

## Production of Electrospun Nanofibrous Membranes from Polycaprolactone Loaded with Bromelain and Investigating Its Application to Prevent Abdominal Adhesion after Surgery

Mahvash Shokrollahi<sup>1,2</sup>, Seyed Hajir Bahrami<sup>2\*</sup>, Masoumeh Haghbin Nazarpak<sup>3\*</sup>, and Atefeh Solouk<sup>4</sup>

1. Nanotechnology Institute, 2. School of Materials and Advanced Processing, Textile Engineering Department, 3. New Technologies Research Center (NTRC), and 4. Biomedical Engineering Department; Amirkabir University of Technology, P.O. Box 15875-4413, Tehran, Iran

Received: 17 August 2020, Accepted: 8 January 2021

### Abstract

The present study focuses on the development of biodegradable nanofibrous membranes with controlled drug release to ensure reduced tissue adhesion after surgery. The nanofibrous polycaprolactone membranes loaded with bromelain, a crude extract from pineapple, were fabricated utilizing the electrospinning technique for the first time. Smooth, continuous and bead-free nanofibers with good compatibility between PCL and bromelain were observed by SEM. The prepared nanofibrous membranes showed satisfactory tensile strength ( $16.08 \pm 1.3$  and  $18.29 \pm 3.29$  MPa) and high Young's modulus ( $30.37 \pm 4.85$  and  $51.73 \pm 4.01$  MPa). Furthermore, the contact angle decreased significantly with increasing bromelain content, which can help to overcome the limitation of PCL use in anti-adhesion products due to its stiffness and hydrophobicity. The results indicated that the membrane containing bromelain extract showed a sustained release of bromelain during two weeks, which was significantly controlled by the Fickian-diffusion mechanism. Moreover, adipose-derived mesenchymal stem cells (AdMSCs) culture experiments showed that bromelain-loaded PCL nanofibrous membrane could significantly reduce the adhesion and proliferation of AdMSCs. Moreover, AdMSCs that adhered to the surface of nanofibers possessed a rounded morphology. Overall, the PCL/bromelain electrospun membrane can provide a potential anti-adhesion barrier for clinical use.

**Keywords:** anti-adhesion barrier, electrospun nanofibrous membrane, polycaprolactone, bromelain

(\* ) To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: hajirb@aut.ac.ir and haghbin@aut.ac.ir

## ساخت غشاهای نانولیفی الکتروریسی شده از پلی کاپرولاکتون بارگذاری شده با بروملین و بررسی استفاده از آن‌ها برای جلوگیری از چسبندگی شکمی پس از جراحی

مهوش شکراللهی<sup>۱</sup>، سید هژیر بهرامی<sup>۲\*</sup>، معصومه حق‌بین نازاریک<sup>۳</sup>، عاطفه سلوک<sup>۴</sup>

تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، صندوق پستی ۴۴۱۳-۱۵۸۷۵؛

۱- انستیتو نانو تکنولوژی؛ ۲- دانشکده مهندسی نساجی، مرکز تحقیقات مواد و فناوری‌های پیشرفته؛

۳- مرکز تحقیقاتی فناوری‌های نو و ۴- دانشکده مهندسی پزشکی

دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۷، پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۱۹

### چکیده

چسبیده به سطح نانوالیاف دارای ریخت‌شناسی گرد هستند. در مجموع، غشای الکتروریسی شده پلی کاپرولاکتون-بروملین می‌تواند به‌عنوان یک سد ضدچسبندگی برای کاربرد بالینی عمل کند.

**واژه‌های کلیدی:** سد ضدچسبندگی، غشای نانولیفی الکتروریسی شده، پلی کاپرولاکتون، بروملین

### ۱ مقدمه

چسبندگی بافت‌های بدن پس از عمل جراحی، پیامد نامطلوب و چالش بزرگی در عرصه‌های بالینی است. به‌خوبی ثابت شده است، تشکیل رشته‌های لیفی میان محل‌های آسیب‌دیده و بافت‌های مجاور در واکنش به تروما، ایسکمی، خون‌ریزی و اجسام خارجی به ایجاد چسبندگی بافت‌ها در بسیاری از بخش‌های بدن منجر می‌شود [۱-۳]. چسبندگی‌های بافتی معمولاً در جراحی‌های شکم، زنان و زایمان، ارتوپدی، قلب، گوش، حلق و بینی و چشم رخ می‌دهد [۱،۲]. برآورد شده است، بیش از ۹۰٪ بیماران که تحت عمل جراحی شکم قرار می‌گیرند، از مشکل چسبندگی رنج می‌برند [۴]. هرچند تمام بیماران مبتلا به چسبندگی داخل شکم علائم بالینی ندارند، اما مشکلاتی از قبیل انسداد روده (زودرس-

مطالعه حاضر، بر طراحی و ساخت غشاهای نانولیفی زیست‌تخریب‌پذیر با رهایش داروی کنترل‌شده به‌منظور کاهش چسبندگی بافت‌ها پس از عمل جراحی، متمرکز شده است. غشاهای برپایه نانوالیاف پلی کاپرولاکتون (PCL) بارگذاری شده با بروملین (عصاره خام میوه آناناس) با استفاده از روش الکتروریسی تهیه شد. سطح نانوالیاف صاف، یکنواخت و بی‌دانه با سازگاری خوب میان پلی کاپرولاکتون و بروملین با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مشاهده شد. غشاهای نانولیفی ساخته شده، استحکام کششی رضایت‌بخش ( $16/08 \pm 1/83$  MPa و  $18/29 \pm 3/15$  MPa) و مدول یانگ زیادی را ( $30/37 \pm 4/85$  MPa و  $51/73 \pm 4/01$  MPa) نشان دادند. افزون بر این، زاویه تماس به‌طور معنی‌داری با افزودن بروملین کاهش یافت که می‌تواند به برطرف کردن محدودیت‌های غشاهای برپایه پلی کاپرولاکتون ناشی از سفتی و آب‌گریزی، کمک کند. غشای حاوی عصاره بروملین، طی مدت ۱۴ روز رهایش آهسته بروملین را نشان داد که به‌طور چشمگیر با سازوکار نفوذ فیزیکی کنترل می‌شود. افزون بر این، ارزیابی کثرت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی (AdMSCs) نمایانگر آن بود که غشای نانوالیاف پلی کاپرولاکتون بارگذاری شده با بروملین، چسبندگی و تکثیر سلول‌های AdMSC را کاهش می‌دهد. همچنین، AdMSC

به‌عنوان ماده‌ای پایدار برای ممانعت از چسبندگی مناسب می‌سازد [۲]. افزون بر این، غشاهای نانولیفی که از انعطاف‌پذیری بیشتری برخوردارند، دارای قابلیت کاربرد آسان‌تری نسبت به فیلم‌های سدکننده تجاری هستند و بدون نیاز به بخیه به زخم‌ها متصل می‌شوند [۵]. در حال حاضر، نانوالیاف حامل دارو به‌عنوان مواد زیستی سدکننده، که به‌طور هم‌زمان قابلیت جداسازی محل‌های آسیب‌دیده از بافت‌های اطراف و رهایش داروی بارگذاری‌شده برای کمک به فرایند درمان را دارند، بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند [۴]. پلی‌کاپرولاکتون (PCL)، پلیمری زیست‌سازگار نیمه‌بلوری، آب‌گریز و خطی آلیفاتیک با دمای انتقال شیشه‌ای (°C ۶۰) است که با پلیمرشدن حلقه‌گشای مونومر کاپرولاکتون یا پلیمرشدن حلقه‌گشای رادیکال آزاد ۲-متیلن-۱-دی‌اکسپان تهیه می‌شود [۷]. خواص مکانیکی مناسب، پلی‌کاپرولاکتون را برای کاربردهایی نظیر رهایش دارو و ترمیم بافت مناسب می‌سازد [۳]. درحقیقت، پلی‌کاپرولاکتون به‌دلیل داشتن مزایایی از قبیل پایداری در شرایط محیطی، هزینه کم، دردسترس بودن در مقادیر زیاد و خواص مکانیکی خوب، قابلیت کاربرد به‌عنوان یک غشای پلیمری ضدچسبندگی را دارد [۸]. برخی مطالعات نشان داده‌اند، پلی‌کاپرولاکتون دارای خواص سدکنندگی است [۴،۹]. در مطالعه‌ای، فیلم پلی‌کاپرولاکتون، قابلیت ضدچسبندگی بیشتری در مقایسه با محصول تجاری سپرافیلیم (Seprafilm™) نشان داده است [۱۰]. با وجود این، کاربرد پلی‌کاپرولاکتون به‌عنوان غشاهای سدکننده به‌دلیل زیست‌فعالی کم، سختی و آب‌گریزی زیاد آن محدود است [۱۰]. از این رو، تلاش‌های متعددی برای اصلاح غشاهای نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون به‌منظور افزایش آب‌دوستی و نیز ترکیب مواد زیست‌فعال برای بهبود خواص ضدچسبندگی آن‌ها نظیر ترکیب پلی‌کاپرولاکتون با پلیمرهای آب‌دوست [۴،۱۱]، بارگذاری داروها و عصاره‌های گیاهی آب‌دوست درون نانوالیاف برپایه پلی‌کاپرولاکتون [۱۲] و عامل‌دار کردن سطح نانوالیاف آن [۴] انجام شده است.

Mao و همکاران، قابلیت غشای نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون عامل‌دارشده با کیتوسان را به‌عنوان یک سد ضدچسبندگی بررسی کردند. نتایج سلولی آن‌ها نشان داد، غشاهای پلی‌کاپرولاکتون عامل‌دارشده با کیتوسان موجب کاهش معنی‌دار چسبندگی و تکثیر فیبروبلاست‌ها و به‌طور هم‌زمان ارتقای رشد و تکثیر سلول‌های اندوتلیال برای ترمیم زخم جراحی می‌شود [۴]. آناناس (*Ananas comosus*) میوه‌ای گرمسیری است که به‌عنوان مکمل دارویی و غذایی در چند کشور مصرف می‌شود. آناناس حاوی

دیررس)، ناباروری، درد مزمن لگنی و نیاز به جراحی‌های مجدد برای رفع چسبندگی از معضلات عمده در جراحی‌های عمومی به‌شمار می‌رود [۱]. به‌طور کلی، چسبندگی بافت‌ها با عواملی نظیر واکنش التهابی، تکثیر سلولی، سنتز کلاژن و رشد عروق خونی ایجاد می‌شود. درحقیقت، تکثیر بیش از حد فیبروبلاست و سنتز کلاژن می‌تواند لایه متراکمی از بافت همبند تشکیل دهد که میان بافت‌ها و اندام اطراف قرار می‌گیرد. بنابراین، می‌توان با مهار سنتز کلاژن و تکثیر فیبروبلاست از بروز چسبندگی جلوگیری کرد [۵]. اولین عامل بازدارنده در برابر چسبندگی، اجرای صحیح فرایند جراحی است، اما این عامل به‌تنهایی نمی‌تواند کافی و مؤثر باشد. افزون بر این، عوامل دارویی کمکی نظیر داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی (NSAIDs)، کورتیکواستروئیدها، عوامل فیبرینولیتیک، ضدلخته‌های خون، آنتی‌بیوتیک‌ها، ضداسکندها، داروهای ضدسرطان، ویتامین‌ها و عوامل رشد برای ممانعت از مسیر چسبندگی یا تنظیم تعادل فیبرینولیز و رسوب فیبرین استفاده می‌شوند [۱]. با این حال، این عوامل به‌دلیل پاک‌شدن سریع از سامانه گردش خون، به‌تنهایی نمی‌توانند عامل مؤثری در جلوگیری از ایجاد چسبندگی باشند [۱،۶]. طی ۳۰ سال گذشته، پلیمرهای زیست‌سازگار به‌عنوان مواد زیستی سدکننده فیزیکی برای درمان و جلوگیری از چسبندگی، بسیار مورد توجه بوده‌اند. مواد زیستی سدکننده، می‌توانند به‌طور فیزیکی بافت‌ها-اندام را در هنگام التیام زخم جدا سازند، باعث مهار سنتز کلاژن شوند و در نتیجه مانع رشد فیبروبلاست و چسبندگی شوند [۱]. یک سدکننده ایده‌آل باید زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر باشد. همچنین، باید از استحکام مکانیکی خوبی برخوردار باشد، به‌طوری که به‌آسانی در عمل جراحی استفاده شود. افزون بر این، باید قابلیت ممانعت از تشکیل چسبندگی را بدون اثرگذاری بر التیام زخم داشته باشد [۵]. این مواد زیستی سدکننده، به‌طور معمول به اشکال مختلف ژل، هیدروژل، نانوالیاف و نانوصفحات هستند [۶]. نانوالیاف به‌وسیله روش‌های کشش، تولید از قالب، جدایش فاز، خودآرایی و الکتروریسی تولید می‌شوند. الکتروریسی، فرایند ساده و جذابی برای تولید غشاهای نانولیفی است. نانوالیاف تهیه‌شده به روش الکتروریسی، به‌دلیل داشتن خواص درخور توجهی نظیر تخلخل و مساحت سطحی زیاد و ساختار میکرومتخلخل، که سبب توقف عبور فیبروبلاست‌ها می‌شود و در عین حال اجازه عبور مواد مغذی را فراهم می‌سازد، برای کاربردهای ضدچسبندگی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند [۴]. در مقایسه با ژل‌ها، زمان لازم برای تخریب نانوالیاف الکتروریسی‌شده طولانی‌تر است که آن‌ها را

غشاهای، از آزمون کشت سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی برگرفته از بافت چربی (AdMSCs) روی غشاهای نانوالیاف پلی کاپرولاکتون خالص و بارگذاری شده با بروملین استفاده شد.

## ۲ تجربی

### ۲-۱ مواد

مواد استفاده شده در این پژوهش، شامل پلی کاپرولاکتون (وزن مولکولی ۸۰۰۰۰ Da، شرکت Sigma-Aldrich)، ماده مؤثر بروملین (شرکت دارویی بهتادارو)، استیک اسید (شرکت Merck آلمان) و قرص بافر فسفات سالین (PBS) (شرکت Medicago آلمان) است.

### ۲-۲ روش‌ها

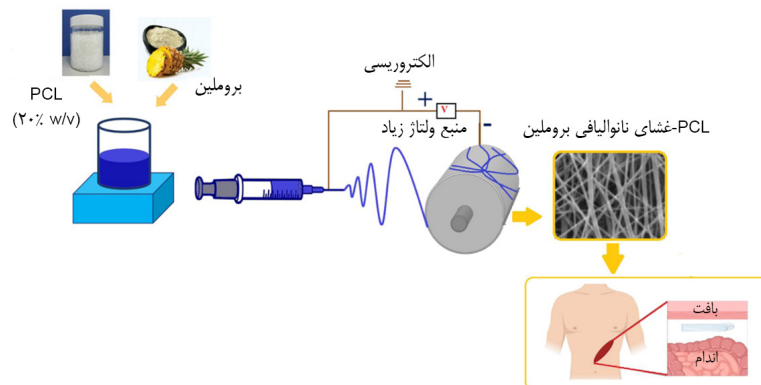
#### ۲-۲-۱ تهیه غشاهای نانوالیاف سدکننده ضدچسبندگی

گام نخست در تهیه غشاهای نانوالیاف سدکننده برپایه پلی کاپرولاکتون، آماده‌سازی محلول پلی کاپرولاکتون و یافتن پارامترهای بهینه به منظور تولید لیاف یکنواخت و بی‌دانه است. بدین ترتیب، محلول ۲۰٪ w/v پلی کاپرولاکتون با افزودن مقدار مشخصی گرانول پلی کاپرولاکتون درون حلال استیک اسید یخی (۹۰٪ v/v (glacial) تهیه و به‌طور پیوسته به مدت ۶ h در دمای محیط با همزن مغناطیسی به‌طور آهسته هم‌زده شد. پس از آماده‌سازی، محلول به درون سرنگ پلاستیکی متصل به یک سوزن (۲۲ G) منتقل شد و غشاها با استفاده از دستگاه الکترورسی تهیه شدند. الکترورسی بهینه در شرایط نرخ تغذیه ۰/۲ mL/h، ولتاژ ۱۵ kW و فاصله ۱۸ cm انجام شد. نانوالیاف روی سطح جمع‌کننده استوانه‌ای (۱۰۰ rpm/min) جمع‌آوری شدند که در فاصله ۱۸ cm از نوک سوزن قرار گرفته بود. سرانجام، غشاها به مدت ۲۴ h در

فیتونوترینت‌ها، ویتامین C و ترکیبی به نام بروملین است. بروملین، عصاره خام آناناس، مسئول اثرهای درمانی سودمند این میوه است. بروملین شامل ترکیبات مختلف از قبیل آنزیم‌های پروتئولیتیک، پروتئاز، فسفاتاز، پراکسیداز، سلولاز اندوپیتیداز، گلیکوپروتئیناز و کربوهیدرات است.

مطالعات انسانی و حیوانی نشانگر اثرهای بروملین در کاهش درد، بهبود زخم و نیز بر خورداری از خواص فیبرینولیتیک، ضدانعقادی و ضدالتهابی است. افزون بر این، بروملین به دلیل اثرهایی نظیر خواص ضدالتهابی، فیبرینولیتیک و ضدآکسندگی می‌تواند در ممانعت از تشکیل چسبندگی مؤثر باشد [۱۳]. همچنین بروملین در خارج کردن بافت‌های نکروتیک، درمان زخم‌های مختلف [۱۴] و شرایط التهابی اثرهای مطلوبی ایجاد می‌کند [۱۳].

Sahbaz و همکاران، بروملین را به‌عنوان عامل جدیدی برای ممانعت از چسبندگی‌های درون‌شکمی بررسی کردند. آن‌ها دریافتند، تزریق بروملین به‌طور درون‌صفافی، تشکیل چسبندگی را به‌طور چشمگیری کاهش می‌دهد [۱۲]. هدف از پژوهش حاضر، تهیه و ارزیابی غشاهای نانوالیاف پلی کاپرولاکتون-بروملین الکترورسی شده به‌عنوان سدهای فیزیکی در برابر چسبندگی‌های شکمی ناشی از جراحی است. در این پژوهش سعی شده است تا برای نخستین بار از خواص درمانی بروملین نظیر خواص ضدالتهابی، ضدآکسندگی و فیبرینولیتیک و نیز خواص مکانیکی و قابلیت تهیه نانوالیاف مناسب برپایه پلی کاپرولاکتون در تهیه غشاهای سدکننده ضدچسبندگی به روش الکترورسی استفاده شود. در ادامه، غشاهای نانوالیاف پلی کاپرولاکتون-بروملین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و طیف‌سنجی تبدیل فوریه زیرقرمز (FTIR) ارزیابی شدند. افزون بر این، خواص سطحی و مکانیکی، قابلیت رهایش بروملین و سازوکارهای رهایش دارو نیز بررسی شدند. در ادامه، به‌منظور بررسی خواص ضدچسبندگی



شکل ۱- نمایشی از مراحل تهیه نانوالیاف پلی کاپرولاکتون-بروملین (PCL/bromelain) به روش الکترورسی.

گرمخانه خلأ در دمای °C ۳۷ قرار گرفتند تا حلال کاملاً تبخیر شود. پس از تعیین محلول بهینه پلی کاپرولاکتون و نیز شرایط مناسب الکتروریسی، مقدار مشخصی از بروملین (۰ و ۳٪ wt) براساس وزن پلیمر) به آن اضافه شد. برای دستیابی به محلولی همگن به مدت ۱ h روی همزن مغناطیسی تحت هم زدن آهسته قرار گرفت. در ادامه، الکتروریسی با استفاده از شرایط یکسان تعیین شده در مرحله قبل، انجام شد. شکل ۱، نمایی از مراحل تهیه نانوالیاف الکتروریسی شده را نشان می دهد. همچنین، به منظور اندازه گیری گرانروی محلول های پلیمری با بروملین و بدون آن از گرانروی سنج Brookfield مدل DV-II+Pro ساخت کشور آمریکا استفاده شد.

#### ۲-۲-۵ تعیین خواص مکانیکی

به منظور بررسی خواص مکانیکی غشاهای سدکننده، از آزمون کشش تک محور استفاده شد. پیش از کشش، ضخامت نمونه ها با ضخامت سنج تعیین شد. نمونه ها با قاب کاغذی و با ابعاد (۳۰ mm × ۵ mm) در دستگاه کشش تک محور (Instron 5566, UK) با سلول بارگذاری ۱۰ N و نرخ کرنش ۵ mm/min تا پارگی آزمون شدند. برای هر نمونه، اندازه گیری ها ۵ بار تکرار انجام شد.

#### ۲-۲-۶ بررسی رهایش بروملین و سازوکارهای آن

برای مطالعه رهایش بروملین در ابتدا منحنی کالیبره کردن آن ترسیم شد. بدین منظور، محلول های نمک بافر فسفات (pH=۷/۴) حاوی غلظت های مختلف از بروملین تهیه شد. مقدار جذب دارو در  $\lambda_{max}=280$  nm با دستگاه طیف سنجی (Shimadzu, Japan) UV-visible تعیین و نمودار استاندارد مقدار جذب برحسب تابعی از غلظت بروملین رسم شد. به منظور بررسی مقدار داروی آزاد شده از غشای نانوالیاف حاوی بروملین، وزن معینی از غشاهای نانوالیاف درون ظرف شیشه ای حاوی ۴ mL محلول نمک بافر فسفات غوطه ور شدند و سپس درون انکوباتور با دمای °C ۳۷ قرار گرفتند. این کار برای هر نمونه با سه بار تکرار انجام شد. در زمان های مشخص، مقدار معینی از محلول داخل شیشه ها به مخزن دستگاه UV-visible انتقال داده و بلافاصله با مقدار یکسانی از محلول نمک بافر فسفات تازه جایگزین شد. پس از اندازه گیری مقدار جذب با دستگاه UV-visible، مقدار جذب به دست آمده با استفاده از نمودار غلظت استاندارد به مقدار غلظت تبدیل و مقدار داروی میانگین حاصل، از تکرار اندازه گیری رهایش آن ها محاسبه شد. سپس، نمودار رهایش تجمعی داروی بروملین برحسب تابعی از دوره نهفتگی (incubation period) رسم شد. درصد بروملین رهایش یافته براساس وزن اولیه بروملین قرار گرفته درون غشای نانوالیاف، محاسبه شد. نتایج برحسب رهایش تجمعی است که مطابق با معادله رهایش زیر تعیین می شود:

$$E_r(\%) = \frac{V_0 \times C_n + V_r \times \sum_{i=1}^{n-1} C_i}{m_{total}} \times 100 \quad (1)$$

در این معادله،  $m_{total}$  محتوای کل بروملین کپسولی شده درون

#### ۲-۲-۲ میکروسکوپی الکترونی روبشی (SEM)

برای بررسی یکنواختی، عدم وجود دانه در نانوالیاف، اندازه گیری میانگین قطر نانوالیاف و بررسی ساختار سلول های کشت شده روی غشاهای پلی کاپرولاکتون و پلی کاپرولاکتون-بروملین پس از پوشش دهی با طلا (005-Sputter coater SCD) به مدت ۶۰ s (با ضخامت پوشش طلای تقریبی ۵ nm)، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (XL30, Philips, Netherlands) استفاده شد.

نرم افزار Digimizer به منظور اندازه گیری قطر متوسط نانوالیاف استفاده شد. همچنین، اندازه منافذ نانوالیاف با نرم افزار Image J اندازه گیری شد.

#### ۲-۲-۳ آزمون طیف سنجی زیرقرمز تبدیل فوری (FTIR)

به منظور بررسی ساختار شیمیایی بروملین، پلیمر و همچنین بررسی برهم کنش های احتمالی مواد با یکدیگر از آزمون طیف سنجی زیرقرمز (مدل Nicolet Nexus 670) در محدوده  $4000-400$  cm<sup>-1</sup> استفاده شد.

#### ۲-۲-۴ تعیین زاویه تماس

از آنجا که میزان ماهیت آب دوستی-آب گریزی غشاهای نقش بسزایی در برهم کنش سلول ها و غشا (چسبندگی و رشد سلول ها و پروتئین ها) و نیز تعیین سازوکار رهایش دارو ایفا می کند، آب دوستی سطح غشاهای نانوالیاف دارای (۰ و ۳٪ wt) بروملین با استفاده از آزمون اندازه گیری زاویه تماس قطره آب با سطح نمونه ها در حالت پایا بررسی شد. بدین منظور، نمونه های ۲×۲ cm<sup>2</sup> از غشاهای تهیه و روی یک پایه نگه دارنده قرار داده شدند. قطره های آب (به حجم ۱۰ μL) با میکروسرنج در سه نقطه مجزا روی سطح هر یک از نمونه ها قرار گرفتند و به وسیله سامانه مجهز به یک دوربین

ابتدا با بافر فسفات سترون شست و شو داده شدند. در مرحله بعد، به مدت ۱ h در معرض تابش فرابنفش قرار گرفتند. در نهایت، نمونه‌ها به مدت ۲۴ h در محیط کشت قرار داده شدند. پس از قراردادن درون چاهک‌های پلیت، با استفاده از یک پیپت به هر چاهک، تعلیقی با تراکم سلولی  $15000 \text{ cell/cm}^2$  افزوده شد. پس از چند ساعت زمان‌دهی برای ایجاد چسبندگی اولیه سلولی، مقدار بیشتری از محیط کشت به هر چاهک افزوده شد. نمونه‌ها پس از نگهداری و گذشت زمان ۲۴ h درون انکوباتور ارزیابی شدند. بدین منظور، نمونه‌های دارای سلول با گلو تار آلدئید ۲/۵٪ تثبیت شده و سپس با قرارگیری در اتانول ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰٪ به‌طور متوالی آب‌زدایی شدند. در نهایت، نمونه‌ها در شرایط محیط خشک شده و برای مشاهده به‌وسیله SEM با طلا پوشش‌دهی شدند.

### ۲-۸ آنالیز آماری

به‌منظور بررسی تفاوت معنی‌دار داده‌های به‌دست‌آمده از آزمون آماری تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) و آزمون T (student's t-test) در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد.  $P < 0.05$  نشانگر اختلاف معنادار نمونه‌ها بوده و  $P \leq 0.05$  عدم معنادار بودن این اختلاف را گزارش می‌کند. نتایج به‌صورت مقدار میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شد.

### ۳ نتایج و بحث

#### ۳-۱ ریخت‌شناسی نانوالیاف

الکترورسی روش ساده و جذابی برای تولید الیافی با قطر کم در محدوده نانو تا میکرومتر است. غشاهای تهیه‌شده به روش الکترورسی با داشتن ساختاری در مقیاس نانو-میکرومتر، مساحت سطحی و تخلخل زیاد، گزینه بسیار مناسبی برای استفاده به‌عنوان سد فیزیکی در برابر نفوذ فیبروبلاست‌ها از بافت‌های اطراف، بدون ممانعت از انتقال مواد مغذی و مواد زائد هستند [۱۶]. افزون بر این، استفاده موضعی نانوالیاف حامل دارو می‌تواند غلظت مؤثری از دارو را در ناحیه مدنظر فراهم سازد و اثرهای جانبی رهایش سامانمند دارو را کاهش دهد [۱۷]. به‌منظور تولید نانوالیافی صاف و بی‌دانه، پارامترهای مختلف نظیر غلظت محلول‌های پلیمری پلی کاپرولاکتون، ولتاژ اعمال‌شده، فاصله سوزن تا جمع‌کننده و نرخ جریان محلول پلیمری بررسی شد. این پارامترها، با استفاده از شرایط بهینه، شامل ولتاژ ۱۵ kW، نرخ جریان محلول پلیمری

غشای نانوالیاف،  $V_0$  حجم محیط رهایش و  $V_r$  حجم نمونه را نشان می‌دهد. افزون بر این،  $C_n$  غلظت بروملین در نمونه است [۱۴]. بررسی سینتیک آزادسازی داروی بروملین از غشا براساس چهار مدل درجه صفر (zero order)، درجه اول (first order)، هیگوجی (Higuchi) و کورسمیر-پپاس (Korsmeyer-Peppas) انجام گرفت. نتایج حاصل از مدل‌های مزبور پردازش شده و براساس ضریب هم‌بستگی ( $R^2$ ) ارزیابی شد.

$$M_0 - M_t = K_0 t \quad (۲) \text{ مدل درجه صفر}$$

$$\log(100 - M_t) = \text{Log}100 - \frac{K_1}{2.303} t \quad (۳) \text{ مدل درجه یک}$$

$$M_t = k_{HC} (t^{1/2}) \quad (۴) \text{ مدل هیگوجی}$$

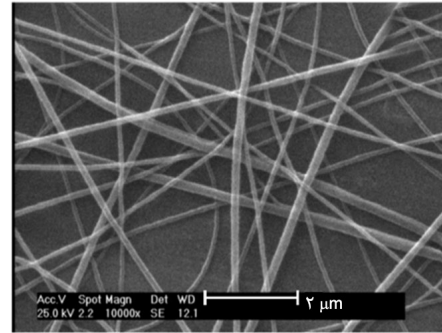
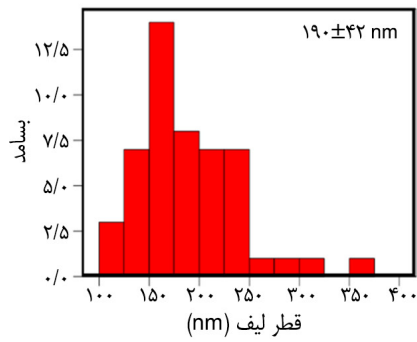
$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} \cdot t_n \quad (۵) \text{ مدل کورسمیر-پپاس}$$

در این معادلات،  $M_t$  غلظت داروی رهایش‌یافته در زمان  $t$  و  $M_0$  غلظت اولیه دارو در محلول را نشان می‌دهد.  $K_1$ ،  $K_0$  و  $k_{HC}$  ثابت‌های سرعت دارو برای مدل‌های سینتیکی درجه صفر، درجه اول و هیگوجی هستند.  $M_t/M_\infty$  کسر داروی آزادشده در زمان  $t$ ، ثابت سرعت دارو و  $n$  ضریب رهایش را نشان می‌دهند [۱۵].

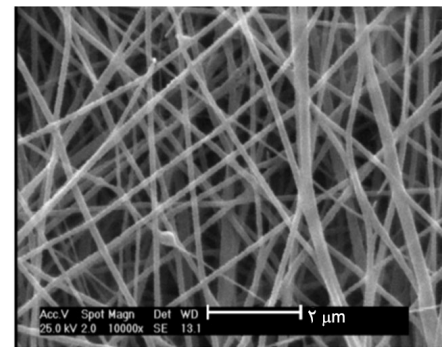
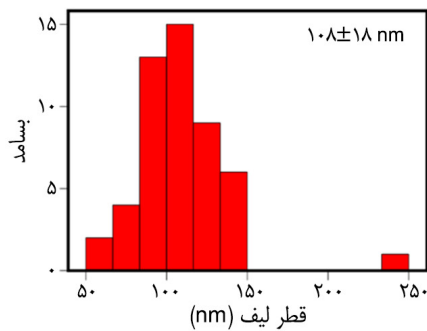
#### ۳-۲-۷ آزمون کشت سلولی

آزمون کشت سلولی در دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شد. ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی (AdMSCs) در فلاسک‌های کشت سلول به‌همراه محیط کشت DMEM حاوی ۷/۷٪ سرم جنینی گاوی و ۱٪ پنی‌سیلین-استرپتومایسین پاساژ داده شدند. سپس، سلول‌ها در انکوباتور تحت رشد قرار گرفتند. زمانی که ۸۰٪ تا ۹۰٪ فلاسک سلولی پر شد، سلول‌ها با آنزیم تریپسین از سطح فلاسک جدا و محیط کشت جدید حاوی سرم با آن‌ها ترکیب شد. تعلیق حاصل به‌مدت ۵ min و در ۱۴۰۰ rpm/min در دستگاه مرکزگریز قرار گرفت. پس از تخلیه، محیط رویی با محیط کشت جدید ترکیب و پیپتاژ شد تا سلول‌ها در محیط کشت معلق شوند.

تعلیق‌های سلولی تهیه‌شده به داخل فلاسک‌ها انتقال یافتند و درون انکوباتور نگهداری شدند. به‌منظور بررسی چسبندگی و شکل سلول، غشاهای نانوالیاف پلی کاپرولاکتون و پلی کاپرولاکتون-بروملین، پس از پایدارسازی سترون شدند. بدین منظور، نمونه‌ها



(الف)



(ب)

شکل ۲- تصاویر SEM نانوالیاف: (الف) پلی کاپرولاکتون و (ب) پلی کاپرولاکتون-بروملین (۳٪ wt).

در جدول ۱، مقادیر گرانیوی محلول‌های پلی‌کاپرولاکتون با و بدون بروملین نشان داده شده است. افزایش بروملین موجب کاهش گرانیوی محلول شده است. به‌طور کلی، داروی کپسولی شده ممکن است با برهم‌زدن درگیری زنجیره‌های پلیمری و تغییر گرانیوی محلول، بر قطر الیاف حاصل اثر بگذارد. هنگام الکتروریسی، جت برای مقابله با نیروی ناشی از میدان الکتریکی تحت کشش قرار می‌گیرد. این موضوع سبب می‌شود تا مولکول‌ها با یکدیگر هم‌پوشانی کرده و به اندازه کافی با یکدیگر درگیر شوند. درگیری بحرانی زنجیره‌ها، Ce، نقطه‌ای بوده که در آن هم‌پوشانی زنجیره‌ها برای تشکیل یک لیف، مطلوب است. وجود دارو ممکن است، تماس بین زنجیره‌های روی هم قرارگرفته را قطع کند و گرانیوی محلول را کاهش دهد. محلولی با گرانیوی کمتر به خروج جتی باریک‌تر از مخروط تیلور منجر شده و در نتیجه الیافی با قطر

۰/۲ mL/h و فاصله سوزن تا جمع‌کننده ۱۸ cm حاصل شد. ریخت‌شناسی نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون با و بدون بروملین ۳٪ wt به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی به‌همراه توزیع قطر آن‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون، به‌شکل شبکه به‌هم پیوسته، صاف و بی‌دانه با قطر متوسط  $190 \text{ nm} \pm 42 \text{ nm}$  هستند. با افزودن بروملین، قطر نانوالیاف به‌طور معنی‌داری به  $108 \text{ nm} \pm 18 \text{ nm}$  کاهش یافت. همچنین، افزودن بروملین موجب تولید نانوالیافی یکنواخت‌تر با توزیع قطر باریک شد. بارگذاری دارو درون محلول الکتروریسی موجب تولید الیافی با خواص فیزیکی متفاوت می‌شود. افزودن دارو ممکن است بر گرانیوی، کشش سطحی و رسانندگی الکتریکی محلول (پارامترهای مؤثر بر ریخت‌شناسی نانوالیاف الکتروریسی‌شده) اثر بگذارد [۱۸].

جدول ۱- مقادیر گرانیوی محلول، تنش کششی، کرنش کششی و مدول یانگ غشاهای نانوالیاف PCL و PCL-بروملین.

نمونه	گرانیوی محلول (cP)	تنش کششی (MPa)	ازدیاد طول تا پارگی (%)	مدول یانگ (MPa)
غشای نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون	۸۰۵	$16/08 \pm 1/13$	$79 \pm 4/90$	$30/37 \pm 4/85$
غشای نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون-بروملین	۴۲۲	$18/29 \pm 3/15$	$58 \pm 11/00$	$51/73 \pm 4/01$

در ناحیه  $3500-3000 \text{ cm}^{-1}$  ( $3312$ ) متناظر با ارتعاش کششی ناشی از وجود گروه‌های OH است. پیک‌های FTIR مربوط به پلی کاپرولاکتون در  $2946$  و  $2867 \text{ cm}^{-1}$  به دلیل ارتعاشات کششی  $\text{CH}_2$ ،  $1728 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات کششی  $\text{C=O}$ ،  $1239$  و  $1173 \text{ cm}^{-1}$  متناظر با ارتعاش کششی  $\text{C-O-C}$  و  $1294 \text{ cm}^{-1}$  به دلیل کشش گروه‌های  $\text{C-O}$  و  $\text{C-C}$  ظاهر شده‌اند. پیک‌های ناحیه  $1367$ ،  $1407$  و  $1465 \text{ cm}^{-1}$  نیز ارتعاشات پیوند  $\text{CH}_2$  را نشان می‌دهند. پیک‌های قابل مشاهده در  $1106$ ،  $1047$  و  $1465 \text{ cm}^{-1}$  به دلیل ارتعاشات  $\text{O-C}$  هستند [۲۱]. طیف FTIR مربوط به غشای نانولیفی پلی کاپرولاکتون-بروملین تمام پیک‌های شاخص پلی کاپرولاکتون و برمیلین را نشان می‌دهد که وجود موفق برمیلین را درون نانولیف تأیید می‌کند.

### ۳-۳ خواص مکانیکی

پایداری مکانیکی غشاهای نانولیفی، ویژگی مهمی برای کاربردهای زیست‌پزشکی و ایجاد سد ضدچسبندگی است. خواص مکانیکی غشاهای نانولیفی، مانند مدول یانگ، استحکام کششی و ازدیاد طول تا پارگی در شکل ۴-الف و جدول ۱ نشان داده شده است. تمام غشاهای پلی کاپرولاکتون (با و بدون برمیلین) دارای استحکام کششی در محدوده  $16/08 \text{ MPa} \pm 1/83 \text{ MPa}$  تا  $18/29 \text{ MPa} \pm 3/15 \text{ MPa}$  بوده و مدول یانگ آن‌ها در محدوده  $51/4 \text{ MPa} \pm 73/01 \text{ MPa}$  تا  $30/37 \text{ MPa} \pm 4/85 \text{ MPa}$  بوده است. استحکام کششی غشاها با افزودن برمیلین به‌طور آهسته ( $P > 0/05$ ) افزایش یافت. درحقیقت، برمیلین اثر کمی بر خواص مکانیکی غشاها دارد و این اثر می‌تواند به دلیل کاهش قطر نانولیف در اثر افزودن برمیلین باشد. Brennan و همکاران نشان دادند، استحکام نانولیف با کاهش قطر آن‌ها افزایش می‌یابد. همچنین آن‌ها گزارش دادند، قطر کوچک‌تر الیف با کاهش حجم کلی نانولیف منجر می‌شود. این امر موجب افزایش آرایش مولکولی یا ساختارهای بلوری می‌شود. بنابراین، الیف کمتر مستعد عیوب و ترک می‌شوند [۲۲]. افزون بر این، مدول یانگ با افزودن برمیلین به‌طور معناداری افزایش یافت، در حالی که مقدار ازدیاد طول تا پارگی از  $79\% \pm 4/90\%$  به  $58\% \pm 11/00\%$  کاهش یافت.

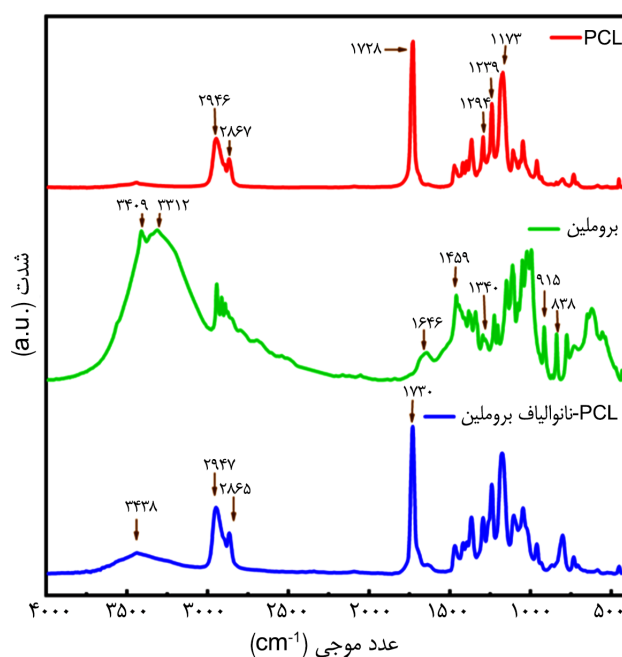
### ۴-۳ زاویه تماس

ماهیت آب‌دوستی یا آب‌گریزی غشاها یکی از مهم‌ترین عوامل چسبندگی، رشد و تکثیر سلولی است. شکل ۴-ب، نتایج زاویه تماس غشاهای نانولیف پلی کاپرولاکتون حاوی درصد‌های مختلف (۰ و ۳٪ wt) برمیلین را نشان می‌دهد. اندازه زاویه تماس

کوچک‌تر حاصل می‌شود [۱۸]. همچنین، یوسفی و همکاران نشان دادند، افزودن عصاره حنا به محلول کیتوسان-پلی‌اتیلن اکسید موجب کاهش قطر نانولیف می‌شود [۱۹]. این گزارش با نتایج حاصل از بارگذاری برمیلین در مطالعه حاضر مطابقت دارد. افزون بر این، غشای نانولیف پلی کاپرولاکتون دارای متوسط اندازه حفره‌های  $93/0 \mu\text{m} \pm 03/2 \mu\text{m}$  و غشای پلی کاپرولاکتون-برومیلین دارای متوسط اندازه حفره‌های  $1/95 \mu\text{m} \pm 0/42 \mu\text{m}$  هستند. حفره‌های با این اندازه با جلوگیری از عبور فیبروبلاست‌ها (با اندازه قطر  $8 \mu\text{m}$ ) که موجب ایجاد چسبندگی می‌شوند، سبب نفوذ عوامل رشد می‌شوند.

### ۲-۳ طیف سنجی FTIR

شکل ۳ طیف‌های FTIR پودر برمیلین، غشاهای نانولیف پلی کاپرولاکتون و پلی کاپرولاکتون-برومیلین را نشان می‌دهد. پیک‌های شاخص برمیلین در ناحیه  $3409 \text{ cm}^{-1}$  (ارتعاشات کششی N-H آمید ثانویه)،  $2890$ ،  $2913$  و  $2943 \text{ cm}^{-1}$  (ارتعاشات کششی متقارن و نامتقارن C-H)،  $1646 \text{ cm}^{-1}$  (کشش  $\text{C=O}$  گروه آمید)،  $1340 \text{ cm}^{-1}$  (کشش متقارن N-O)،  $1459 \text{ cm}^{-1}$  (کشش C-N آمید اولیه)،  $915$  و  $838 \text{ cm}^{-1}$  (خمش C-H خارج از صفحه‌ای تیروزین یا تریپتوفان) و  $741 \text{ cm}^{-1}$  (ارتعاش جنبانه‌ای N-H خارج از صفحه‌ای آمید) قرار گرفته‌اند [۲۰]. همچنین، پیک قابل مشاهده



شکل ۳- منحنی‌های طیف FTIR پودر برمیلین، نانولیف پلی کاپرولاکتون و پلی کاپرولاکتون-برومیلین.

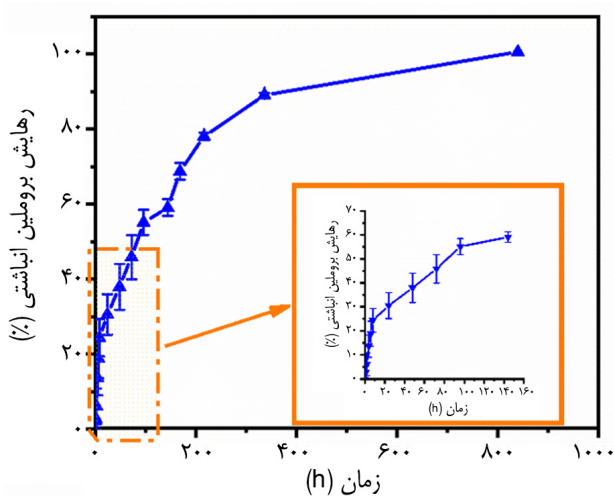


پلی کاپرولاکتون-بروملین با یک سطح به طور متوسط آب دوست، می تواند غشای مناسبی در ممانعت از تشکیل چسبندگی در این مطالعه باشد.

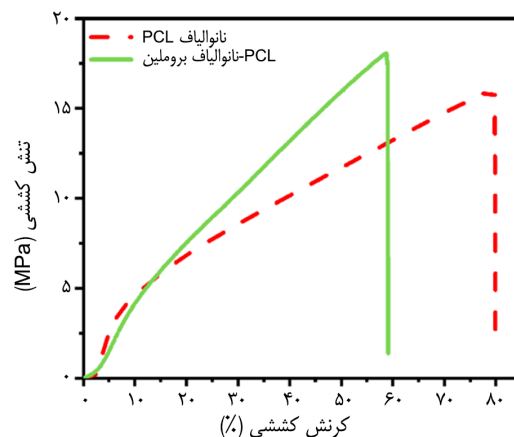
### ۳-۵ بررسی رفتار رهایش بروملین از غشای نانوالیاف سدکننده

هنگامی که بافت سرروزی آسیب می بیند، ابتدا خون منعقد می شود (تشکیل لخته) و شبکه های فیبرینی داربستی در لخته خون برای ترمیم معمول زخم یا چسبندگی نامطلوب بافت فراهم می سازد. سلول های التهابی (عمدتاً ماکروفاژها) موجود در رگ های خونی، سیال صفقایی و بافت های اطراف به تدریج درون شبکه های فیبرینی نفوذ می کنند و سطح جراحت دیده طی مدت دو روز پس از آسیب، به طور کامل با سلول های التهابی و فیروبلاستها پوشیده می شود. سپس، سلول های مزوتلیال بالغ و اولیه در درون و بیرون زخم طی مدت سه روز ظاهر می شوند. در ادامه، سطح آسیب دیده با سلول های مزوتلیال تک لایه در مدت ۷ تا ۱۰ روز پوشیده می شود که التیامی کامل و بدون چسبندگی را فراهم می سازد [۱].

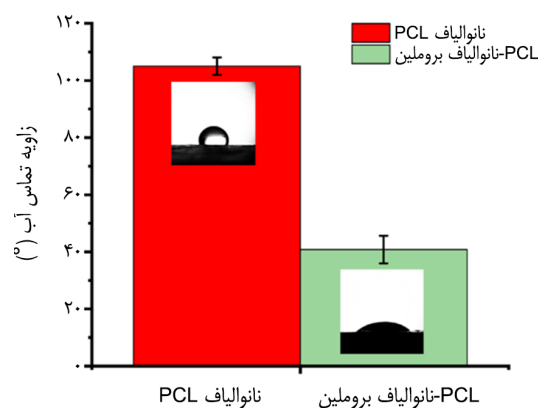
رهایش بروملین از غشای پلی کاپرولاکتون-بروملین در محلول نمک بافر فسفات (pH=۷/۴) در دمای ۳۷ °C به مدت ۱۴ روز بررسی شد. نتایج حاصل از بررسی نیم رخ رهایش تجمعی بروملین به عنوان تابعی از زمان نهفتگی در شکل ۵ مشاهده می شود. به طور کلی، منحنی رهایش غشای پلی کاپرولاکتون-بروملین، شامل رهایش انفجاری اولیه و به دنبال آن رهایش آهسته و تدریجی است. این غشا، رهایش انفجاری آهسته ای را طی ۸ h اول نشان می دهد، که برابر ۴۰٪ است. طی فرایند الکتروریسی، بخشی از دارو روی سطح



شکل ۵- منحنی رهایش های تجمعی و انفجاری بروملین طی مدت ۱۴ روز.



(الف)



(ب)

شکل ۴- نمودار: (الف) تنش-کرنش و (ب) زاویه تماس غشای نانوالیاف.

نانوالیاف پلی کاپرولاکتون،  $106 \pm 4^\circ$  بوده که به دلیل ماهیت آب گریز پلیمر پلی کاپرولاکتون است. برخلاف پلی کاپرولاکتون، بروملین به دلیل وجود گروه های عاملی نظیر هیدروکسی، کربوکسیل و آمین دارای ماهیت آب دوست است. بنابراین، بارگذاری بروملین آب دوست درون نانوالیاف، موجب کاهش معنی دار زاویه تماس به  $41 \pm 5^\circ$  ( $P < 0.05$ ) می شود. غشاهای پلی کاپرولاکتون ماهیت آب گریز و سفتی دارند که این ویژگی ها سبب دشواری کاربرد آنها در مراحل جراحی می شود. کاهش زاویه تماس می تواند به معنای قابلیت بالقوه بیشتر غشای پلی کاپرولاکتون-بروملین نسبت به غشای پلی کاپرولاکتون به عنوان غشاهای سدکننده باشد. به طور کلی مطالعات نشان داده است، غشاهای دارای آب دوستی متوسط، اثرهای ضد چسبندگی بهتری نسبت به غشاهای آب گریز یا ابرآب دوست نشان می دهند. غشاهای آب گریز برای چسبندگی سلولی و تکثیر آن نویدبخش تر هستند. افزون بر این، غشاهای ابرآب دوست به آسانی به چربی ها می چسبند [۵]. بنابراین، غشای

رهایش بوده و همچنین ضریب رگرسیون ( $R^2$ ) محاسبه شده در جدول ۲ نشان داده شده است. بررسی سازوکارهای رهایش بروملین براساس مقادیر همبستگی بیشتر ( $R^2$ ) نشان داد، مدل سینتیکی هیگوجی بهترین روش برای برازش داده هاست. این مسئله نشان می دهد، سازوکار رهایش بروملین، سازوکار انتشار است. افزون بر این، معادله کرسمیر-پپاس برای تجزیه و تحلیل بهتر نتایج استفاده شد. براساس مقادیر  $n$  محاسبه شده ( $n < 0.45$ )، سازوکار رهایش بروملین تحت نفوذ فیکه است.

### ۳-۶- کشت سلول

به منظور ارزیابی چسبندگی سلول روی غشاهای سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی (AdMSCs) به مدت ۲۴ h روی نمونه ها قرار گرفتند (شکل ۶). به طور کلی مطالعات نشان داده است، غشاهای با آب دوستی متوسط، اثر ضد چسبندگی بهتری نسبت به غشاهای آب گریز یا ابرآب دوست نشان می دهند. اگرچه نانوالیاف پلی کاپرولاکتون، به عنوان بستر آب گریز در نظر گرفته می شوند، با وجود این، پلی کاپرولاکتون نسبت به فیبرونکتین از تمایل خوبی برخوردار است. فیبرونکتین نقش مهمی در چسبندگی بسیاری از سلولها ایفا می کند. در غشای پلی کاپرولاکتون خالص، در برخی نواحی سلولهای چسبیده روی سطح لیاف به خوبی پهن شده اند و در برخی قسمتها سلولها به صورت کروی شکل (در شکل ۶ با علامت پیکان مشخص شده اند) باقی مانده اند. در نانوالیاف بارگذاری شده با بروملین، تعداد سلولهای چسبیده به بستر نانوالیاف کاهش یافته و این سلولها به صورت کروی شکل روی سطح قرار گرفته اند. به عبارتی به نظر می رسد، غشای حاوی نانوالیاف بارگذاری شده با بروملین به صورت سدی در برابر چسبندگی سلولهای AdMSCs قرار گرفته است. Sahbaz و همکاران، اثر بروملین را در ممانعت از تشکیل چسبندگی درون-صفافی با تزریق مستقیم بروملین درون صفافی بررسی کردند. نتایج نشان داد، تزریق درون صفافی بروملین به طور چشمگیری تشکیل چسبندگی پس از جراحی را کاهش می دهد [۱۲]. به طور کلی، سلولهای مزوتلیال لایه صفافی را پوشش می دهند و نقش مهمی در

نانوالیاف یا نزدیک آن قرار می گیرد که می تواند به رهایش انفجاری دارو منجر شود [۱۵]. به طور معمول، رهایش دارو به سازوکارهای مختلف نظیر انتشار، انحلال، واجذبی دارو و/یا تخریب-سایش پلیمر بستگی دارد. از آنجا که بروملین انحلال پذیری خوبی در محلول نمک بافر فسفات دارد، بنابراین رهایش اولیه آن در نتیجه رهایش سریع مربوط به مولکولهای بروملین سطحی است. رهایش انفجاری بروملین در محل جراحی می تواند مزیتی برای سامانه رهایش دارو باشد، زیرا پاسخهای التهابی در شروع فرایند را کنترل می کند و باعث کاهش تشکیل چسبندگی می شود. افزون بر این، پلی کاپرولاکتون نرخ تخریب بسیار آهسته ای دارد و هنگامی که درون محلول نمک بافر فسفات قرار می گیرد، متورم نمی شود. بنابراین، سازوکار رهایش دارو از لیاف پلی کاپرولاکتون، کنترل از راه شیمیایی یا تورم نیست و فرض می شود که سازوکار کنترل برپایه انتشار (diffusion) است [۱۵]. افزون بر این، بلورینگی پلی کاپرولاکتون و سرعت تخریب بسیار کم آن بر نیم رخ رهایش دارو اثر می گذارد. بدین ترتیب، می توان رهایش تدریجی بروملین را ناشی از انتشار دارو از میان نانوالیاف دانست. در نتیجه، رهایش ۱۴ روزه بروملین می تواند به ممانعت از ورود سلولهای التهابی و فیبروبلاستها کمک کند. از آنجا که بروملین در فرایند ترمیم زخم مؤثر است، رهایش مداوم آن در این مدت می تواند برای بهبود التیام زخم مفید باشد.

چند مدل ریاضی شامل سینتیک درجه صفر، درجه اول و مدل هیگوجی برای ارزیابی سازوکار رهایش بروملین به کار گرفته شد. افزون بر این، برای کسب اطلاعات بیشتر درباره نوع سازوکار نفوذ، مدل سینتیکی کورسمیر-پپاس استفاده شد. در این مدل، مقدار ثابت  $n$  سازوکار رهایش دارو را توصیف می کند. اگر  $n \leq 0.45$  باشد، سازوکار رهایش از قانون نفوذ فیک پیروی می کند و اگر  $0.45 < n < 1$  باشد، رهایش دارو انتقال غیرفیکه را دنبال می کند. در صورتی که  $n = 1$  باشد، رهایش دارو از سینتیک درجه صفر یا انتقال Case-II پیروی می کند، در حالی که برای  $n > 1$ ، سازوکار رهایش دارو به عنوان انتقال سوپر Case-II در نظر گرفته می شود [۲۱]. مقادیر ثابت های رهایش و توان رهایش ( $n$ ) که نشانگر سازوکار

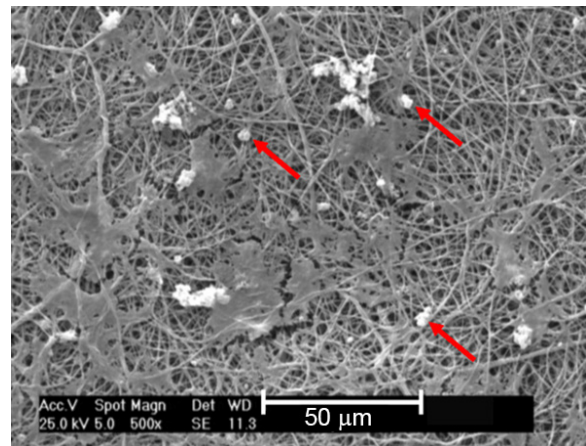
جدول ۲- سینتیک رهایش بروملین براساس ۴ مدل مختلف.

مدل درجه صفر		مدل درجه اول		مدل هیگوجی		مدل کورسمیر-پپاس			نمونه
$K_0$	$R^2$	$K_1$	$R^2$	$K_{HC}$	$R^2$	$n$	$k_{kp}$	$R^2$	
۰/۰۳	۰/۸۸	۰/۰۳	۰/۵۴	۴/۴۸	۰/۹۳	۰/۴۴	۰/۵۸	۰/۹۸	غشای پلی کاپرولاکتون-بروملین
$\pm 0.002$	$\pm 0.002$	$\pm 0.007$	$\pm 0.037$	$\pm 0.15$	$\pm 0.02$	$\pm 0.063$	$\pm 0.017$	$\pm 0.06$	

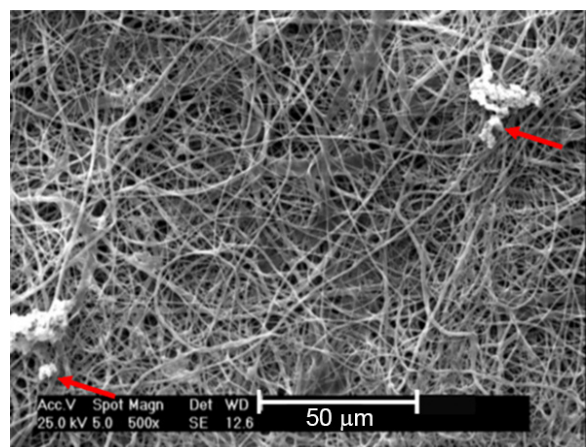
نقش مهمی در فرایند تشکیل چسبندگی ایفا می‌کنند. بروملین شامل آنزیم‌های پروتئولیتیک است. پروتئازها موجب اثرهای ضدالتهابی و ضدترومبوتیک بروملین می‌شوند. بروملین فعالیت فیبرینولیتیکی خود را با افزایش تبدیل پلاسمینوزن به پلاسمین نشان می‌دهد. سازوکار احتمالی دیگر برای اثربخشی بروملین در ممانعت از تشکیل چسبندگی، اثرهای ضدالتهابی آن است. بروملین باعث کاهش سیتوکین‌های و کموکاین‌های التهابی (گاما-TNF، IFN و غیره) می‌شود. نتایج پژوهش‌های گوناگون نشان داده است، وجود بروملین به کاهش تعداد سلول‌های التهابی (نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها) کمک می‌کند. همچنین، بروملین و سایر آنزیم‌های پروتئولیتیکی مشتق‌شده از گیاهان (نظیر پاپاین) اثرهای بازدارندگی رگ‌زایی با مداخله با مسیر رگ‌زایی تنظیم‌شده با عامل رشد مشتق‌شده از اندوتلیال عروقی (VEGF) دارند. تمام این سازوکارها نقش مهمی در ممانعت از تشکیل چسبندگی بروملین در حین جراحی ایفا می‌کنند [۱۲].

#### ۴ نتیجه‌گیری

در این پژوهش، نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون بارگذاری‌شده با ماده مؤثر بروملین (ماده مؤثر آناناس) با هدف کاربرد به‌عنوان غشای سدکننده در برابر چسبندگی‌های ناشی از جراحی با روش الکترورسی تهیه شد. نتایج بررسی ریخت‌شناسی نانوالیاف حاصل نشان داد، میانگین قطر نانوالیاف با افزودن بروملین کاهش می‌یابد. غشاهای نانولیفی تهیه‌شده با و بدون بروملین از استحکام کششی مطلوب ( $16/08 \pm 1/83$  و  $18/29 \pm 3/15$  MPa) و مدول یانگ زیاد ( $30/37 \pm 4/85$  و  $51/73 \pm 4/01$  MPa) برخوردارند. نانوالیاف بارگذاری‌شده با بروملین، رهایش انفجاری (۸ h) به‌همراه رهایش مداوم و آهسته تا ۱۴ روز را نشان دادند. رهایش انفجاری بروملین در محل جراحی مزیتی برای سامانه رهایش داروست، زیرا می‌تواند پاسخ‌های التهابی در آغاز فرایند را کنترل کند و سبب کاهش ایجاد چسبندگی شود. نتایج آزمون کشت سلولی AdMSCs نشان داد، در نانوالیاف بارگذاری‌شده با بروملین، تعداد سلول‌های چسبیده به بستر نانوالیاف کاهش یافته و این سلول‌ها به‌صورت کروی شکل روی سطح قرار گرفته‌اند. با وجود این، در برخی نواحی نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون، سلول‌ها تکثیر و رشد یافتند که احتمالاً به دلیل تمایل زیاد پلی‌کاپرولاکتون به فیبرونکتین است. بنابراین، با توجه به نتایج حاصل می‌توان گفت، نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون-بروملین



(الف)



(ب)

شکل ۶- تصویر SEM کشت سلول‌های AdMSCs بر غشاهای نانوالیاف: (الف) پلی‌کاپرولاکتون و (ب) پلی‌کاپرولاکتون-بروملین.

یک پارچگی اندام‌های صفاقی نظیر التیام صفاق و تولید سیال صفاقی میان آن‌ها ایفا می‌کنند. همچنین، آن‌ها در سامانه فیبرینولیتیک صفاقی با تراوش فعال‌کننده پلاسمینوزن بافتی (tPA)، مهارکننده و فعال‌کننده پلاسمینوزن شرکت می‌کنند. یک لایه صفاقی سالم برای ممانعت از چسبندگی ضروری است. هرگونه جراحی در لایه مزوتلیال موجب کاهش رخداد tPA می‌شود. فعالیت فیبرینولیتیک صفاقی یک مرحله کلیدی و حائز اهمیت در ممانعت از تشکیل چسبندگی است. تخریب ECM، بخشی از فرایند بازسازی در ترمیم مناسب زخم است. ماتریس متالوپروتئیناز (MMPs)، گروهی از پروتئینازها هستند که سبب تخریب ECM می‌شوند.

در جراحی‌هایی که به چسبندگی منجر می‌شوند، فعالیت بازسازی ECM و فیبرینولیتیک بافت‌ها از بین می‌رود. افزون بر این، چند عامل دیگر از جمله التهاب، ایسکمی و آسیب القاشده در اثر تنش اکسند و تولید بیش از حد فیروبلاست

از قابلیت بالقوه کاربرد به عنوان یک سدکننده فیزیکی در برابر چسبندگی برخوردارند.

## مراجع

- [1] E. Lih, S.H. Oh, Y.K. Joung, J.H. Lee, and D.K. Han, "Polymers for cell/tissue anti-adhesion", *Prog. Polym. Sci.*, vol. 44, pp. 28-61, 2014.
- [2] W. Wu, R. Cheng, J. das Neves, J. Tang, J. Xiao, Q. Ni, X. Liu, G. Pan, D. Li, W. Cui, and B. Sarmiento, "Advances in biomaterials for preventing tissue adhesion", *J. Controll. Release*, vol. 261, pp. 318-336, 2017.
- [3] J. Li, X. Feng, B. Liu, Y. Yu, L. Sun, T. Liu, Y. Wang, J. Ding, and X. Chen, "Polymer materials for prevention of postoperative adhesion", *Acta Biomater.*, vol. 61, pp. 21-40, 2017.
- [4] Y. Mao, N. Sanbhal, Y. Li, C. Yu, F. Wang, R. Guidoin, J. Gao, and L. Wang, "Chitosan functionalised poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibrous membranes as potential anti-adhesive barrier films", *React. Funct. Polym.*, vol. 143, pp. 104319, 2019.
- [5] J. Li, J. Zhu, T. He, W. Li, Y. Zhao, Z. Chen, J. Zhang, H. Wan, and R. Li, "Prevention of intra-abdominal adhesion using electrospun PEG/PLGA nanofibrous membranes", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 78, pp. 988-997, 2017.
- [6] X. Cai, S. Hu, B. Yu, Y. Cai, J. Yang, F. Li, Y. Zheng, and X. Shi, "Transglutaminase-catalyzed preparation of crosslinked carboxymethyl chitosan/carboxymethyl cellulose/collagen composite membrane for postsurgical peritoneal adhesion prevention", *Carbohydr. Polym.*, vol. 201, pp. 201-210, 2018.
- [7] F. Hajiali, S. Tajbakhsh, and A. Shojaei, "Fabrication and properties of polycaprolactone composites containing calcium phosphate-based ceramics and bioactive glasses in bone tissue engineering: a review", *Polym. Rev.*, vol. 58, no. 1, pp. 164-207, 2018.
- [8] S.H. Chen, C.H. Chen, Y.T. Fong, and J.P. Chen, "Prevention of peritendinous adhesions with electrospun chitosan-grafted polycaprolactone nanofibrous membranes", *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 12, pp. 4971-4982, 2014.
- [9] U.A. Sezer, V. Sanko, M. Gulmez, B. Aru, E. Sayman, A. Aktekin, F.V. Aker, G.Y. Demirel, and S. Sezer, "Polypropylene composite hernia mesh with anti-adhesion layer composed of polycaprolactone and oxidized regenerated cellulose", *Mater. Sci. Eng.: C*, vol. 99, pp. 1141-1152, 2019.
- [10] C.H. Chena, S.H. Chena, K.T. Shalumona, and J.P. Chen, "Prevention of peritendinous adhesions with electrospun polyethyleneglycol/polycaprolactone nanofibrous membranes", *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, vol. 133, pp. 221-230, 2015.
- [11] P. Carter, S.M. Rahman, and N. Bhattarai, "Facile fabrication of aloe vera containing pcl nanofibers for barrier membrane application", *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 27, no. 7, pp. 1-31, 2016.
- [12] A. Sahbaz, O. Aynioglu, H. Isik, U. Ozmen, O. Cengil, B.D. Gun, and K. Gungorduk, "Bromelain: a natural proteolytic for intra-abdominal adhesion prevention", *Int. J. Surg.*, vol. 14, pp. 7-11, 2015.
- [13] E. Shoba, R. Lakra, M.S. Kiran, and P.S. Korrapati, "Fabrication of core-shell nanofibers for controlled delivery of bromelain and salvianolic acid B for skin regeneration in wound therapeutics", *Biomed. Mater.*, vol. 12, no. 3, pp. 035005, 2017.
- [14] R. Sedghi, A. Shaabani, Z. Mohammadi, F. Yazdi Samadi, and E. Isaei, "Biocompatible electrospinning chitosan nanofibers: a novel delivery system with superior local cancer therapy", *Carbohydr. Polym.*, vol. 159, pp. 1-10, 2017.
- [15] A. Radisavljevic, D.B. Stojanovic, S. Perisic, V. Djokic, V. Radojevic, M.R. Stojanovic, and P.S. Uskokovic, "Cefazolin-loaded polycaprolactone fibers produced via different electrospinning methods: characterization, drug release and antibacterial effect", *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 124, pp. 26-36, 2018.
- [16] B. Feng, S. Wang, D. Hu, W. Fu, J. Wu, H. Hong, I.J. Domian, F. Li, and J. Liu, "Bioresorbable electrospun gelatin/polycaprolactone nanofibrous membrane as a barrier to prevent cardiac postoperative adhesion", *Acta Biomater.*, vol. 83, pp. 211-220, 2019.
- [17] S. Bayata, N. Amirib, E. Pishavarc, F. Kalaliniad, J. Movaffaghe, and M. Hahsemi, "Bromelain-loaded chitosan nanofibers prepared by electrospinning method for burn wound healing in animal models", *Life Sci.*, vol. 229, pp. 57-66, 2019.
- [18] C.D.L. Johnson, A.R.D. Amato, and R.J. Gilbert, "Electrospun fibers for drug delivery after spinal cord injury and the effects of drug incorporation on fiber properties", *Cell. Tissue. Organ.*, vol. 202, no. 1-2, pp. 116-135, 2016.
- [19] I. Yousefi, M. Pakravan, H. Rahimi, A. Bahador, Z. Farshadzadeh, and I. Haririan, "An investigation of

- electrospun Henna leaves extract-loaded chitosan based nanofibrous mats for skin tissue engineering”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 75, pp. 433-444, 2017.
- [20] M. Sharma and R. Sharma, “Implications of designing a bromelain loaded enteric nanoformulation on its stability and anti-inflammatory potential upon oral administration”, *RSC Adv.*, vol. 8, no. 5, pp. 2541-2551, 2018.
- [21] M. Shokrollahi, S.H. Bahrami, M.H. Nazarpak, and A. Solouk, “Multilayer nanofibrous patch comprising chamomile loaded carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) and polycaprolactone as a potential wound dressing”, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 147, pp. 547-559, 2020.
- [22] D.A. Brennan, A.A. Conte, G. Kanski, S. Turkula, X. Hu, M.T. Kleiner, and V. Beachley, “Mechanical considerations for electrospun nanofibers in tendon and ligament repair”, *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 7, no. 12, pp. 1701277, 2018.

