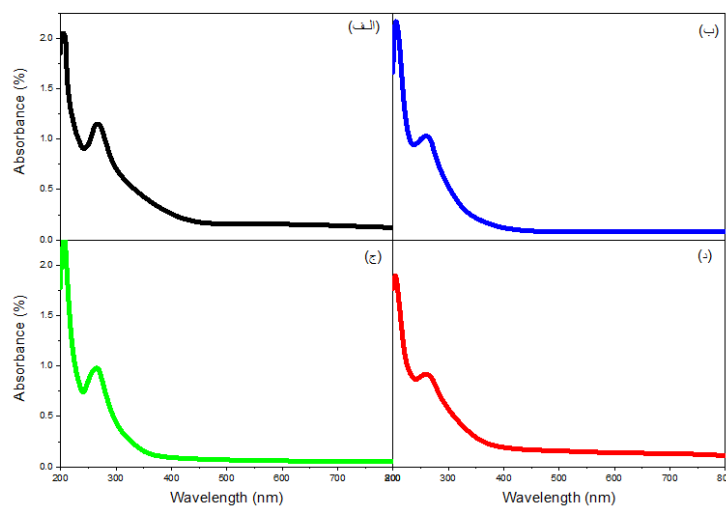
نوار ارتعاشی در عدد موجی 1425 cm^{-1} مربوط به افزایش تعداد گروه‌های CH_2 -در پوشش ثانویه ژلاتین و پلی‌وینیل‌الکل است. همچنین ارتعاشات کششی 1081 cm^{-1} و 1324 cm^{-1} مربوط به گروه‌های عاملی C-O و C-N می‌باشند [۳۶].



شکل ۲- طیف‌های FTIR مربوط به (الف) جنیستین؛ (ب) نمونه کپسوله شده؛ (ج) نمونه الکترورسی شده

آنالیز UV-Vis

در شکل ۳، طیف‌های UV-Vis مربوط به نمونه استاندارد جنیستین (الف)، جنیستین استخراج شده (ب)، جنیستین نانوکپسوله شده (ج) و محصول نهایی (د) نمایش داده شده است. بیشتر کاربرد الکتروسکوپی UV-Vis بر اساس انتقال الکترونی $n \rightarrow \pi^*$ و $\pi \rightarrow \pi^*$ است. انرژی مورد نیاز برای این نوع از انتقال الکترونی در محدوده ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر قرار دارند. هر دو این انتقال به دلیل وجود الکترون‌های غیر پیوندی و پیوندهای غیر اشباع دوگانه، سه گانه یا آروماتیکی در ساختار مولکول روی می دهند. طول موج جذبی عصاره جنیستین ۲۶۶ نانومتر دارای انتقال $\pi \rightarrow \pi^*$ که در تمامی نمونه‌ها حضور دارد [۳۶ و ۳۷] و با توجه به پوشش دهی مضاعف این ترکیب موثره، شدت جذب آن بتدریج کاهش یافته است.



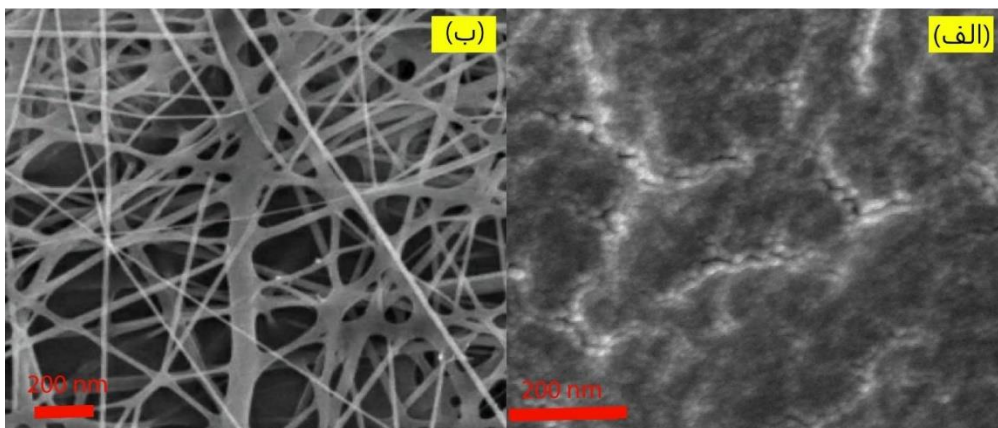
شکل ۳- طیف UV-Vis، (الف) جنیستین استاندارد، (ب) جنیستین استخراج شده، (ج) جنیستین نانو کپسوله شده، (د) نانوالیاف الکترورسی شده حاوی جنیستین نانوکپسوله

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

میکروسکوپ الکترونی روبشی یا SEM نوعی میکروسکوپ الکترونی است که در این نوع میکروسکوپ الکترون به سطح نمونه تابیده شده منعکس می‌گردد و توسط دتکتورها جمع‌آوری می‌شود تا تصویر مرئی ایجاد شود؛ به عبارت دیگر این نوع میکروسکوپ

فقط از ساختار سطحی نمونه تصویر می‌دهد که قابلیت عکس‌برداری از سطوح با بزرگنمایی ۱۰ تا ۵۰۰۰۰۰ برابر با قدرت تفکیکی کمتر از ۱ تا ۲۰ نانومتر (بسته به نوع نمونه) را دارد.

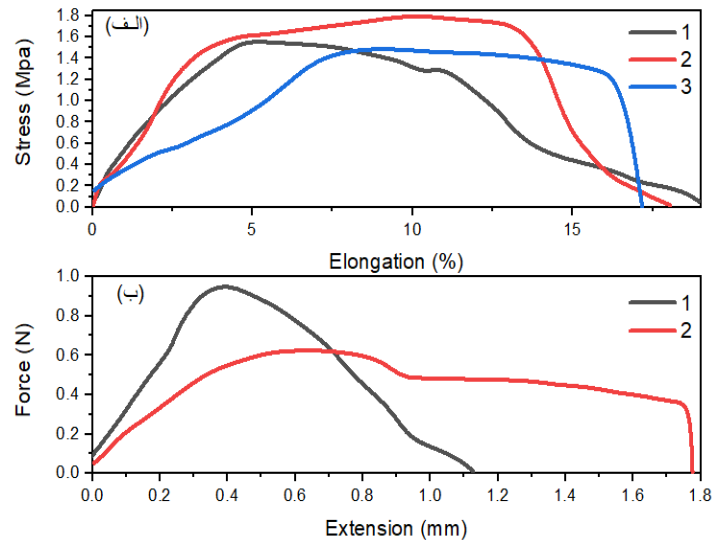
مورفولوژی نانوکپسوله‌های حاوی جنیستین در شکل (۴الف) و الیاف الکترولیسی حاوی ۲۰٪ داروی جنیستین در شکل (۴ب) نشان داده شده است. بررسی قطر و مورفولوژی نمونه‌های بهینه جنیستین نانوکپسوله شده، اندازه ذرات را در محدوده ۲۰ تا ۳۰ نانومتر نشان می‌دهد و الیاف الکترولیسی حاوی ۲۰٪ داروی کپسوله شده که دارای الیاف بدون عیوب ساختاری بودند، بیانگر میانگین قطر ۴۵ نانومتر هستند [۳۷-۴۰]. با توجه به تصاویر SEM، در می‌یابیم که روش کوآسرواسیون روش مناسبی برای نانوکپسوله کردن ماده موثر بوده زیرا اندازه ذرات در زیر ۳۰ نانومتر به صورت کروی ایجاد شده است که به خوبی می‌تواند در داخل الیاف الکترولیسی شده به طور یکنواخت پراکنده شود و در نهایت یک بستر مناسب و قابل دسترسی را برای سلول‌های کشت داده شده جهت آزادسازی دارو فراهم آورد.



شکل ۴- تصویر SEM از (الف) نانوکپسوله‌های حاوی جنیستین (ب) الیاف الکترولیسی حاوی ۲۰٪ داروی نمونه کپسوله شده

بررسی تست مکانیکی کشش (Tension) الیاف الکترولیسی شده

ساختارهای به کار برده شده در مهندسی بافت باید قدرت مکانیکی مناسب جهت تقلید از شرایط بیولوژیکی بدن موجود زنده را داشته باشند. یکی از مهمترین خواص مورد بررسی جهت تعیین کارایی نانو الیاف، تعیین حداکثر نیروی کششی است که ساختار می‌تواند در راستای محور تحمل کند. همچنین از پارامترهای مهم که در تست کشش مورد ارزیابی قرار می‌گیرد، میزان فشار بر حسب MPa نسبت به کشش است که این کمیت میزان تغییر طول نمونه نسبت به طول اولیه آن را برحسب درصد بیان می‌کند. PVA به دلیل ساختار کریستالی که دارد، بسیار پایدار بوده و در مقابل GE پلیمری با ارتجاعیت بالا است که بعنوان پلیمر تخریب پذیر در مهندسی بافت توانایی ایجاد چسبندگی سلولی و حفظ خواص عملکردی سلول‌ها را دارد که موجب استحکام نسبی در این پلیمر می‌گردد در نتیجه آمیخته کردن PVA با GE به دلیل وجود باندها و اتصالات داخلی، ساختارهایی با استحکام بالا را منجر شده و بر اساس تست انجام شده افزودن GE به PVA باعث بهبود خاصیت ارتجاعی بودن و افزایش میزان کشیدگی در نقطه گسیختگی می‌گردد. مدول الاستیکی برای الیاف با ۲۰٪ داروی کپسوله ۵۱/۳۳ MPa بوده و برای الیاف بدون دارو MPa ۲۵/۱۱ می‌باشد که نشان دهنده این است که الیاف دارای داروی کپسوله مقاومت بهتری دارند. در شکل (۵ الف) بررسی تست افزایش طول نسبی بر حسب فشار برای الیاف الکترولیسی شده، نمودار ۱ (۲۰٪) دارو، نمودار ۲ (بدون دارو) و نمودار ۳ (۱۵٪/دارو) بررسی شده است. مطابق شکل (۵ الف و ب) و نتایج جدول (۱) و جدول (۲)، بهترین حالت برای ۲۰٪ دارو می‌باشد که با افزایش میزان دارو پایداری الیاف‌های الکترولیسی شده افزوده می‌گردد و استحکام یا مقاومت کششی الیاف الکترولیسی حاوی مقدار بهینه دارو (۱/۲۹ MPa) بسیار بالاتر از الیاف الکترولیسی بدون دارو (۰/۵۲ MPa) می‌باشد. همچنین نمونه بدون دارو دارای دو حد تسلیم بالایی و پایینی می‌باشد و تغییر شکل آن در هنگام ازدیاد طول غیر یکنواخت بوده که نشان دهنده ناهمسانی در استحکام ساختار می‌باشد و برای کاربردهای مربوطه نامطلوب است [۴۰ و ۴۱].



شکل ۵- الف) بررسی افزایش طول نسبی و کشش بر حسب تنش و نیروی وارده، نمودار ۱ (۲۰٪ دارو)، نمودار ۲ (بدون دارو) و نمودار ۳ (۱۵٪ دارو)، ب) بررسی تست کشش بر حسب نیرو، نمودار ۱ (۲۰٪ دارو) و نمودار ۲ (بدون دارو).

جدول ۱- تست افزایش طول نسبی بر حسب تنش

مدول الاستیکی	کرنش در نقطه شکست (%)	افزایش طول در نقطه شکست (mm)	حداکثر تنش (MPa)	حداکثر نیرو (N)
۵۱/۳۳	۱۸/۶۵	۳/۳۱	۱/۲۵	۱/۱۹
۲۵/۱۱	۲۰/۰۴	۳/۸۲	۱/۹۹	۰/۶۵
۴۹/۹۱	۱۸/۲۰	۳/۳۳	۱/۴۹	۱/۵۵
۱۲/۰۴	۰/۹۵	۰/۲۳	۰/۳۱	۰/۳۷
۴۲/۱۲	۱۹/۰۸	۳/۴۹	۱/۵۸	۱/۱۳
انحراف				
میانگین				

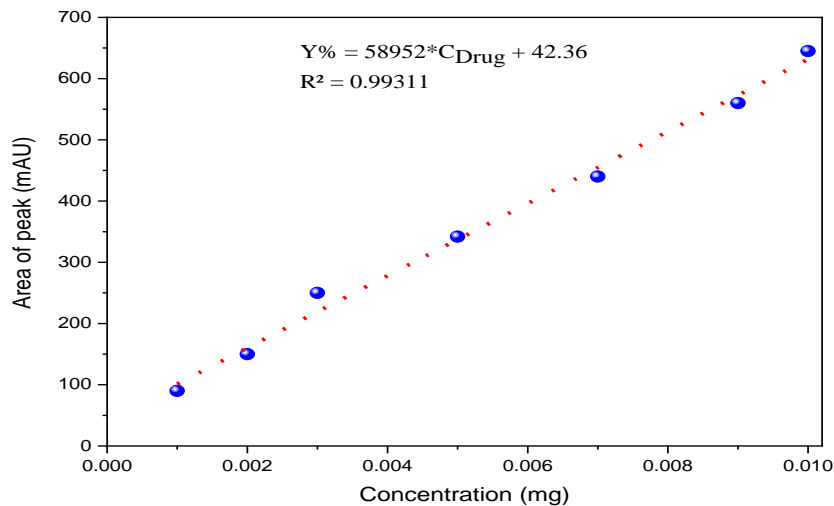
جدول ۲- تست کشش بر حسب نیرو

حداکثر تنش (MPa)	تنش در نقطه شکست (MPa)
۱/۲۹	۱/۳۳
۰/۵۲	۰/۴۹
۰/۳۹	۰/۴۲
۰/۹۰	۰/۹۱
	انحراف معیار
	میانگین

محاسبه درصد بارگذاری دارو (EE%)

در (شکل ۶) به بررسی کالیبراسیون رهایش دارو جنیستین کپسوله شده در محیط خنثی پرداخته شده است. وزن دارو در نانوکپسول بر طبق منحنی کالیبراسیون ۰/۰۰۲۹۸ گرم و وزن داروی اولیه ۰/۰۰۳۲۳ گرم می‌باشد، میزان بازدهی دارو بر طبق معادله (۱) ۹۲/۳ درصد بدست آمد [۴۲].

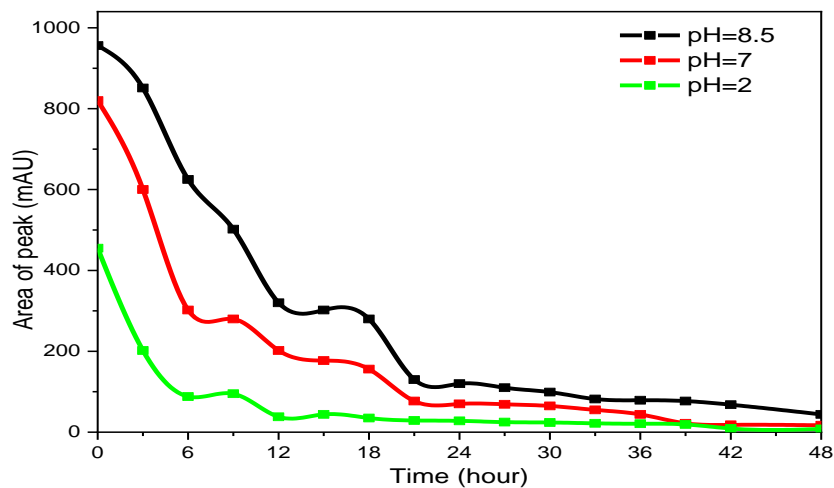
$$EE\% = \frac{\text{وزن دارو در نانو کپسول ها}}{\text{وزن داروی اولیه}} * 100 \quad (1)$$



شکل ۶- منحنی کالیبراسیون رهائش داروی نانوکپسوله شده در محیط خنثی

تأثیر pH بر رفتار رهاسازی دارو

در شکل (۷) رهائش داروی جنیستین کپسوله الکترورسی شده در سه محیط با pH مختلف (خنثی (۷)، اسیدی (۲) و بازی (۸/۵)) را نشان می‌دهد. رهائش دارو در محیط قلیایی و خنثی آهسته‌تر از محیط اسیدی و pH محیط اسیدی می‌تواند منجر به یک رهائش انفجاری ماده موثره گردد. می‌توان اینطور نتیجه‌گیری کرد که حامل‌های به کار رفته برای کپسوله کردن و الکترورسی (پلی کاپرولاکتون، ژلاتین و PVA) نسبت به محیط اسیدی حساس هستند، لذا در به کارگیری محصول باید به pH محیط توجه شود. به طور کلی یک رهائش قابل ملاحظه در طی ۷/۵ ساعت اول مشاهده گردید و رهاسازی کامل دارو در مدت زمان ۴۸ ساعت به طول انجامید [۳۰، ۳۱].



شکل ۷- مقایسه رهائش داروی جنیستین کپسوله الکترورسی شده در pH مختلف

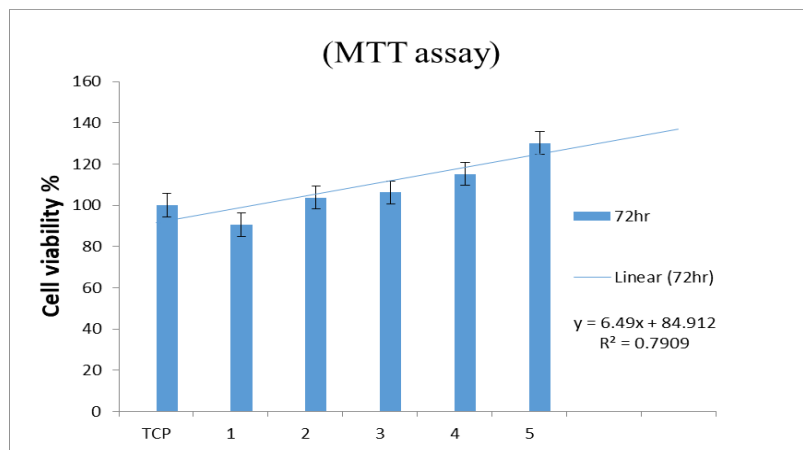
نتایج حاصل از آزمون MTT

در شکل (۸) نتایج حاصل از فعالیت سلولی و زنده مانی سلول در معرض داروی کپسوله الکترورسی با غلظت‌های مختلف نشان می‌دهد که هیچ یک از موارد طی ۷۲ ساعت دارای سمیت نیستند. محلولی که حاوی داروی کپسوله الکترورسی شده در حالت بهینه (نمونه ۵) می‌باشد از سطح نمودار سلول‌های کنترل (TCP) بالاتر رفته و باعث رشد سلول‌ها شده است. در طی انجام تست‌های MTT بر روی رده سلولی L929 میزان اثر بخشی داربست با دارو و داربست بدون دارو با یکدیگر مقایسه شد، با بررسی نمودارهای بدست آمده به خوبی مشخص گردید که تکثیر سلولی در نمونه ۵ افزایش و مقدار زنده مانی سلول بالاتر رفته است.

همچنین با افزایش میزان دارو در داربست تا ۲۰٪ میزان اثربخشی و تکثیر و مقدار زنده مانده سلول تا بالای ۱۲۰٪ در نمونه ۵ بالا می‌رود [۴۳ و ۴۴].

جدول ۳- نمونه‌هایی که مورد تست قرار گرفتند

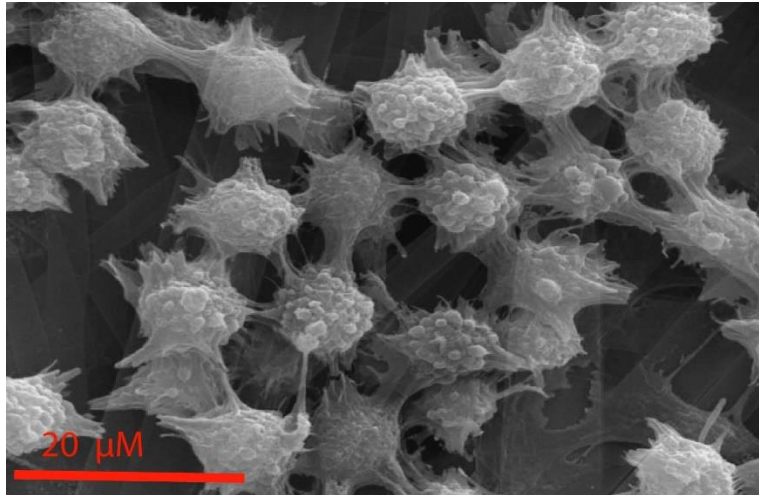
نمونه	نوع داربست	زمان الکترورسی	فاصله	دبی	ولتاژ
۱	داربست بدون دارو	۱/۵ ساعت	۱۰	۰/۶	۲۸
۲	داربست ۱۵٪ دارو	۱/۵ ساعت	۱۰	۰/۶	۲۸
۳	داربست ۱۵٪ دارو	۲/۴۵ ساعت	۱۰	۰/۶	۲۸
۴	داربست ۲۰٪ دارو	۱/۵ ساعت	۱۰	۰/۶	۲۸
۵	داربست ۲۰٪ دارو	۲/۴۵ ساعت	۱۰	۰/۶	۲۸
TCP	TCP	سلول کنترل			



شکل ۸- نتایج حاصل از آزمون MTT در بازه زمانی، ۷۲ ساعت

میکروسکوپ الکترونی (SEM)

برای بررسی چسبندگی سلولی و مورفولوژی از تصویربرداری SEM استفاده شد. شکل ۸، تصاویر SEM داربست را بعد از کاشت سلول‌های L929 فیبروبلاست موشی پس از ۷۲ ساعت نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، شکل ۹ داربست حاوی ۲۰٪ دارو (نمونه ۵) را نشان می‌دهد. بر اساس تصاویر، سلول‌های L929 به نمونه‌ها چسبیده و تکثیر پیدا کرده اند که این یک عامل اساسی در سازگاری سلولی و موفقیت نهایی در استفاده از داربست in-vivo است. تکثیر سلول‌های L929 بصورت اشکال کروی بر روی نمونه‌ها ظاهر شدند. از این رو داربست حاوی ۲۰٪ دارو نمونه ۵ (۲/۵۴ ساعت زمان الکترورسی) شرایط چسبندگی و تکثیر سلول‌های L929 فیبروبلاست موشی را فراهم کرده است. همچنین این چسبندگی و تکثیر سلولی با نتایج MTT تطابق کامل دارد [۴۰].



شکل ۹- تصویر SEM تکثیر رده سلولی L929 بر روی داربست حاوی ۲۰٪ دارو

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه هدف اصلی در مهندسی بافت بر پایه ساخت داربست با ساختار شیمیایی و فیزیولوژیک مناسب، قرار داشته و اینکه بتواند مانند ماتریکس خارج سلولی در محیط درون تنی (in vivo) عمل کند. در نتیجه داربست باید دارای ویژگی‌های زیست سازگاری، تخریب پذیری، غیر سمی بودن، آبدوستی مناسب و استحکام مطلوب باشد که در عین حال بتواند ترکیبات موثره را جهت اتصال، تکثیر و عملکرد سلولی، ذخیره و رهاسازی نماید تا امکان جایگزینی بافت آسیب دیده را فراهم آورد. در این پروژه، بر همین اساس یکی از بهترین پلیمرهای کاربردی زیست سازگار (پلی کاپرولاکتون) برای کپسوله کردن ماده موثره جنیستین استفاده شده است ولی با توجه به آب‌گریز بودن آن، از ترکیبات ژلاتین و پلی وینیل الکل برای تولید الیاف الکترورسی شده بهره بردیم که قابلیت تر شدن و آبدوستی داربست افزایش یابد و بتواند به توزیع یکنواخت سلولی بر روی نانوالیاف کمک کند. همچنین ژلاتین که نوعی پروتئین است خود به عنوان یک پلیمر طبیعی در بافت‌های حیوانی مانند پوست و استخوان وجود داشته و می‌تواند منجر به افزایش چسبندگی و تکثیر سلولی شود. از طرفی ماده موثره جنیستین باعث افزایش تکثیر اپیدرم شده و کلاژن پوستی را افزایش داده و با تعدیل پاسخ‌های التهابی بهبودی زخم را تسریع می‌بخشد؛ بنابراین با انتخاب اجزای مناسب برای تولید نانوالیافی که شباهت به ماتریکس خارج سلولی (ECM) طبیعی بدن دارند توانسته‌ایم شرایط مناسبی برای تکثیر و چسبندگی سلول‌های L929 فیبروبلاست موشی فراهم آوردیم که با نتایج گزارش شده تایید می‌گردد. مدول الاستیکی و استحکام یا مقاوت کششی برای الیاف با ۲۰٪ داروی کپسوله به ترتیب (۵۱/۳۳ MPa) و (۱/۲۹ MPa) نشان داده شد که دارای مقاوم خوبی می‌باشد. میزان بازدهی دارو ۹۲/۳ درصد بدست آمد و نشان داده شد که در طی ۷۲ ساعت دارای سمیت نمی‌باشد.

منابع و مراجع

- [1] Mateti T, Aswath S, Vatti AK, Kamath A, Laha A. A review on allopathic and herbal nanofibrous drug delivery vehicles for cancer treatments. *Biotechnology Reports*. 2021 Sep 1;31:e00663.
- [2] Peppas L. Polymers in controlled drug delivery. *Medical plastics and biomaterials magazine*. 1997.
- [3] Sharifi-Rad J, Quispe C, Imran M, Rauf A, Nadeem M, Gondal TA, Ahmad B, Atif M, Mubarak MS, Sytar O, Zhilina OM. Genistein: an integrative overview of its mode of action, pharmacological properties, and health benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2021;2021(1):3268136. <https://doi.org/10.1155/2021/3268136>.
- [4] Paul MK, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase–role and significance in cancer. *International journal of medical sciences*. 2004;1(2):101-15.
- [5] Caccamo D, Campisi A, Curro M, Bramanti V, Tringali M, Volti GL, Vanella A, Ientile R. Antioxidant treatment inhibited glutamate-evoked NF-κB activation in primary astroglial cell cultures. *Neurotoxicology*. 2005 Oct 1;26(5):915-21.
- [6] Han S, Wu H, Li W, Gao P. Protective effects of genistein in homocysteine-induced endothelial cell inflammatory injury. *Molecular and cellular biochemistry*. 2015 May;403:43-9.
- [7] Otomo T, Hossain MA, Ozono K, Sakai N. Genistein reduces heparan sulfate accumulation in human mucopolidosis II skin fibroblasts. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012 Feb 1;105(2):266-9
- [8] Piotrowska E, Jakobkiewicz-Banecka J, Barańska S, Tyłki-Szymańska A, Czartoryska B, Węgrzyn A, Węgrzyn G. Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses. *European Journal of Human Genetics*. 2006 Jul;14(7):846-52.
- [9] Isoherranen K, Punnonen K, Jansen C, Uotila P. Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes. *British journal of dermatology*. 1999 Jun 1;140(6):1017-22.
- [10] Adibkia K, Barzegar-Jalali M, Javadzadeh Y, Bayrami R, Mohammadi G. A review on the porous adsorbents in drug delivery systems. *Pharmaceutical Sciences*. 2012;18(2):103-18.
- [11] Trease GE, Evans WC. *Pharmacognosy*. Braillar Tiriden Company. Macmillan Publishers, 1996.
- [12] Parente JF, Sousa VI, Marques JF, Forte MA, Tavares CJ. Biodegradable polymers for microencapsulation systems. *Advances in polymer technology*. 2022;2022(1):4640379. <https://doi.org/10.1155/2022/4640379>.
- [13] Zanetti M, Mazon LR, de Meneses AC, Silva LL, de Araújo PH, Fiori MA, de Oliveira D. Encapsulation of geranyl cinnamate in polycaprolactone nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*. 2019 Apr 1;97:198-207.
- [14] Fagundes P, Carniel TK, Hall MC, Colpani GL, Silva LL, Zanetti M, de Mello JM, Dalcanton F, Fiori MA. Encapsulation of nerol oil in polycaprolactone polymer and stability evaluation. *Journal of Polymers and the Environment*. 2022 Jan;30(1):125-35.
- [15] Xue J, He M, Liu H, Niu Y, Crawford A, Coates PD, Chen D, Shi R, Zhang L. Drug loaded homogeneous electrospun PCL/gelatin hybrid nanofiber structures for anti-infective tissue regeneration membranes. *Biomaterials*. 2014 Nov 1;35(34):9395-405.
- [16] Song W, Chen L, Bergum C, Zhou Z, Shen M, Ren W, Yu X, Markel DC. Doxycycline-loaded coaxial nanofiber coating of titanium implants enhances osseointegration and inhibits *Staphylococcus aureus* infection. *Orthopaedic Proceedings*. 2017; 12 (3).
- [17] Zulkiflee I, Fauzi MB. Gelatin-polyvinyl alcohol film for tissue engineering: A concise review. *Biomedicines*. 2021 Aug 9;9(8):979.
- [18] Teixeira MA, Amorim MT, Felgueiras HP. Poly (vinyl alcohol)-based nanofibrous electrospun scaffolds for tissue engineering applications. *Polymers*. 2020;12(1):7.
- [19] Gil-Castell O, Ontoria-Oviedo I, Badia JD, Amaro-Prellezo E, Sepúlveda P, Ribes-Greus A. Conductive polycaprolactone/gelatin/polyaniline nanofibres as functional scaffolds for cardiac tissue regeneration. *Reactive and Functional Polymers*. 2022 Jan 1;170:105064.
- [20] Gil-Castell O, Badia JD, Ribes-Greus A. Tailored electrospun nanofibrous polycaprolactone/gelatin scaffolds into an acid hydrolytic solvent system. *European Polymer Journal*. 2018 Apr 1;101:273-81.

- [21] Fakhrali A, Poursharifi N, Nasari M, Semnani D, Salehi H, Ghane M, Mohammadi S. Fabrication and characterization of PCL/Gel nanofibrous scaffolds incorporated with graphene oxide applicable in cardiac tissue engineering. *Polymer-Plastics Technology and Materials*. 2021 Dec 12;60(18):2025-41. <https://doi.org/10.1080/25740881.2021.1939716>.
- [22] Jafari A, Amirsadeghi A, Hassanajili S, Azarpira N. Bioactive antibacterial bilayer PCL/gelatin nanofibrous scaffold promotes full-thickness wound healing. *International journal of pharmaceutics*. 2020 Jun 15;583:119413.
- [23] Zhang X, Chi C, Chen J, Zhang X, Gong M, Wang X, Yan J, Shi R, Zhang L, Xue J. Electrospun quad-axial nanofibers for controlled and sustained drug delivery. *Materials & Design*. 2021 Aug 1;206:109732.
- [24] Terra VA, Souza-Neto FP, Frade MA, Ramalho LN, Andrade TA, Pasta AA, Conchon AC, Guedes FA, Luiz RC, Cecchini R, Cecchini AL. Genistein prevents ultraviolet B radiation-induced nitrosative skin injury and promotes cell proliferation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2015 Mar 1;144:20-7.
- [25] Tang SC, Hsiao YP, Ko JL. Genistein protects against ultraviolet B-induced wrinkling and photoinflammation in in vitro and in vivo models. *Genes & Nutrition*. 2022 Dec;17(1):4.
- [26] Devi N, Sarmah M, Khatun B, Maji TK. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide-protein complex coacervates. *Advances in colloid and interface science*. 2017 Jan 1;239:136-45.
- [27] Zarepour A, Zarrabi A, Larsen KL. Fabricating β -cyclodextrin based pH-responsive nanotheranostics as a programmable polymeric nanocapsule for simultaneous diagnosis and therapy. *International Journal of Nanomedicine*. 2019 Aug 30;7017-38.
- [28] Ghorani B, Alehosseini A, Tucker N. Nanocapsule formation by electrospinning. In *Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries* 2017 Jan 1 (pp. 264-319). Academic Press.
- [29] Jafari SM. An overview of nanoencapsulation techniques and their classification. *Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries*. 2017 Jan 1:1-34.
- [30] Penton KE, Kinler Z, Davis A, Spiva JA, Hamilton SK. Electrospinning drug-loaded alginate-based nanofibers towards developing a drug release rate catalog. *Polymers*. 2022 Jul 6;14(14):2773.
- [31] Luraghi A, Peri F, Moroni L. Electrospinning for drug delivery applications: A review. *Journal of Controlled release*. 2021 Jun 10;334:463-84.
- [32] Butler M. *Animal cell culture and technology*. UK: Routledge; 2003.
- [33] Bose S, Darsell J, Kintner M, Hosick H, Bandyopadhyay A. Pore size and pore volume effects on alumina and TCP ceramic scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*. 2003 Jun 10;23(4):479-86.
- [34] Zhao ML, Liu XQ, Cao Y, Li XF, Li DJ, Sun XL, Gu HQ, Wan RX. Enhancement of interaction of L-929 cells with functionalized graphene via COOH⁺ ion implantation vs. chemical method. *Scientific Reports*. 2016 Nov 15;6(1):37112.
- [35] Caligiani A, Palla G, Maietti A, Cirilini M, Brandolini V. ¹H NMR fingerprinting of soybean extracts, with emphasis on identification and quantification of isoflavones. *Nutrients*. 2010 Feb 26;2(3):280-9.
- [36] Witek-Krowiak A, Podstawczyk D, Chojnacka K, Dawiec A, Marycz K. Modelling and optimization of chromium(III) biosorption on soybean meal. *Open Chemistry*. 2013 Sep 1;11(9):1505-17.
- [37] Riswanto FD, Rohman A, Pramono S, Martono S. The employment of UV-Vis spectroscopy and chemometrics techniques for analyzing the combination of genistein and curcumin. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2021 Feb 10;11(3):154-61.
- [38] da Silva LC, Cassago A, Battirolo LC, Gonçalves MD, Portugal RV. Specimen preparation optimization for size and morphology characterization of nanocellulose by TEM. *Cellulose*. 2020 Jun;27(9):5435-44.
- [39] Chen ZH, Yu F, Zeng XR, Zhang ZG. Preparation, characterization and thermal properties of nanocapsules containing phase change material n-dodecanol by miniemulsion polymerization with polymerizable emulsifier. *Applied Energy*. 2012 Mar 1;91(1):7-12.

- [40] Esmailneia S, Amiri Dehkharghani R, Zamanlui Benisi S. Architecture of a dual biocompatible platform to immobilize genistin: fabrication with physio-chemical and in vitro evaluation. *Scientific Reports*. 2023 Dec 17;13(1):22439.
- [41] Tan EP, Ng SY, Lim CT. Tensile testing of a single ultrafine polymeric fiber. *Biomaterials*. 2005 May 1;26(13):1453-6.
- [42] Mahmood S, Almurisi SH, Al-Japairai K, Hilles AR, Alelwani W, Bannunah AM, Alshammari F, Alheibshy F. Ibuprofen-Loaded Chitosan-Lipid Nanoconjugate Hydrogel with Gum Arabic: Green Synthesis, Characterisation, In Vitro Kinetics Mechanistic Release Study and PGE2 Production Test. *Gels*. 2021 Dec 8;7(4):254.
- [43] Radtke A, Topolski A, Jędrzejewski T, Kozak W, Sadowska B, Więckowska-Szakiel M, Piszczek P. Bioactivity studies on titania coatings and the estimation of their usefulness in the modification of implant surfaces. *Nanomaterials*. 2017 Apr 22;7(4):90.
- [44] Nokoorani YD, Shamloo A, Bahadoran M, Moravvej H. Fabrication and characterization of scaffolds containing different amounts of allantoin for skin tissue engineering. *Scientific reports*. 2021 Aug 9;11(1):16164.