



کلوئید غیر سمی پلی کاپرولاکتون 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، ایران.

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

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

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 پلی کاپرولاکتون (PCL) از طریق روش کوآسرواسیون (coacervation) نانوکپسوله شد. در نهایت، نانوالیافی زیست‌سازگار ژلاتین (GE) و پلی وینیل الکل (PVA) با ترکیب نانوکپسول‌های جنیستین از طریق روش الکترواسپین 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: پلی کاپرولاکتون، جنیستین، نانوکپسول، الکترواسپین، کوآسرواسیون، رده سلولی L929

rahebeha@gmail.com

۱- مقدمه

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 به دست می‌آید [۳]. جنیستین یک ایزوفلاون است که عملکردهای مشابه استروژن را در سلول‌ها اعمال می‌کند. این ترکیب با گیرنده‌های استروژن باند شده و اثرات دوگانه‌ای را می‌تواند اعمال کند. جنیستین به صورت دارویی به عنوان یک مکمل رژیمی و جایگزینی برای هورمون‌های درمانی استفاده می‌شود [۴].

استفاده از فناوری نانو برای دارورسانی یکی از روش‌هایی است که امروزه توجهات بسیاری را به خود جلب کرده است. نانو الیاف الکترواسپین می‌تواند علاوه بر کنترل مقدار داروی آزادشده، از سمیت و آسیب به سلول‌های سالم جلوگیری کند. مساحت سطح بالا، رهش طولانی‌مدت دارو، راندمان کپسولاسیون بالا، زیست سازگاری و مقرون‌به‌صرفه بودن از ویژگی‌های این فناوری

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۷/۷

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۹/۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۳

زمستان ۱۴۰۳ | شماره ۴ | سال یازدهم

چندین اثر بیولوژیکی جنیستین مانند فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی [۵]، ضدالتهابی [۶]، ضد باکتریایی و ضدویروسی و فعالیت‌های دارویی بر دیابت گزارش شده است [۳]. اثرات جنیستین بر روی فیبروبلاست‌های بیماران مبتلا به موکولیپیدوزا [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.

پلی کاپرولاکتون یک پلیمر زیست‌تخریب‌پذیر است که به دلیل زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری در مهندسی بافت به‌عنوان ماده داربست استفاده شده است [۱۲]. همچنین به‌عنوان یک ماتریس پلیمری برای سیستم‌های دارورسانی استفاده شده است. این مواد توانایی برای تجزیه شدن توسط میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها به مواد طبیعی مانند آب، دی‌اکسید کربن و زیست‌توده را دارند. همچنین سازگار با محیط‌زیست هستند زیرا می‌توانند توسط فرآیندهای طبیعی تجزیه شوند و در محیط انباشته نشوند [۱۳، ۱۴]. جهت جلوگیری از عفونت غشاء، الکتروریسی پلی کاپرولاکتون/ژلاتین/مترونیدازول [۱۵] و پلی کاپرولاکتون/پلی وینیل الکل/داکسی سایکلین [۱۶] توسعه داده شده است و سرعت تجزیه زیستی عالی و خواص مکانیکی قابل قبول را ایجاد کرده است [۱۵]. پلی وینیل الکل (PVA) و ژلاتین دو ماده‌ای هستند که در کاربردهای مهندسی بافت مورد استفاده قرار گرفته‌اند. ترکیب این مواد اثرات هم‌افزایی خود را در کاربردهای ترمیم زخم به اثبات رسانده است [۱۷]. داربست‌های نانو الیاف الکتروریسی شده بر پایه پلی وینیل الکل 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 ارمغان آورده است. داربست‌های نانو الیافی PCL/Ge و ذرات پلی آنیلین (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 نانو الیاف 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 پلی کاپرولاکتون می‌تواند نبود گروه‌های عاملی آب‌دوست در ساختار پلی کاپرولاکتون باشد که باعث عدم ترکیب آن با مواد آب‌دوست و زیست‌سازگار شده است [۱۹]. در نتیجه افزایش پلیمرهای آب‌دوست سیگنال‌های بیوشیمیایی را برای ترویج چسبندگی، مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولی ارائه می‌دهند. در این راستا داربست‌های نانو الیافی دوجزئی PCL/Ge به‌عنوان یک بستر همه‌کاره برای بازیابی پوست پیشنهاد شده است [۲۰]. یکی از دلایل ساخت داربست‌های چندلایه با خاصیت ضد باکتریایی طولانی‌مدت، وجود زخم‌های عفونی است که بهبود آن‌ها به زمان طولانی نیازمند است. داربست‌های نانو الیافی دولایه آموکسی‌سیلین/نانو ذرات اکسید روی بر پایه پلی کاپرولاکتون 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 نانو الیاف الکتروریسی شده می‌تواند اجزای مواد در لایه‌های مختلف را به‌خوبی تنظیم کند. نانو الیاف اجازه کنترل و آزادسازی دارو در لایه‌های مختلف و همچنین دست‌کاری محل دارو را می‌دهد. در تحقیقی گزارش شده است که پلی کاپرولاکتون را برای ساختن اولین لایه خارجی و ژلاتین برای ساختن دومین لایه خارجی نانو الیاف اعمال شده است [۲۳]. در یک تحقیق موکسی فلوکسازین، نوعی داروی ضد باکتری در لایه‌های مختلف نانو الیاف چهار محوری جای‌گرفته شده و کنترل مؤثری را بر تحویل دارو انجام می‌دهد [۲۳]. تحقیقات زیادی با استفاده از نانو الیاف برای کاربردهای متفاوت از جمله، نانو الیاف متخلخل پلی (ال-لاکتیک اسید)، برای کنترل خواص کامپوزیت و پاسخ‌های بیولوژیکی [۹]، نانو الیاف موکوچسب حاوی برینزولامید برای جایگزین درمان گلوکوم [۲۴]، نانو الیاف پلی لاکتید قابل جذب برای درمان پریودنتیت [۱۰]، نانو الیاف پلی وینیل الکل/صمغ عربی الکتروریسی شده برای رشد سلول‌های آزمایشگاهی و تحویل نانو دارو سرطان [۱۱]، نانو الیاف فتوترمال برای تسریع بهبود زخم دیابتی [۲۵]، نانو الیاف آلژینات-سلولز با چاپ سه‌بعدی برای تجویز موضعی کورکومین [۱۴] و نانوفیبر بر پایه‌ی فوم-فیلم

سنتز از شرکت مرک آلمان خریداری شد. پودر سویا و روغن آفتاب‌گردان از مزارع ایران خریداری گردید.

۲-۲- به دست آوردن عصاره گیاهی جنیستین از پودر دانه سویا

برای به دست آوردن عصاره گیاهی جنیستین از روش ترکیبی اولتراسونیک و روتاری با مخلوط اتانول/آب [۲۸]، استفاده گردید. با توجه به نتایج به دست 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 مهروموم، 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 قراردادیم.

۲-۳- نانوکپسوله سازی جنیستین

نانو کپسول‌ها 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 مهروموم شد. این مخلوط را برای ۲ ساعت تحت همزن مغناطیسی قراردادیم تا مخلوط همگن شود. یک محلول اسیدلاکتیک (محلول کوآسرواسیون) به صورت قطره-قطره در حمام اولتراسونیک اضافه شد تا pH زیر نقطه ایزوالکتریک (۴/۰) برسد. سپس کولوئید به دست آمده را به سرعت به ۱۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب‌خنک کردیم تا باهم زدن با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه نانو کپسول‌ها بهتر شکل گیرند و کولوئید پایدار شود. نانو کپسول‌ها را فیلتر کردیم و با یک خشک‌کن انجمادی (۷۲ ساعت در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد) خشک کردیم.

(nanofiber-on-foam-on-film) مبتنی بر کیتوزان برای انتقال پپتید غیرتهاجمی [۱۳] بکار برده شده است. روش‌های جدیدی با استفاده از نانو الیاف فوق نازک، برای توسعه سریع سیستم تحویل نانو دارو 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 فیبروبلاست موش هستند که از یک موش نر C3H/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 نانو الیاف 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.

۲- بخش آزمایشگاهی

۲-۱- مواد

مواد مورد استفاده در این پژوهش هیدروکلریدریک اسید (HCl)، اتانول (C₂H₆O)، اتیل استات (C₄H₈O₂)، نرمال هگزان (CH₃(CH₂)₄CH₃)، پلی‌کاپرولاکتون (C₆H₁₀O₂)_n، استون (CH₃)₂CO، اسپان ۸۰ (C₂₄H₄₄O₆)، توئین (C₆₄H₁₂₄O₂₆)، ژلاتین (C₆H₁₂O₆)، اسیدلاکتیک (C₃H₆O₃)، اسید استیک (CH₃COOH) و پلی‌وینیل الکل (CH₂CH(OH))_n می‌باشد. همه مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در مراحل پژوهش و

۴-۲- الکتروریسی جینیستین کپسوله

مقدار ۰/۰۹ گرم پلی وینیل الکل به ۱ میلی لیتر آب تقطیر مضاعف با دمای ۹۰ درجه سانتی گراد افزوده شد و در حمام آب با دمای ۹۰ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد 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 قبیل 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 [۲۸ و ۲۹].

۵-۲- آماده سازی نمونه ها برای طیف UV-Vis

ابتدا، میکروسول ها به طور کامل شسته شده و به آن ها استونیتریل به عنوان شاهد اضافه شد. سپس طیف مربوطه در طول موج ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر اندازه گیری شد تا درصد خطا کاهش یابد. نمونه بدون دارو به عنوان نمونه در دستگاه قرار گرفت و طول موج آن اندازه گیری 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 کنباله سویا را در ۱۵ میلی لیتر حلال اتانول حل کرده و طیف UV گرفته شد. طیف UV جینیستین حاصل از کنباله سویا دارای طول موج جذبی ۲۶۳ نانومتر بود. همچنین ماده کپسوله شده با دارو با مقدار ۰/۰۵ گرم در ۴۵ میلی لیتر حلال استونیتریل حل شده و طیف UV گرفته شد.

۶-۲- 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 سانتی گراد کرده تا شروع به چرخش نماید و در طول موج ۲۶۳ نانومتر، از نمونه در زمان های 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 سانتی گراد کرده تا شروع به چرخش نماید و در طول موج ۲۶۳ نانومتر، از نمونه در زمان های مختلف HPLC گرفته شد.

مرحله سوم محیط بازی: ۴۰ میلی لیتر آب مقطر با ۰/۳۸۵

سدیم بی کربنات با ۰/۴۵ 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 سانتی گراد کرده تا شروع به چرخش نماید و در طول موج ۲۶۳ نانومتر، از نمونه در زمان های مختلف تا ۴۸ ساعت HPLC گرفته شد [۳۰، ۳۱].

۷-۲- 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، نمونه ها را درون یخچال نگهداری می کنیم و آن ها را از نور مستقیم دور نگهداریم؛ اما اگر زمان بیشتری مورد نیاز باشد، نمونه ها را در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می کنیم.

۸-۲- آماده سازی تست مکانیکی کشش

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

۹-۲- ایزوترم‌های کالیراسیون رهایش داروی کپسوله شده توسط HPLC

در اینجا به بررسی ایزوترم‌های رهایش 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 میلی‌لیتر از نمونه اصلی و مقدار ۹ میلی‌لیتر از محلول شاهد را برداشته و به دستگاه HPLC تزریق می‌شوند. محلول الوشن با ترکیب ۸۵٪ استونیتریل و ۱۵٪ آب ساخته‌شده و در طول موج ۲۶۶ نانومتر و در زمان ۱۰ دقیقه، سطح زیر پیک‌ها بررسی می‌شود. در نتیجه، نمونه کپسوله شده را روی نمودار کالیراسیون برده و غلظت داروی بارگذاری شده به دست می‌آید.

۱۰-۲- آزمون MTT

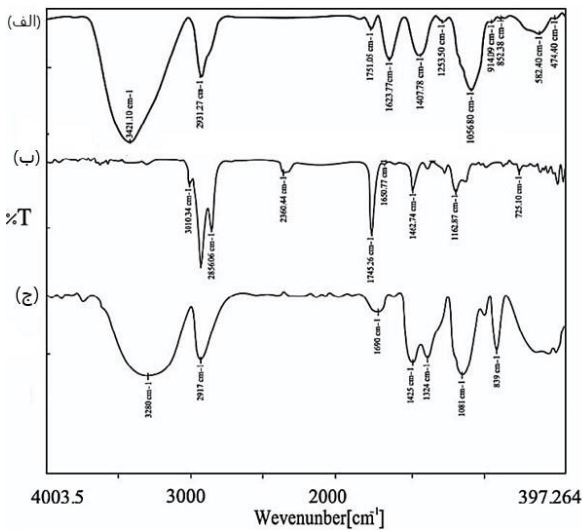
بلورهای نامحلول فورمازان در حلال مناسب توسط دی متیل سولفو کساید (DMSO) به صورت محلول درمی‌آیند و به روش‌های اسپکترومتری مقدار سنجی می‌شود. مقدار بلور فورمازان ایجادشده می‌تواند نشان‌دهنده درصد سلول‌های زنده باشد. هرچه سلول‌ها فعال‌تر و تعدادشان بیشتر باشد میزان رنگ ایجادشده بیشتر است. جذب نوری رنگ ارغوانی ظاهرشده در طول موج ۵۴۰ با استفاده از دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری می‌شود [۳۲، ۳۳]. داربست به دست‌آمده روی پلیت ۹۶ خانه قرار داده شد و دو طرف داربست به مدت ۲۰ دقیقه توسط اشعه UV استریل شدند سپس داربست دو بار با PBS هر بار به مدت ۵ دقیقه شست‌وشو شدند. بدین منظور از سلول L929 فیروبلاست موشی، به تعداد 5×10^3 در هر

چاهک، پلیت ۹۶ خانه محتوی داربست‌های استریل شده و خانه‌های بدون داربست (به‌عنوان 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 میکرو لیتر روی سلول‌ها ریخته شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس مایع رویی روی سلول‌ها برداشته‌شده و کریستال‌های فورمازان در $\mu\text{l/well}$ ۱۰۰ 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 معنی‌دار 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].

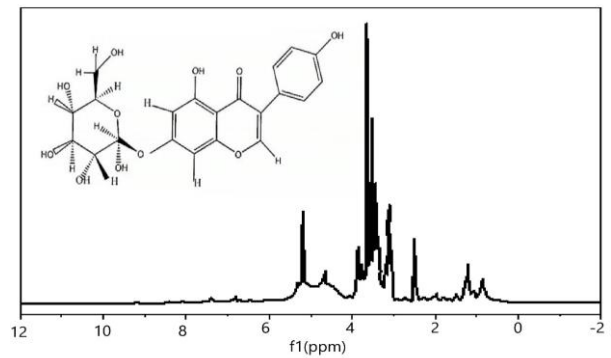
۳- بحث و نتایج

۱-۳- تحلیل و تفسیر طیف‌سنجی ¹H NMR نانوکپسوله‌های PCL حاوی جنیستین

۵ میلی‌گرم از نمونه با مقدار ۰/۵ سی‌سی 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 $\delta = 5/18$ ppm قرار گرفته است که تأیید وجود بخش فلاونی ترکیب می‌باشد. مابقی سیگنال‌ها در طیف ¹H NMR نمونه کپسوله شده مربوط به پروتون‌های آلیفاتیک پلی کاپرولاکتون می‌باشد [۳۵].



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



شکل ۳: طیف ^1H NMR داروی نانوکپسوله شده.

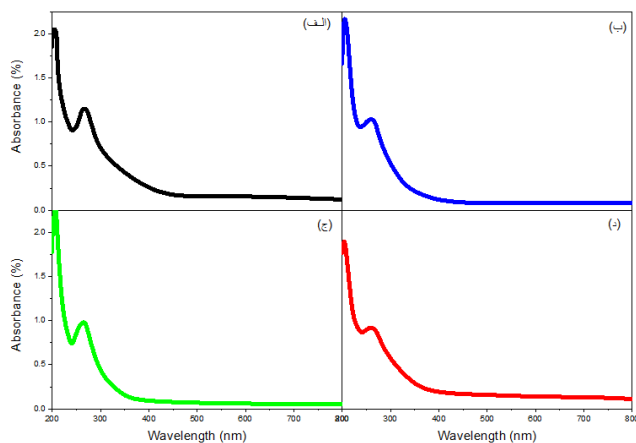
۲-۳- تحلیل و تفسیر آنالیز FT-IR

حدود ۵ میلی‌گرم از نمونه اولیه را در مقدار ۵۰ میلی‌گرم پتاسیم برمید مخلوط و به‌صورت پودر درمی‌آوریم 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 مؤثره 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 درحالی‌که شدت پیک ارتعاشی گروه $\text{C}=\text{O}$ 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 درحالی‌که باند کوچک در ناحیه ۲۹۱۷ به نوارهای مشخصه ارتعاشی کششی CH آلیفاتیک اختصاص دارد. کاهش شدت نوار ارتعاشی کششی $\text{C}=\text{O}$ و جابه‌جایی آن به عدد موجی پایین‌تر در ناحیه ۱۶۹۰ نشان‌دهنده 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 $\text{C}-\text{N}$ و $\text{C}-\text{O}$ می‌باشند [۳۶].

۳-۳- 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 انتقالات الکترونی $n \rightarrow \pi^*$ است. انرژی موردنیاز برای این نوع از انتقالات الکترونی در محدوده ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر قرار دارند. هردو این انتقالات به دلیل وجود الکترون‌های غیر پیوندی و پیوندهای غیراشباع دوگانه، سه‌گانه یا آروماتیکی در ساختار مولکول روی می‌دهند. طول موج جذبی عصاره جنیستین ۲۶۶ نانومتر دارای انتقال $\pi \rightarrow \pi^*$ است که در تمامی نمونه‌ها حضور دارد [۳۶ و ۳۷] و با توجه به پوشش دهی مضاعف این ترکیب مؤثره، شدت جذب آن به تدریج کاهش یافته است.

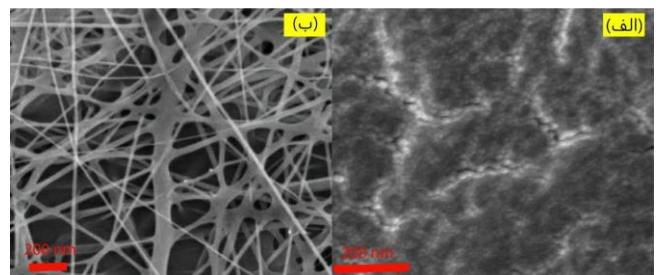


شکل ۳: طیف UV-Vis، الف) جنیستین استاندارد، ب) جنیستین استخراج شده، ج) جنیستین نانو کپسوله شده، د) نانو الیاف الکتروریسی شده حاوی جنیستین نانو کپسوله.

۴-۳- 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 بزرگمایی ۱۰ تا ۵۰۰۰۰۰ برابر با قدرت تفکیکی کمتر از ۱ تا ۲۰ نانومتر (بسته به نوع نمونه) را دارد.

مورفولوژی نانو کپسوله‌های حاوی جنیستین در شکل (۴ الف) و الیاف الکتروریسی حاوی ۲۰٪ داروی جنیستین در شکل (۴ ب) نشان داده شده است. بررسی قطر و مورفولوژی نمونه‌های بهینه جنیستین نانو کپسوله شده، اندازه ذرات را در محدوده ۲۰ تا ۳۰ نانومتر نشان می‌دهد و الیاف الکتروریسی حاوی ۲۰٪ داروی کپسوله شده که دارای الیاف بدون عیوب ساختاری بودند، میانگین قطر ۴۵ نانومتر هستند [۳۷-۴۰]. با توجه به تصاویر SEM، درمی‌یابیم که روش کوآسرواسیون روش مناسبی برای نانو کپسوله کردن ماده مؤثر بوده زیرا اندازه ذرات در زیر ۳۰ نانومتر به صورت کروی ایجاد شده است که به خوبی می‌تواند در داخل الیاف الکتروریسی 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.



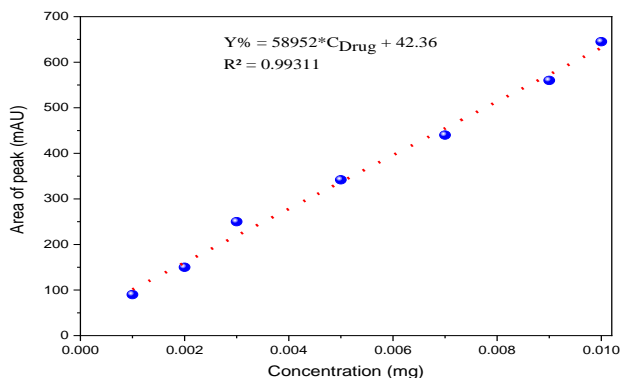
شکل ۴: تصویر SEM از الف) نانو کپسوله‌های حاوی جنیستین ب) الیاف الکتروریسی حاوی ۲۰٪ داروی نمونه کپسوله شده.

۵-۳- بررسی تست مکانیکی کشش (Tension) الیاف الکتروریسی 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 بر حسب درصد بیان می‌کند.

PVA به دلیل ساختار کریستالی که دارد، بسیار پایدار بوده و در مقابل GE پلیمری با ارتجاعیت بالا است که به عنوان 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 ۲۵/۱۱ MPa می‌باشد که نشان‌دهنده این است که الیاف دارای داروی کپسوله مقاومت بهتری دارند. در شکل (۵ الف) بررسی تست افزایش طول نسبی بر حسب فشار برای الیاف الکتروریسی 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 الکتروریسی شده افزوده می‌گردد و استحکام یا مقاومت کششی الیاف الکتروریسی حاوی مقدار بهینه دارو (۱/۲۹ MPa) بسیار بالاتر از الیاف الکتروریسی 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 غیریکنواخت بوده که نشان‌دهنده ناهمسانی در استحکام ساختار می‌باشد و برای کاربردهای مربوطه نامطلوب است [۴۰ و ۴۲].

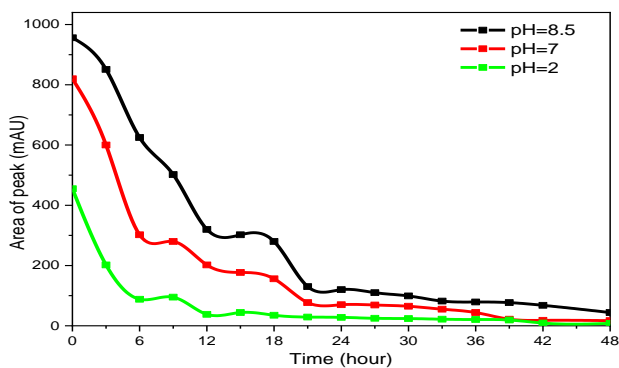
$$\%EE = \frac{\text{وزن دارو در نانو کپسول ها}}{\text{وزن داروی اولیه}} * 100 \quad (1)$$



شکل ۶: منحنی کالیبراسیون رهائش داروی نانو کپسوله شده در محیط خنثی.

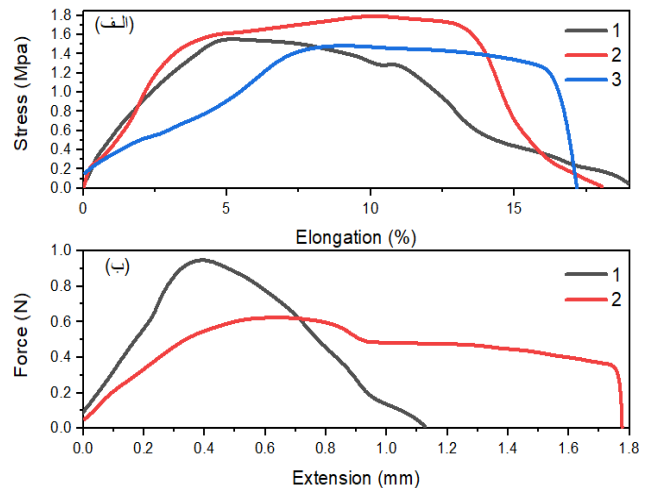
۷-۳- تأثیر pH بر رفتار رهاسازی دارو

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 مؤثره گردد. می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری کرد که حامل‌های به‌کاررفته برای کپسوله کردن و الکترورسی (پلی کاپرولاکتون، ژلاتین و PVA) نسبت به محیط اسیدی حساس هستند، لذا در به‌کارگیری محصول باید به pH محیط توجه شود. به‌طورکلی یک رهائش قابل‌ملاحظه در طی ۷/۵ ساعت اول مشاهده گردید و رهاسازی کامل دارو در مدت‌زمان ۴۸ ساعت به طول انجامید [۳۰ و ۳۱].



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

۸-۳- نتایج حاصل از آزمون MTT



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

جدول ۱: تست افزایش طول نسبی برحسب 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

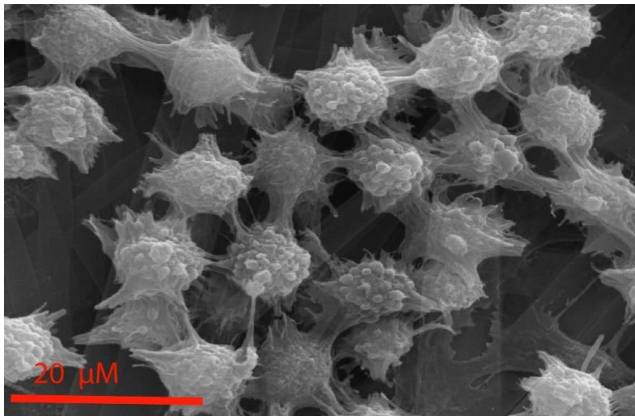
جدول ۲: تست کشش برحسب نیرو

حداکثر تنش (MPa)	تنش در نقطه شکست (MPa)	میانگین انحراف
۱/۲۹	۱/۳۳	۱
۰/۵۲	۰/۴۹	۲
۰/۳۹	۰/۴۲	انحراف معیار
۰/۹۰	۰/۹۱	میانگین

۶-۳- محاسبه درصد بارگذاری دارو (%EE)

در (شکل ۶) به بررسی کالیبراسیون رهائش دارو جنیستین کپسوله شده در محیط خنثی پرداخته شده است. وزن دارو در نانو کپسول 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 به دست آمد [۴۳].

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 کرده‌اند که این یک عامل اساسی در سازگاری سلولی و موفقیت نهایی در استفاده از داربست in-vivo است. تکثیر سلول‌های L929 به صورت اشکال کروی بر روی نمونه‌ها ظاهر شدند. از این رو داربست حاوی ۲۰٪ دارو نمونه ۵ (۲/۵۴ ساعت زمان الکترولیسی) شرایط چسبندگی و تکثیر سلول‌های L929 فیروبلاست 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

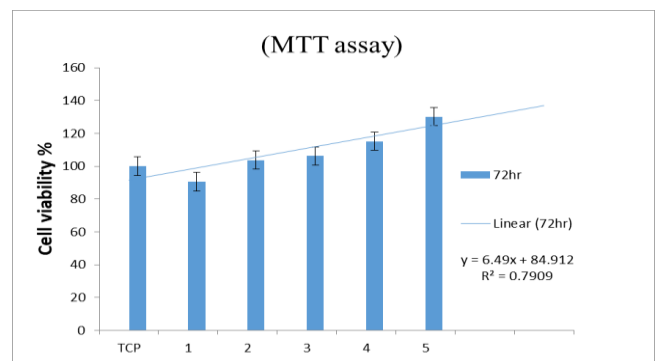
۴- نتیجه گیری

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 مؤثره را جهت اتصال، تکثیر و عملکرد سلولی، ذخیره و رهاسازی نماید تا امکان جایگزینی بافت آسیب‌دیده را فراهم آورد. در این پروژه، بر همین اساس یکی از بهترین پلیمرهای کاربردی زیست سازگار (پلی کاپرولاکتون) برای کپسوله کردن ماده مؤثره جنیستین استفاده شده است ولی با توجه به آب‌گریز بودن آن، از ترکیبات ژلاتین و پلی وینیل الکل برای تولید الیاف الکترولیسی شده بهره بردیم که قابلیت تر شدن و آب‌دوستی داربست افزایش یابد و بتواند به توزیع یکنواخت سلولی بر روی نانو الیاف کمک کند. همچنین ژلاتین که

در شکل (۸) نتایج حاصل از فعالیت سلولی وزنده‌مانی سلول در معرض داروی کپسوله الکترولیسی با غلظت‌های مختلف نشان می‌دهد که هیچ‌یک از موارد طی ۷۲ ساعت دارای سمیت نیستند. محلولی که حاوی داروی کپسوله الکترولیسی 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 اثربخشی داربست با دارو و داربست بدون دارو با یکدیگر مقایسه شد، با بررسی نمودارهای به‌دست‌آمده به خوبی مشخص گردید که تکثیر سلولی در نمونه ۵ افزایش و مقدار زنده‌مانی سلول بالاتر رفته است. همچنین با افزایش میزان دارو در داربست تا ۲۰٪ میزان اثربخشی و تکثیر و مقدار زنده‌مانی سلول تا بالای ۱۲۰٪ در نمونه ۵ بالا می‌رود [۴۴ و ۴۵].

جدول ۳: نمونه‌هایی که مورد تست قرار گرفتند

نمونه	نوع داربست	زمان	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.

۹-۳- 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 فیروبلاست موشی پس از ۷۲ ساعت

[4] K.P. Manash, K. Anup, "Mukhopadhyay, Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer," *Int J Med Sci.* 1 (2004) 101–115, 2004.

[5] D. Caccamo, A. Campisi, M. Currò, V. Bramanti, M. Tringali, G. Li Volti, A. Vanella, R. Ientile, "Antioxidant treatment inhibited glutamate-evoked NF-kappaB activation in primary astroglial cell cultures," *Neurotoxicology*, 26, 915–921, 2005.

[6] S. Han, H. Wu, W. Li, P. Gao, "Protective effects of genistein in homocysteine-induced endothelial cell inflammatory injury," *Mol. Cell. Biochem.* 403, 43–49, 2015.

[7] T. Otomo, M.A. Hossain, K. Ozono, N. Sakai, "Genistein reduces heparan sulfate accumulation in human mucopolysaccharidosis II skin fibroblasts," *Mol. Genet. Metab.*, 105, 266–269, 2012.

[8] E. Piotrowska, J. Jakóbkiewicz-Banecka, S. Barańska, A. Tylki-Szymańska, B. Czartoryska, A. Wegrzyn, G. Wegrzyn, "Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses," *Eur. J. Hum. Genet.* 14, 846–852, 2006.

[9] K. Isoherranen, K. Punnonen, C. Jansen, P. Uotila, "Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes," *Br. J. Dermatol.* 140, 1017–1022, 1999.

[10] K. Adibkia, M. Barzegar-Jalali, Y. Javadzadeh, R. Bayrami, G. Mohammadi, "A Review on the porous adsorbents in drug delivery systems," *Pharmaceutical Sciences*, 18(2), 103-118, 2012.

[11] G.E. Trease, W.C. Evans, "Pharmacognosy," Braillar Tiriden Company, 1996.

[12] J.F. Parente, V.I. Sousa, J.F. Marques, M.A. Forte, C.J. Tavares, "Biodegradable polymers for

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 مؤثره 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 نانو الیافی که شباهت به ماتریکس خارج سلولی (ECM) طبیعی بدن دارند توانسته‌ایم شرایط مناسبی برای تکثیر و چسبندگی سلول‌های L929 فیروبلاست موشی فراهم آورده‌یم که با نتایج گزارش شده تأیید می‌گردد. مدول الاستیکی و استحکام یا مقاومت کششی برای الیاف با ۲۰٪ داروی کپسوله به ترتیب (۵۱/۳۳ MPa) و (۱/۲۹) نشان داده شد که دارای مقاومت خوبی می‌باشد. میزان بازدهی دارو ۹۲/۳ درصد به دست آمد و نشان داده شد که در طی ۷۲ ساعت دارای سمیت نمی‌باشد.

مراجع

[1] T. Mateti, S. Aswath, A. Kishore Vatti, A. Kamath, A. Laha, "A review on allopathic and herbal nanofibrous drug delivery vehicles for cancer treatments", *Biotechnology Reports*, 31, e00663, 2021.

[2] L.B. Pepas, "Polymers in controlled Drug Delivery," *Medical plastics and Biomaterials*, 1997, 4, 34-44, 1997.

[3] J. Sharifi-Rad, C. Quispe, M. Imran, A. Rauf, M. Nadeem, T. Aslam Gondal, B. Ahmad, M. Atif, M.S. Mubarak, O. Sytar, O. M. Zhilina, E. R. Garsiya, A. Smeriglio, D. Trombetta, D. G. Pons, M. Martorell, S.M. Cardoso, A.F.A. Razis, U. Sunusi, R. M. Kamal, L.S. Rotariu, M. Butnariu, A.O. Docea, D. Calina, "Genistein: An Integrative Overview of Its Mode of Action, Pharmacological Properties, and Health Benefits," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3268136, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/3268136>.

- [19] O. Gil-Castell, I. Ontoria-Oviedo, J.D. Badia, E. Amaro-Prellezo, P. Sepúlveda, A. Ribes-Greus, "Conductive polycaprolactone/gelatin/polyaniline nanofibres as functional scaffolds for cardiac tissue regeneration," *Reactive and Functional Polymers*, 170, 105064, 2022.
- [20] O. Gil-Castell, J.D. Badia, A. Ribes-Greus, Tailored electrospun nanofibrous polycaprolactone/gelatin scaffolds into an acid hydrolytic solvent system," *European Polymer Journal*, 101, 273-281, 2018.
- [21] A. Fakhrali, N. Poursharifi, M. Nasari, D. Semnani, H. Salehi, M. Ghane, S. Mohammadi, "Fabrication and characterization of PCL/Gel nanofibrous scaffolds incorporated with graphene oxide applicable in cardiac tissue engineering," *Polymer-Plastics Technology and Materials*, 60(18), 2025-2041, 2021. <https://doi.org/10.1080/25740881.2021.1939716>.
- [22] A. Jafari, A. Amirsadeghi, S. Hassanajili, N. Azarpira, "Bioactive antibacterial bilayer PCL/gelatin nanofibrous scaffold promotes full-thickness wound healing," *International Journal of Pharmaceutics*, 583, 119413, 2020.
- [23] X. Zhang, C. Chi, J. Chen, X. Zhang, M. Gong, X. Wang, J. Yan, R. Shi, L. Zhang, J. Xue, "Electrospun quad-axial nanofibers for controlled and sustained drug delivery," *Materials & Design* 206, 109732, 2021.
- [24] V.A. Terra, F.P. Souza-Neto, M.A. Frade, L.N. Ramalho, T.A. Andrade, A.A. Pasta, A.C. Conchon, F.A. Guedes, R.C. Luiz, R. Cecchini, et al. "Genistein prevents ultraviolet B radiation-induced nitrosative skin injury and promotes cell proliferation," *J. Photochem. Photobiol. B.*, 144, 20-27, 2015.
- microencapsulation systems," *Advances in polymer technology*, (1), 4640379, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/4640379>.
- [13] M. Zanetti, L. Regina Mazon, A.C. de Meneses, L. Luiz Silva, P. Henrique Hermes de Araújo, M. Antônio Fiori, D. de Oliveira, "Encapsulation of geranyl cinnamate in polycaprolactone nanoparticles," *Materials Science and Engineering: C*, 97, 198-207, 2019.
- [14] P. Fagundes, T. Karoline Carniel, M. Canal Hall, G. Lopes Colpani, L. Luiz Silva, M. Zanetti, J.M. Muneron de Mello, F. Dalcanton, M. A. Fiori, "Encapsulation of Nerol Oil in Polycaprolactone Polymer and Stability Evaluation," *Journal of Polymers and the Environment*, 30, 125-135, 2022.
- [15] J. Xue, M. He, H. Liu, Y. Niu, A. Crawford, P.D. Coates, D. Chen, R. Shi, L. Zhan, "Drug loaded homogeneous electrospun PCL/gelatin hybrid nanofiber structures for anti-infective tissue regeneration membranes," *Biomaterials*, 35, 9395-9405, 2014.
- [16] W. Song, L. Chen, C. Bergum, Z. Zhou, M. Shen, W. Ren, X. Yu, D.C. Markel, "Doxycycline-loaded coaxial nanofiber coating of titanium implants enhances osseointegration and inhibits *Staphylococcus aureus* infection," *Orthopaedic Proceedings*, 12 (3), 2017.
- [17] I. Zulkiflee, M.B. Fauzi, "Gelatin-Polyvinyl Alcohol Film for Tissue Engineering: A Concise Review," *Biomedicines*, 9, 979, 2021.
- [18] A. Marta, M. Teixeira, T.P. Amorim, H.P., Felgueiras, "Poly(Vinyl Alcohol)-Based Nanofibrous Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications," *Polymers (Basel)*, 12 (7), 2020.

- [33] S. Bose, J. Darsell, M. Kintner, H. Hosick, A. Bandyopadhyay, "Pore size and pore volume effects on alumina and TCP ceramic scaffolds," *Materials Science and Engineering: C*, 23(4), 479-486, 2003.
- [34] M. Zhao, X. Liu, Y. Cao, X. Li, D. Li, X. Sun, H. Gu, R. Wan, "Enhancement of interaction of L-929 cells with functionalized graphene via COOH+ ion implantation vs. chemical method," *Scientific Reports*, 6, 37112, 2016.
- [35] A. Caligiani, G. Palla, A. Maietti, M. Cirilini, V. Brandolini, "1H NMR Fingerprinting of Soybean Extracts," with Emphasis on Identification and Quantification of Isoflavones, *Nutrients*, 2, 280-289, 2010.
- [36] Anna Witek-Krowiak, Daria Podstawczyk, Katarzyna Chojnacka, Anna Dawiec, Krzysztof Marycz, Modelling and optimization of chromium(III) biosorption on soybean meal, *Cent. Eur. J. Chem.* 11 (2013) 1505-1517.
- [37] F. Dika Octa Riswanto, A. Rohman, S. Pramono, S. Martono, "The employment of UV-Vis spectroscopy and chemometrics techniques for analyzing the combination of genistein and curcumin," *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 11, 154-161, 2021.
- [38] L.C. E. da Silva, A. Cassago, L.C. Battirola, M.d. Carmo Gonçalves, R. V. Portugal, "Specimen preparation optimization for size and morphology characterization of nanocellulose by TEM," *Cellulose* volume 27, 5435-5444, 2020.
- [39] Z.H. Chen, F. Yu, X.R. Zeng, Z.G. Zhang, "Preparation, characterization and thermal properties of nanocapsules containing phase change material n-dodecanol by miniemulsion polymerization with polymerizable emulsifier," *Applied Energy*, 91, 7-12, 2012.
- [25] S.C. Tang, Y.P. Hsiao, J.L. Ko, "Genistein protects against ultraviolet B-induced wrinkling and photoinflammation in in vitro and in vivo models," *Genes & Nutrition*, 17(1), 4, 2022.
- [26] N. Devi, M. Sarmah, B. Khatun, T.K. Maji, "Encapsulation of active ingredients in polysaccharide-protein complex coacervates," *Adv Colloid Interface Sci*, 239, 136-145, 2017.
- [27] A. Zarepour, A. Zarrabi, K.L. Larsen, "Fabricating β -cyclodextrin based pH-responsive nanotheranostics as a programmable polymeric nanocapsule for simultaneous diagnosis and therapy," *International Journal of Nanomedicine*, 14, 7017-7038, 2019.
- [28] A. Ghorani, A. Alehosseini, N. Tucker, "Nanocapsule formation by electrospinning," *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*, 264-319, 2017.
- [29] S.M. Jafari, "An overview of nanoencapsulation techniques and their classification," *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*, 1-34, 2017.
- [30] K.E. Penton, Z. Kinler, A. Davis, J.A. Spiva, S. K. Hamilton, "Electrospinning Drug-Loaded Alginate-Based Nanofibers towards Developing a Drug Release Rate Catalog," *Polymers*, 14, 2773, 2022.
- [31] A. Luraghi, F. Peri, L. Moroni, "Electrospinning for drug delivery applications: A review," *Journal of Controlled Release*, 334 (2021) 463-484.
- [32] M. Butler, "Animal Cell Culture and Technology," 2nd ed. UK: Routledge, 2003.

- [40] S. Esmailneia, R. Amiri Dehkharghani, S. Zamanlui Benisi, “Architecture of a dual biocompatible platform to immobilize genistin: Fabrication with physio-chemical and in vitro evaluation,” *Sci Rep*, 13, 22439, 2023.
- [41] F. Croisier, A.-S. Duwez, C. Jérôme, A.F. Léonard, K.O. van der Werf, P.J. Dijkstra, M.L. Bennink, “Mechanical testing of electrospun PCL fibers,” *Acta Biomaterialia*, 8, 218-224, 2012.
- [42] E.P.S. Tan, S.Y. Ng, C.T. Lim, “Tensile testing of a single ultrafine polymeric fiber,” *Biomaterials*, 26, 1453-1456, 2005.
- [43] S. Mahmood, S. H. Almurisi, K. AL-Japairai, A. Rebhi Hilles, W. Alelwani, A.M. Bannunah, F. Alshammari, F. Alheibshy, “Ibuprofen-Loaded Chitosan–Lipid Nanoconjugate Hydrogel with Gum Arabic: Green Synthesis, Characterisation,” *In Vitro Kinetics Mechanistic Release Study and PGE2 Production Test, Gels*, 7(254), 2021.
- [44] A. Radtke, A. Topolski, T. Jędrzejewski, W. Kozak, B. Sadowska, M. Więckowska-Szakiel, P. Piszczek, “Bioactivity Studies on Titania Coatings and the Estimation of Their Usefulness in the Modification of Implant Surfaces,” *Nanomaterials*, 7(90), 2017.
- [45] Y. Dorri Nokoarani, A. Shamloo, M. Bahadoran, H.Moravvej, “Fabrication and characterization of scaffolds containing diferent amounts of allantoin for skin tissue engineering,” *Scientific Reports*, 11, 16164, 2021.



Non-toxic Polycaprolactone Colloidal to Nanoencapsulation of Genistin through Coacervation Method and Electrospinning in Hydrophilic Scaffold

S. Esmailneia¹, R. Amiri Dehkharghani^{*2}, S. Zamanlui Benisi³

1. Department of Chemistry, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Chemistry, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3. Tissue Engineering and Regenerative Medicine Institute, Stem Cell Research Center, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract: In this study, biocompatible scaffolds containing plant-derived active compounds were designed for tissue engineering applications in medicine, aiming to improve cell proliferation and behavior under laboratory conditions. In this regard, genistein was extracted from soybean residue and nanoencapsulated using polycaprolactone (PCL) via the coacervation method. Finally, biocompatible nanofibers composed of gelatin (GE) and polyvinyl alcohol (PVA) were synthesized by electrospinning, incorporating genistein nanoparticles. Experiments were conducted using high-performance liquid chromatography (HPLC), UV-Vis spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and mechanical testing. The biological effects and cell viability on genistein-loaded scaffolds were assessed using the MTT assay. The synthesized sample exhibited non-toxicity and significant adhesion to L929 cell line. In conclusion, the described biocompatible system could serve as an intelligent drug delivery tool for tissue engineering applications in laboratory settings.

Keywords: Polycaprolactone, Genistein, Nanocapsules, Electrospinning, Coacervation, L929 cell line