

سیستم تحویل داروی داربست نانوالیافی پلی کاپرولاکتون-ژلاتین- نانورس هیدروکسید دولایه ای برای درمان سرطان پوست ملانوما

فاطمه مراد^{۱*}، طاهره فروتن^۲، سارا شفیع^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته سلولی و تکوینی fatemehmorad9977@gmail.com

۲- دانشیار گروه آموزشی علوم جانوری foroutan@khu.ac.ir

۳- استادیار گروه آموزشی سلول های بنیادی shafiei@nigeb.ac.ir

خلاصه

هدف: امروزه استفاده از سیستم های دارورسانی بر پایه نانوذرات در جهت درمان سرطان گسترش پیدا کرده است بطوریکه کارایی درمان را تا حد زیادی بهبود بخشیده اند. هدف از این مطالعه سنتز داربست نانوالیافی هیدروکسید دولایه ای / پلی کاپرولاکتون/ژلاتین (PCL/GEL/LDH) (Polycaprolactone/Gelatin/Layered double hydroxide) و سپس استفاده از آن بمنظور تسهیل انتقال داروی ۴-متیل ۷-هیدروکسی کومارین(هایمکرومون) به سلول های سرطانی رده B16F10 تعریف شد. **روش پژوهش:** نانوهیبرید LDH/Hymecromone به روش هم رسوبی سنتز و سپس با محلول پلیمری PCL/GEL ترکیب و الکتروریسی شد. جهت مشخصه یابی، شناسایی فاز، مورفولوژی و ترکیب عنصری داربست مورد نظر به ترتیب از پراش اشعه ایکس، میکروسکوپ الکترونی روبشی و طیفسنجی پراش انرژی پرتو ایکس استفاده گردید. در نهایت میزان زنده مانی سلول ها با استفاده از تست MTT مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت با میکروسکوپ کانفوکال رویت و تصویربرداری شد. **یافته ها:** نتایج مشخصه یابی نشان داد که نانوهیبرید LDH/Hymecromone به درستی سنتز شده و در داربست نانوالیافی قرار گرفته است. همچنین مشخص شد که گنجاندن نانوذرات LDH در داربست PCL/GEL استحکام مکانیکی و ازدیاد طول آن را در زمان شکست بهبود بخشیده است. نتایج MTT نشان داد که استفاده از داربست PCL/GEL/LDH/hymecromone اثر بیشتری از دارو بر روی سلول های سرطانی B16F10 نسبت استفاده از پودر دارو به تنهایی نشان میدهد. **نتیجه گیری:** به نظر می رسد که داربست های PCL/Gel/LDH با رهایش آهسته، مداوم و نیز محافظت از دارو در برابر تخریب می توانند کاندیدای مناسبی به عنوان سیستم دارورسانی باشند.

کلمات کلیدی: هیدروکسید دولایه، پلی کاپرولاکتون، ژلاتین، هایمکرومون، الکتروریسی، ملانوما، داربست نانو الیافی

۱. مقدمه

ملانوما "تومور بدخیمی است که از ملانوسیت ها یا خال های تغییر شکل یافته ایجاد می شود. ملانوما اغلب مقاوم به درمان میباشد و حالتی تهاجمی با متاستاز بالا دارد و به دلیل مقاومت چند دارویی بالا (MDR[†])، به عود آسان و نرخ بقای پایین مشهور است. [1] اگرچه تنها ۴٪ از سرطان های پوستی شامل ملانوم می شود، اما ۸۰٪ مرگ و میر ناشی از سرطان

[†] Multidrug resistance

پوست به میزان متاستاز بالای ملانوما مربوط میشود. [4-2] در سرطان، تعادل بین مرگ و تکثیر سلولی به دلیل آسیب آپوپتوز از بین می‌رود. بازیابی مسیرهای سیگنالینگ آپوپتوز توسط داروها یک رویکرد درمانی ضد سرطان امیدوارکننده بوده است. کومارین‌ها متابولیت‌های ثانویه برخی از گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها هستند. کومارین‌ها پروتئین‌های آپوپتوز Bax و کاسپاز-3 و پروتئین‌های ضد آپوپتوز Bcl-2 را تنظیم یا سرکوب می‌کنند. [5,6] پروتئین‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی نیز توسط کومارین‌ها کاهش می‌یابند که منجر به توقف چرخه سلولی G0/G1 در سرطان می‌شود. [6] علاوه بر این، درمان با کومارین با کاهش بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و متالوپروتئین‌های ماتریکس منجر به مهار رگ‌زایی و متاستاز در سرطان می‌شود. [7,8] در میان مشتقات مبتنی بر کومارین، 7-hydroxy-4-methylcoumarin (Hymecromone) به دلیل اثرات ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد توموری، ضد ویروسی، ضد آلزایمر، ضد التهابی و محافظت از قلب مورد توجه بسیاری از شیمیدانان دارویی قرار گرفته است. [9] Hymecromone پتانسیل جالبی در غلبه بر مقاومت چند دارویی در سرطان، ناامیدکننده اثرات نامطلوب داروهای شیمی درمانی، و توسعه درمان سرطان معکوس نشان داده است [10] همچنین Hymecromone یا 7-hydroxy 4-methylcoumarin فعالیت ملانوم‌ژنیک بهتری نسبت به کومارین‌های متوکسیله معمولی دارد. [11] تشخیص و درمان ملانوم مبتنی بر فناوری نانو توجه روزافزونی را به خود جلب کرده است. زیرا برخی از داروهای ملانوما معمولی دارای حلالیت کم در سیستم‌های بافر آب، فراهمی زیستی ضعیف، متابولیسم سریع و پایداری کم هستند که پتانسیل بالینی و استفاده درمانی آنها را محدود می‌کند. نکته مهم این است که سیستم‌های دارورسانی نانو دارای مزایای افزایش حلالیت دارو، افزایش پایداری دارو، افزایش نیمه عمر، بهینه سازی فراهمی زیستی و بهبود نفوذپذیری اپیتلیال، نیمه عمر طولانی‌تر، افزایش هدف‌گیری تومور و به حداقل رساندن عوارض جانبی هستند. [12] پلی‌کاپرولاکتون* (PCL) یک پلیمر متبلور و خطی است که از واحدهای هگزانوات تکراری در خانواده پلی استرهای آلیفاتیک مصنوعی تشکیل شده است. [13] خواص عالی ویسکوالاستیسیته و رئولوژی، زیست سازگاری†، زیست تخریب‌پذیری‡، ارزانی و در دسترس بودن، پردازش و تولید آسان در دمای پایین و همچنین قابلیت تنظیم خواص از طریق اصلاح فیزیکی و شیمیایی که مورد توجه محققان مختلف قرار گرفته است. [14] سازگاری آن با طیف وسیعی از داروها، توزیع یکنواخت دارو را در ماتریکس ممکن می‌سازد، در حالی که تخریب طولانی‌مدت آن آزادسازی دارو را برای چند ماه تسهیل می‌کند. [15] راندمان تخریب PCL را می‌توان با تنظیم وزن مولکولی، شکل، کاتالیز خودکار و غیره تعدیل کرد. [16] به دلیل دمای ذوب پایین و سازگاری استثنایی در اختلاط با سایر پلیمرها به راحتی قابل پردازش است. علیرغم سرعت تجزیه کم و آبریز بودن، می‌تواند در ترکیب با پلیمرها و نانوذرات دیگر به سرعت تجزیه بسیار خوب و درجه بالایی از آب دوستی دست یابد. [17] آب دوستی و محتوای پروتئین سطح به عنوان محرکی برای رشد سلول شناخته می‌شود. به همین دلیل، محققان روی تثبیت مولکول‌های زیستی مانند ژلاتین، لامینین، کلاژن یا کیتوزان روی داربست‌ها تمرکز کرده‌اند تا بتوانند سازگاری داربست‌ها را بهبود بخشند. [18,19] انواعی از داروها در داخل مهره‌های PCL برای رهاسازی کنترل‌شده و تحویل هدفمند دارو کپسوله شده‌اند. [20] نرخ آزادسازی دارو از بسترهای PCL ممکن است به الگوی بزرگی از پارامترها به عنوان تابعی از فرمولاسیون و روش‌های آماده‌سازی خاص، مانند محتوای PCL، اندازه و درصد فراکسیون‌های دارویی نسبی مورد استفاده بستگی داشته باشد. [21] ژلاتین§ یک پلیمر طبیعی است و از طریق دنا توره شدن کنترل شده فیبرهای کلاژن نامحلول به دست می‌آید. [22] دارای خواص مطلوبی مانند زیست تخریب‌پذیری با نرخ تخریب بالا، زیست سازگاری خوب، حلالیت در آب، انعطاف‌پذیری، ایمنی زایی بسیار کم، در دسترس بودن و ارزان بودن و همچنین دارای قابلیت تشکیل ژل شفاف در شرایط خاص است. به دلیل پایداری حرارتی و مکانیکی و پتانسیل

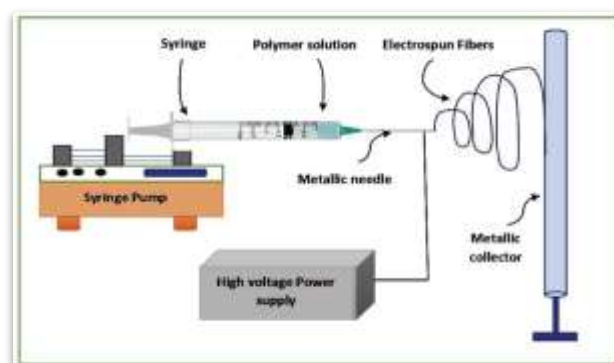
* Poly caprolactone

† Biocompatibility

‡ Biodegradability

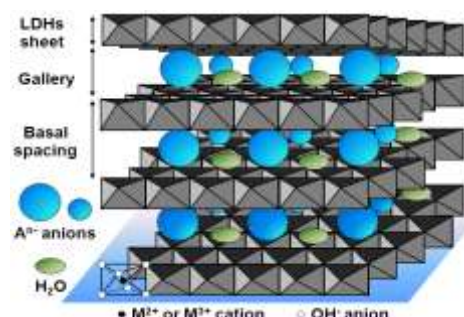
§ Gelatin

هیدراتاسیون و همچنین تخریب پایین تر آن در بدن، به عنوان یک حامل برای سیستم های دارورسانی در دراز مدت استفاده می شود. [23] خواص ژلاتین را می توان برای به حداکثر رساندن کارایی بارگذاری دارو تنظیم کرد. [24] پروفایل های رهاسازی دارو از ژلاتین را نیز می توان با تغییر منبع ژلاتین، وزن مولکولی و درجه اتصال متقابل بهینه کرد. [25] علاوه بر این، ژلاتین را می توان با انواع مختلفی از حامل ها و افزودن پلیمرهای مصنوعی یا طبیعی مانند PCL اصلاح کرد و رهاسازی دارو را می توان در طیف وسیعی از مهندسی بافت، [26,27] درمان سرطان [28,29] و درمان رگ زایی [30,31] استفاده کرد. در میان انواع روش های سنتز نانومواد موجود، الکتروریسی * به عنوان یک تکنیک امیدوارکننده برای طراحی داربست های نانوالیافی مبتنی بر پلیمر طبیعی و مصنوعی در مهندسی بافت و کاربردهای دارورسانی عمل می کند. اساساً بر اساس اعمال ولتاژ بالا، با هدف ایجاد جت باردار الکتریکی، محلول پلیمری در کلکتوری با قطبیت مخالف جمع آوری می شود. [32,33] ساختار متخلخل سطح الیاف را می توان با استفاده از فرآیند الکتروریسی افزایش داد و با داشتن سطح بالاتر، نانوالیاف را می توان برای اهداف مختلف به کار برد. [34]



شکل ۱- نمای شماتیک فرآیند الکتروریسی [57]

سیستم های دارورسانی با استفاده از نانوذرات هیدروکسید دو لایه ای[†] (LDH) توجه روزافزونی را به خود جلب کرده است. [35] به عنوان یک گروه مهم از کانی های رسی و شبکه ای از کاتیون های فلزی دو ظرفیتی و سه ظرفیتی است. [36,37] خواص تبادل آنیونی آنها اجازه بارگیری مستقیم داروها/مولکول های زیستی آنیونی را در گالری های بین لایه ای آنها می دهد. اگرچه این اتصال متقابل بار سطحی مثبت آنها را کاهش می دهد، اما معمولاً آنها به اندازه کافی بار مثبت دارند تا جذب سلولی را تسهیل کنند. [38-42]



شکل ۲- نمایش ساختاری هیدروکسیدهای دو لایه ای [58]

* Electrospinning

[†] Layered double hydroxide

از جمله ویژگی‌های کاربردی و مهم این مواد می‌توان به زیست سازگاری، سمیت سلولی کم، پایداری شیمیایی بالا، خاصیت انحلال یا آزادسازی کنترل شده توسط pH در محیط‌های اسیدی، خاصیت تبادل آنیونی منحصر به فرد و همچنین روش سنتز آسان و کم هزینه آن اشاره کرد. [43-44] هیدروکسیدهای دو لایه ای نسبت سطح به حجم بالاتری دارند و ترکیب دارویی فعال در یک ساختار لایه ای قرار می‌گیرد که از انتشار ترکیبات فعال قبل از رسیدن به محل مورد نظر محافظت می‌کند و در نتیجه اثرات نامطلوب آن را کاهش می‌دهد. [45] چارچوب کاتیونی LDH از داروها و ژن‌ها در برابر تخریب آنزیمی محافظت می‌کند و پایداری آنها را بهبود می‌بخشد. [46,47] در این مطالعه، هدف ما دستیابی به یک سیستم دارورسانی جدید از طریق ساخت داربست‌های نانوفیبری PCL/GEL الکتروریسی شده با LDH است. از آنالیز XRD^* برای مشخصه یابی LDH و از آزمون‌های $SEM^\dagger$ ، $EDX^\ddagger$ و آزمون کشش[§] برای مشخصه یابی داربست‌های نانوالیاف استفاده شد. زنده ماندن و تکثیر سلول‌های B16F10 با سنجش MTT مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

پلی(ε-کاپرولاکتون) با میانگین منگنز $7000-8000 \text{ g mol}^{-1}$ و ژلاتین از سیگما خریداری شد. سایر مواد و حلال‌ها از Merck (دارمشتات، آلمان) تهیه شده است. ۴-متیل ۷-هیدروکسی کومارین از سیگما آلد ریچ خریداری شد.

۲-۱. روش سنتز و مشخصه یابی نانوهیبرید LDH و هایمکرومون

محلول آبی مخلوط $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ و $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ با نسبت مولی ۳:۱ با PH اولیه حدود ۳ تهیه شد. برای تهیه محلول کومارین، مقدار مشخصی از هایمکرومون در ۲۰ سی سی محلول هیدروکسید سدیم (۰.۲ مولار) در یک بشر حل شد، سپس محلول به آرامی به صورت قطره ای به محلول $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ و $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ تحت هم زدن مداوم و اتمسفر نیتروژن اضافه شد. پس از تنظیم PH مخلوط در ۱۰، مخلوط واکنش در همزن مغناطیسی، یک شبه هم زده شد. برای جمع آوری رسوب از سانتریفیوژ با دور RPM ۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه و سپس شستن رسوب با آب مقطر استفاده شد. در نهایت، پودر گلبهی همگن توسط خشک کن انجمادی به دست آمد. آنالیز فاز پودرهای به دست آمده با پراش اشعه ایکس (XRD) مشخص شد. برای ارزیابی آزمایش‌ها از دستگاه پراش اشعه ایکس (D4 Bruker) با تابش $CuK\alpha$ استفاده شد. اسکن در ولتاژ ۴۰ کیلو ولت و جریان ۳۰ میلی آمپر انجام شد.

۲-۲. روش ساخت داربست نانوالیافی PCL/GEL/LDH/Hymecromone

محلول الکتروریسی با حل کردن PCL و GEL در محلول TFE با نسبت وزنی ۵۰:۵۰ (نسبت حل شونده به حلال ۱۰%wt) تحت هم زدن مداوم به مدت ۲۴ ساعت تهیه شد. ۱۴ mg از پودر LDH/Drug به محلول پلیمری اضافه کرده و ۵ دقیقه هم زده شد. PH حدود ۵ شد. سپس، برای هر فرمول PCL/GEL با غلظت‌های مختلف LDH (۰.۱ و ۱ و ۱۰ %wt)، مقدار مشخصی از محلول از طریق یک سوزن فولادی ضدزنگ با نوک بلانت با سرعت جریان ۳.۵ میلی لیتر در ساعت با استفاده از پمپ سرنگ خارج شد. فاصله عملیات ۱۰ سانتیمتر تعیین شد. ولتاژ اعمال شده روی ۱۷ کیلو ولت تنظیم شد. از

* X-ray diffraction

† Scanning electron microscopy

‡ X-ray energy dispersive spectroscopy

§ Tensile test

بستر فویل آلومینیومی به عنوان کلکتور استفاده شد. برای تبخیر حلال باقیمانده، نانوالیاف ساخته شده نهایی به مدت ۲۴ ساعت در خلاء خشک شدند.

۲-۳. مشخصه یابی داربست های نانوالیافی

تجزیه و تحلیل مورفولوژی الیاف با استفاده از SEM (Siemens, D5000-Germany)، مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر SEM با بزرگنمایی متفاوت در ۲۰ کیلو ولت ثبت شد. قبل از عملیات، از یک روکش پوشش خلاء (UK, EMOTECHK450X) برای رسوب یک لایه بسیار نازک طلا بر روی سطح نمونه ها استفاده شد. میانگین قطر الیاف با استفاده از نرم افزار ImageJ برآورد شد. تجزیه و تحلیل پراکندگی انرژی اشعه ایکس (ZEISS, EDX, آلمان) برای شناسایی ترکیب عنصری و توزیع نانوذرات LDH در نانوالیاف (عناصر Al و Mg) مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش در ولتاژهای شتاب دهنده ۱-۲۰ کیلوولت و بزرگنمایی ۲۸۰ برابر انجام شد. برای ارزیابی خواص مکانیکی کششی نانوالیاف، از دستگاه تست جهانی SANTAM (STM 20، ایران) استفاده شد. آزمایش ها در شرایط مشابه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انجام شد. نمونه ها به طور مساوی برش داده شدند و ضخامت آنها با استفاده از میکرومتر دیجیتال و سپس قرار دادن آنها بین فک های گیره ها اندازه گیری شد. برای تمام اندازه گیری ها از لودسل ۱۰ نیوتن استفاده شد.

۲-۴. مطالعات سلولی

رده سلولی ملانوم موش B16F10 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول های تهیه شده در 10^5 RPMI حاوی ۱۰٪ FBS[†] (سرم جنین گاوی) (GIBCO، ایالات متحده آمریکا)، ۱۰۰ واحد بین المللی در هر میلی لیتر آنتی بیوتیک پنی سیلین (سیگما، ایالات متحده آمریکا) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین (سیگما، ایالات متحده آمریکا) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد CO_2 در هوا کشت و انکوبه شدند. ۸۰ تا ۱۰۰ درصد سلول ها با ۵٪ درصد تریپسین برداشت شدند.

قبل از کاشت سلول، داربست ها با استفاده از اشعه ماوراء بنفش به مدت ۱ ساعت استریل شدند، چندین بار با PBS شسته شدند و به مدت ۲۴ ساعت با RPMI انکوبه شدند. داربست های استریل در پلیت های ۲۴ خانه قرار داده شدند. سلول های B16F10 در پلیت ۲۴ خانه کاشته شدند. سلول های B16F10 تحت چندین تیمار قرار گرفتند: الف) گروه کنترل (بدون تیمار) ب) فقط پودر دارو ج) PCL/GEL د) PCL/GEL/LDH ه) PCL/GEL/LDH/DRUG

این گروه ها به مدت ۴۸ و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و اتمسفر ۵٪ CO_2 انکوبه شدند برای هر گروه ۳ چاهک در نظر گرفته شد. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه خوارزمی، کرج، جمهوری اسلامی ایران تایید شد. (کد: IR.KHU.REC.1403.091)

۲-۵. MTT

این آزمایش بر اساس توانایی سلول های زنده در کاهش نمک زرد MTT (دی متیل تيازول و دی فنیل تترازولیوم برومید) به رسوب نامحلول آبی فرمازان است. MTT 5 mg/ml به هر چاهک در حجم ۱/۱۰ محیط اضافه شد. سلول ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO دی متیل سولفوکسید به چاهک ها

* Roswell Park Memorial Institute Medium

† Fetal bovine serum

اضافه شد و تا زمانی که بلورهای تشکیل شده از فورمازان حل شوند، پیپت شدند. سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد.

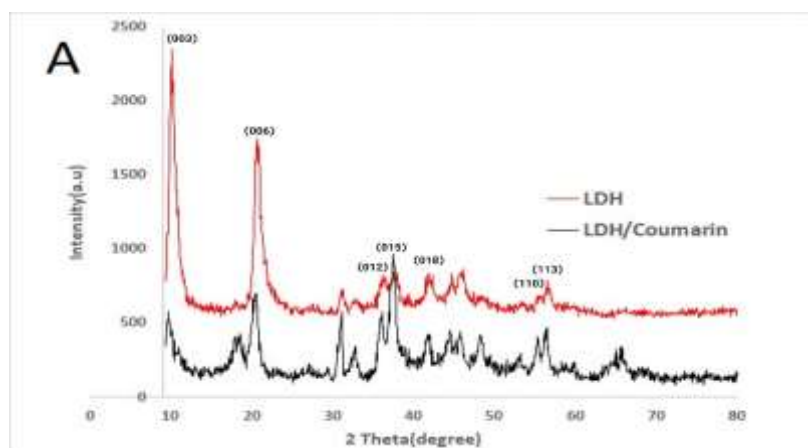
۶-۲. آنالیز آماری

داده های تجربی به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شد. معناداری آماری با استفاده از ANOVA بررسی شد. مقادیر P کمتر از ۰.۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. در برخی از شکل‌ها، سطح معناداری به صورت زیر نشان داده شده است $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$ ، $p < 0.0001$

۳. نتایج

۱-۳. مشخصه یابی LDH/Hymecromone

نانوذرات LDH با موفقیت توسط روش رسوب همزمان سنتز شدند XRD. برای شناسایی وجود ساختار LDH کریستالی و نانوهیبریدهای LDH/Hymecromone انجام شد. داده‌های XRD از LDH های بکر و حاوی دارو در شکل ۳ نشان داده شده‌اند. همانطور که مشاهده می شود، وجود قله های مشخصه LDH با بازتاب های (۰۰۳)، (۰۰۶) و (۱۱۰) مطابقت دارد. این با ادبیات مطابقت دارد. الگوی XRD استنباط کرد که هایمکرومون با موفقیت به LDH تبدیل می شود. برای تطبیق مولکول‌های هایمکرومون، پیک‌های مشخصه به دلیل افزایش فاصله بین لایه‌ها، به سمت زاویه تتا پایین‌تر تغییر می‌کنند.

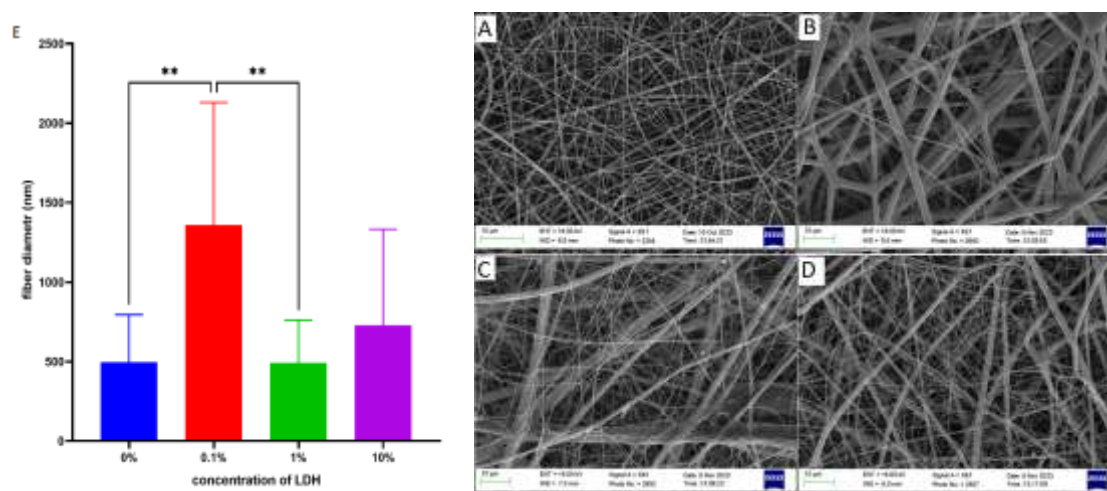


شکل ۳- الگوهای XRD نانوکامپوزیت LDH و LDH/DRUG

۲-۳. مشخصه یابی نانوالیاف الکتروریسی شده

شکل ۴ تصاویر SEM داربست های PCL/Gel/LDH را نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود، نانوالیاف به صورت تصادفی جهت دار، صاف و بدون مهره هستند. میانگین ضخامت فیبر توسط حداقل ۱۰۰ فیبر با استفاده از نرم افزار تجزیه و تحلیل تصویر ImageJ برآورد شد. میانگین قطر فیبر در نانوالیاف PCL/GEL با درصدهای مختلف LDH در جدول ۱ نشان داده شده است. به طور کلی، افزودن مقدار کمی از LDH به الیاف PCL/Gel میانگین قطر فیبر را در مقایسه با PCL/Gel بکر افزایش داد در حالی که با افزایش غلظت LDH از ۰.۱٪ به ۱٪، میانگین قطر الیاف کاهش یافت.

همانطور که مشاهده می شود، با افزودن LDH به PCL/Gel، توزیع اندازه فیبر از چند ده نانومتر به چند صد میکرون افزایش می یابد. وسیع ترین توزیع اندازه فیبر در PCL/Gel/LDH (10%) به دست آمد. نقشه EDX نانوالیاف PCL/Gel/LDH (10%) در شکل ۵ نشان داده شده است. دو پیک مربوط به عناصر منیزیم و آلومینیوم در LDH است که توزیع یکنواخت LDH در الیاف PCL/Gel را تایید می کند. همچنین عناصر کربن و اکسیژن به صورت دو پیک مرتفع مربوط به PCL ظاهر شده اند. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می شود، منیزیم و آلومینیوم به ترتیب با نقاط قرمز و سبز مشخص می شوند. آزمایش های کششی روی نانوالیاف انجام شد و نتایج در شکل ۶ نشان داده شده است. منحنی های تنش-کرنش نشان می دهند که نمونه ای که بالاترین استحکام کششی را دارد PCL/GEL حاوی ۱ درصد وزنی LDH بود، در حالی که PCL/GEL/LDH(10%wt) کمترین استحکام کششی را نشان داد. ادغام نانوذرات LDH در نانوالیاف PCL/Gel استحکام کششی نهایی را افزایش داده است. این کاهش قابل توجه در استحکام کششی در PCL/Gel/LDH (10%) ناشی از تجمع LDH ها و غلظت تنش است. همچنین، ازدیاد طول در هنگام شکست با افزودن LDH به نانوالیاف PCL/GEL بهبود یافته است. این پدیده را می توان به نسبت بزرگ سطح به حجم و سفتی ویژه بالای نانوذرات LDH نسبت داد.



شکل 4- تصاویر SEM از داربست های الکتروریسی شده PCL/GEL با درصد های مختلف LDH (نوارهای

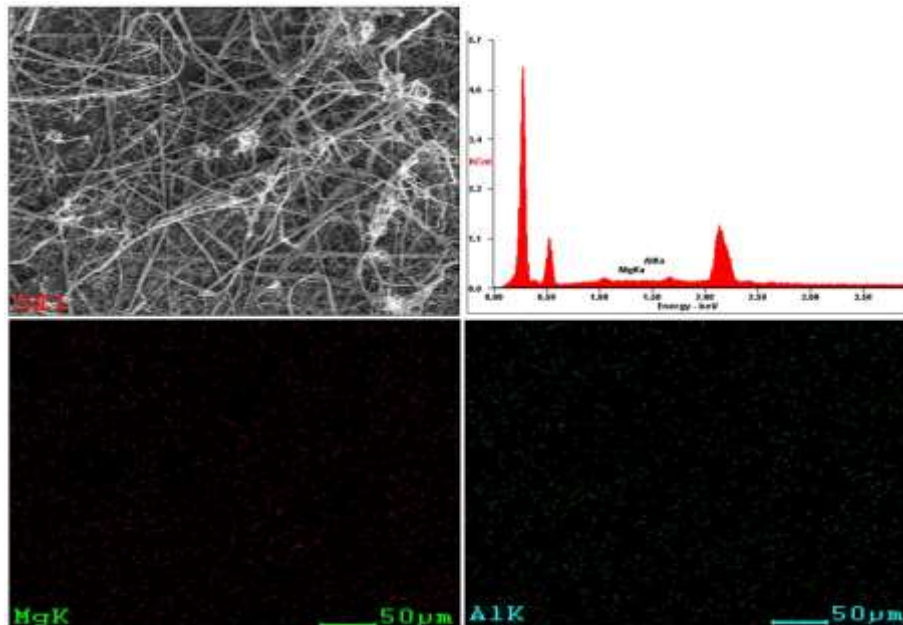
مقیاس نشان دهنده ۱۰ میکرومتر)

(A) 0% wt (B) 0.1% wt (C) 1% wt (D) 10 % wt

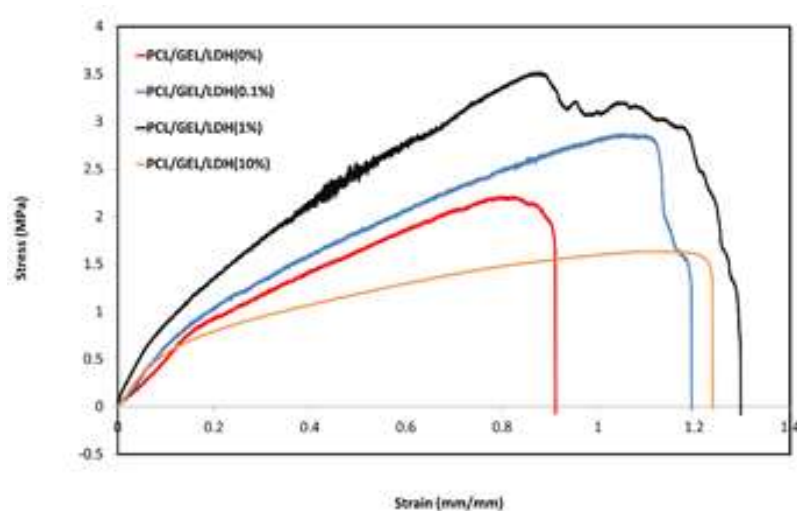
(E) نمودار SEM میانگین قطر الیاف داربست های PCL/GEL حاوی درصد های مختلف LDH

جدول ۱- میانگین قطر نانوالیاف PCL/GEL حاوی درصد های مختلف LDH بر حسب نانومتر

درصد LDH	0%	0.1%	1%	10%
میانگین	۴۹۵	۱۳۵۸.۹	۴۹۱.۷	۷۲۸.۶
انحراف معیار	۲۸۴.۶	۷۳۱.۳	۲۵۵.۹	۵۷۲.۲



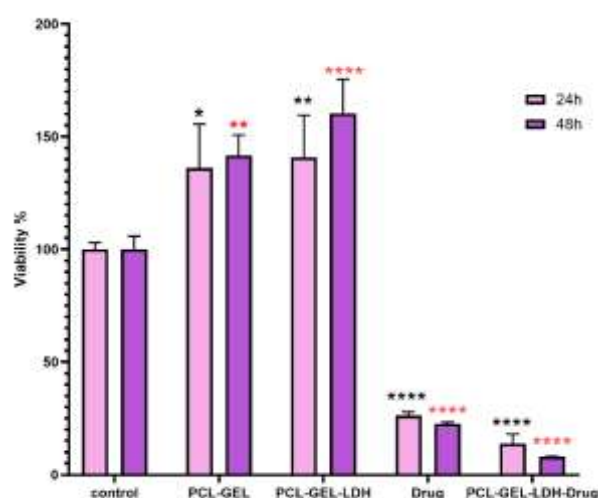
شکل ۵- (الف، ب) تجزیه و تحلیل EDX داربست PCL/Gel/LDH (۱۰٪ wt) پیک های کربن، اکسیژن، نیتروژن، منیزیم و آلومینیوم را نشان می دهد. (ج، د) تجزیه و تحلیل نقشه برداری عنصری برای داربست PCL/Gel/LDH (آلومینیوم (نقاط آبی) و منیزیم (نقاط سبز))



شکل ۶- منحنی های تنش- کرنش داربست های PCL/Gel با درصدهای مختلف LDH : wt ۰٪ (قرمز)، wt ۰.۱٪ (آبی)، wt ۱٪ (سیاه) و wt ۱۰٪ (زرد)

۳-۳. مطالعه زنده مانی سلول ها

از روش MTT برای بررسی میزان بقای سلول های سرطانی هنگام استفاده از دارو به تنهایی و دارو در داربست PCL/GEL/LDH استفاده شد. معناداری بین گروه کنترل با ۲۴ ساعت انکوباسیون (B16F10) و گروه ها با تیمار مختلف با ۲۴ ساعت انکوباسیون با ستاره های مشکی مشخص شد. معناداری بین گروه کنترل با ۴۸ ساعت انکوباسیون (B16F10) و گروه ها با تیمار مختلف با ۴۸ ساعت انکوباسیون با ستاره های قرمز مشخص شد. نتایج کاهش بیشتر در بقای سلول های B16F10 هنگام استفاده از داربست Drug/LDH/GEL/PCL را نشان داد. (شکل ۷) میانگین درصد زنده مانی گروه های مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است.



شکل ۷- بررسی میزان بقای سلول های B16 کشت شده بر روی داربست های مختلف پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون با آزمون MTT

جدول ۲- میانگین درصد زنده مانی گروه کنترل ۲۴h نسبت به تیمارهای مختلف با ۲۴h انکوباسیون و گروه کنترل ۴۸h نسبت به تیمارهای مختلف با ۴۸h انکوباسیون

گروه ها	کنترل 24h	کنترل 48h	PCL/GEL 24h	PCL/GEL 48h	PCL/GEL/LDH 24h	PCL/GEL/LDH 48h	فقط دارو 24h	فقط دارو 48h	PCL/GEL/ LDH/Drug 24h	PCL/GEL/ LDH/Drug 48h
میانگین	۱۰۰	۱۰۰	۱۳۶	۱۴۱.۷	۱۴۰.۸	۱۶۰.۴	۲۶.۲	۲۲.۶	۱۳.۷	۸
انحراف معیار	۲.۴	۴.۸	۱۵.۹	۷.۳	۱۵.۳	۱۲.۲	۱.۳	۰.۵	۳.۵	۰.۱

۴. بحث و بررسی:

در این پژوهش ما فرض کردیم که ادغام داروی Hymecromone در داربست نانوالیافی PCL/GEL/LDH باعث بهبود دارورسانی به سلول‌های هدف می‌گردد. همچنین این داربست تأثیر منفی در زنده ماندن سلول‌های سالم ندارد. طبق نتایج XRD، LDH سنتز شده پیک‌های پراش ساختار LDH شاخص را در 2θ پایین‌تر (پیک‌های تیز و متقارن در ۱۱.۲۱۹° و ۲۲.۴۷۹°) و 2θ بالاتر (پیک‌های گسترده و نامتقارن ۳۴.۵۱۳°، ۳۸.۸۹۶°، ۴۵.۲۸۸°، ۶۰.۲۶۶°، ۶۱.۴۵۳°) نشان داد که با صفحات کریستالی (۰۰۳)، (۰۰۶)، (۰۱۲)، (۰۱۵)، (۰۱۸)، (۱۱۰)، و (۱۱۳) یک لایه مطابقت دارد، پس LDH به درستی با روش هم رسوبی سنتز شد. در ترکیب نانوهیبریدی LDH/hymecromone، تغییر بازتاب (۰۰۳) و (۰۰۶) به سمت 2θ پایین‌تر

(شکل ۳) نشان دهنده افزایش فاصله بین لایه‌ها است. در این راستا، یافته‌های ما از آنالیز XRD نشان داد که داروی Hymecromone با موفقیت در بین لایه‌های LDH قرار گرفته است. با استفاده از SEM مورفولوژی داربست‌های نانوکامپوزیتی PCL-GEL با درصد‌های وزنی مختلف (0%، 0.1%، 1%، 10% wt) LDH مشاهده شد. نمودار SEM نشان داد که به طور کلی با افزودن LDH به PCL/GEL میانگین قطر الیاف افزایش یافت. اما هنگامی که غلظت LDH از ۰.۱ درصد به ۱ درصد رسید میانگین قطر الیاف به میزان ۸۶۷ nm کاهش یافت. همان‌طور که توسط سحر احمدی و همکاران (۲۰۲۲) نشان داده شد یکی از دلایل احتمالی کاهش قطر فیبر مربوط به هدایت الکتریکی محلول الکترووریسی است. با افزایش رسانایی الکتریکی محلول پلیمری، قطر نانوالیاف ممکن است به میزان قابل توجهی کاهش یابد. به طور معمول، حداقل قطر نانوالیاف را می‌توان با محلول با حداکثر هدایت الکتریکی به دست آورد. محلول‌های با رسانایی الکتریکی بیش از حد منجر به تشکیل دانه‌ها و توزیع قطر وسیع می‌شوند. افزودن نمک‌های یونی به محلول الکترووریسی باعث افزایش یکنواختی نانوالیاف و تولید نانوالیاف بدون مهره با کمترین قطر با افزایش ظرفیت حمل بار جت می‌شود. بر این اساس، با افزودن LDH، هدایت الکتریکی محلول PCL/GEL افزایش می‌یابد، در حالی که سرعت جریان به اندازه کافی بالا نگه داشته می‌شود [۴۸]. بنابراین محلول PCL/GEL/LDH با غلظت 1% LDH دارای بالاترین رسانایی الکتریکی است که الیافی با قطر کم و بدون مهره ایجاد می‌کند. اما در محلول PCL/GEL/LDH با غلظت ۰.۱% LDH غلظت محلول نمکی (LDH) اضافه شده به محلول الکترووریسی به اندازه‌ای نبوده است که بتواند رسانایی الکتریکی را بالاتر ببرد اما به علت افزودن LDH به محلول پلیمری ویسکوزیته محلول بالاتر رفته است بنابراین قطر نانوالیاف بیشتر شده است. آنالیز عنصری EDX نشان دهنده حضور عناصر اصلی LDH یعنی Mg و Al در نمونه است. پراکندگی یکنواخت این عناصر در EDX نشان می‌دهد که LDH به صورت یکنواخت در سطح الیاف PCL-GEL پراکنده شده است. برای اینکه نانوالیاف الکترووریسی شده مناسب سیستم دارورسانی باشند باید سرعت تخریب پایین و استحکام کششی مناسب داشته باشند تا زمانی که دارو به طور کامل به سلول هدف نرسیده است الیاف تخریب نشوند. آزمون خواص مکانیکی نشان داد که به طور کلی افزودن LDH به PCL/GEL باعث بهبود خواص مکانیکی الیاف نسبت به الیاف PCL/GEL بکر می‌شود. الیاف (1%) PCL/GEL/LDH دارای بیشترین ازدیاد طول در برابر تنش و همچنین بیشترین استحکام کششی بوده‌اند. همان‌طور که Shing-Chung Wong و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند کاهش قطر الیاف، بلورینگی و جهت‌گیری مولکولی را بهبود می‌بخشد که خواص کششی افزایش یافته را برای الیاف با قطر کوچکتر توضیح می‌دهد [۴۹]. اما الیاف PCL/GEL/LDH (10%) دارای کمترین میزان مدول ینگ و استحکام کششی در بین الیاف دیگر بودند و چون دارای مهره و الیاف ریز و درشت زیاد بوده و در نتیجه این الیاف به سرعت پاره می‌شوند. نتایج MTT نشان داد که داربست PCL/GEL نه تنها اثر سیتوتوکسیک روی سلول‌های B16F10 نداشت، بلکه بقای این سلول‌ها را به میزان قابل توجهی افزایش داد (گروه

PCL/GEL نسبت به گروه کنترل با ۲۴ ساعت انکوباسیون ۳۶.۰۷٪ افزایش زنده مانی و گروه PCL/GEL نسبت به گروه کنترل با ۴۸ ساعت انکوباسیون ۴۱.۷۲٪ افزایش در زنده مانی داشت. علی طالبی و همکاران (۲۰۱۹) نشان داده اند که داربست نانوالیاف PCL/GEL می‌تواند از تکثیر و کلونیزاسیون mSSCها و همچنین تمایز این سلول‌ها به سلول‌های اسپرماتید هاپلوئید پشتیبانی کند [۵۰]. در مطالعه دیگری آنجلا سمیتلا و همکاران (۲۰۲۰) داربست های PCL/GEL برای ترمیم غضروف مورد استفاده قرار دادند و مشخص شد که ادغام ژل روی داربست های PCL منجر به بهبود قابل توجهی در اتصال و تکثیر سلولی می شود [۵۱]. همچنین بشیری و همکاران (۲۰۲۲) مطالعه ای با هدف ارزیابی تکثیر سلول های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی بر روی نانوکامپوزیت پلی کاپرولاکتون/ژلاتین الکترورسی شده انجام دادند. نتایج نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گروه کشت‌شده روی داربست در مقایسه با گروه کنترل بود. در مجموع به این نتیجه رسیدند که داربست نانوکامپوزیتی PCL-GEL می تواند ظرفیت مناسبی برای خود نوسازی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی فراهم کند. بنابراین، این نتیجه یعنی افزایش زنده مانی سلول ها در گروه کشت شده روی PCL/GEL مطالعات قبلی را تایید می کند.

علاوه بر این PCL/GEL/LDH نیز باعث افزایش معنادار زنده مانی در سلول های B16F10 شد. (گروه PCL/GEL/LDH با ۲۴ ساعت انکوباسیون نسبت به کنترل ۲۴ ساعت ۴۰.۸٪ افزایش و PCL/GEL/LDH با ۴۸ ساعت انکوباسیون نسبت به کنترل ۴۸ ساعت ۶۰.۴۵٪ باعث افزایش در زنده مانی شد).

روژاس و همکاران (۲۰۲۲) به این نتیجه رسیدند که آب دوستی و بار مثبت سطح LDH از طریق برهمکنش های الکترواستاتیکی با سلول دارای بار منفی، مکان های اتصال را فراهم می کند که باعث افزایش قابل توجهی در فعالیت سلولی می گردد [52]. همچنین طبق نمودار MTT در مطالعه سحر احمدی و همکاران (۲۰۲۲) با افزایش غلظت LDH در

داربست PCL/GEL از ۰٪ تا ۱۰٪ زنده مانی سلول نیز افزایش پیدا میکند [48]. در نتیجه طبق نتایج MTT و مطالعات گذشته استفاده از LDH همچنین در مطالعه حاضر MTT نشان داد که اثر داروی هایمکرومومون پس از ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت انکوباسیون تغییر کمی در زنده‌مانی سلولی دارد (۳.۶۴۶٪ کاهش در زنده مانی پس از ۴۸ ساعت)، اما در هنگام استفاده از دارو در داربست نانوالیافی (PCL/GEL/LDH)، میزان زنده‌مانی نسبت به استفاده از دارو به تنهایی پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون ۱۴.۵۳٪ کاهش یافته است. انتشار کنترل نشده دارو بسیار سمی و متعاقباً بی اثر است. در مقابل، انتشار تدریجی دارو می تواند نیاز به چندین دارو را در یک روز از بین ببرد. [۵۳] DDS* داروها را با سرعت از پیش تعیین شده و برای یک دوره زمانی مشخص آزاد می کند. علاوه بر این، سیستم‌های تحویل کنترل‌شده دارو تحت تأثیر شرایط فیزیولوژیکی قرار نمی‌گیرند و بنابراین می‌توانند از روزها تا سال‌ها دوام بیاورند. [۵۴] به منظور رهایش طولانی مدت دارو، نانوالیاف ساخته شده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر یا متورم شونده مانند PCL و GEL استفاده می‌شوند که به تدریج و به روشی تنظیم شده، تجزیه شده و در یک محیط بیولوژیکی متورم می شوند. [۵۶،۵۵] محمد البعدانی و همکاران (۲۰۲۱) غشاهای کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون/ژلاتین (PCL/GEL) را الکترورسی کرده و توانایی رهاسازی کنترل‌شده با دارو آن را مورد ارزیابی قرار دادند. با افزایش محتوای PCL، سرعت رهاسازی دارو به تدریج کاهش یافت و دوره انتشار کلی می‌تواند به بیش از ۲ هفته یا بیشتر افزایش یابد. بنابراین به این نتیجه رسیدند که با الکترورسی مشترک PCL و GEL میتوان یک سیستم دارورسانی قابل کنترل با فعالیت بیولوژیکی خوب تهیه کرد. [۵۷] علاوه بر PCL/GEL، نانورس های هیدروکسید دو لایه ای نیز میتوانند برای کاربردهای رهش کنترل شده در مکان هایی که نیاز به قرار گرفتن طولانی مدت دارو دارند مفید باشند زیرا آنها دارو را در حالت تجزیه نشده نگهداری می کنند و مقادیر موثری از دارو را در دوره های زمانی طولانی آزاد می کنند. [۵۸] علاوه بر این هیدروکسیدهای دولایه ای به دلیل ساختار لایه ای، نسبت سطح به حجم بالاتری دارند. خاصیت تبادل آنیونی LDH اجازه بارگیری مستقیم داروها/مولکول های زیستی آنیونی را در گالری های بین لایه ای آنها

* Drug delivery system

می‌دهد. اگرچه این اختلاط معمولاً بار سطحی مثبت آنها را کاهش می‌دهد، آنها به اندازه کافی بار مثبت دارند تا جذب سلولی را تسهیل کنند [۳۵-۴۰] چارچوب کاتیونی LDH از داروها و ژن‌ها در برابر تخریب آنزیمی محافظت می‌کند و پایداری آنها را بهبود می‌بخشد. [۲۶،۲۷]. این ساختار از آزاد شدن ترکیبات فعال قبل از رسیدن به محل مورد نظر محافظت می‌کند و بنابراین عوارض جانبی داروها را کاهش می‌دهد [۴۳] لایه‌های هیدروکسید LDH یک ریزمحیط نسبتاً آبدوست برای داروهای آنیونی از هر نوعی فراهم می‌کند که از فتودکربوکسیلاسیون آپتوپریل و آمینوسالیسیلیک اسید [۵۹] یا راسمی شدن ال-تیروزین که معمولاً در مواجهه با نور خورشید زیاد رخ می‌دهد، جلوگیری می‌کند. [۶۰] LDH ها به طور بالقوه می‌توانند به عنوان "ظروف مولکولی" استفاده شوند. [۶۱] همچنین در سطح سلولی، LDH می‌تواند به راحتی توسط سلول‌ها درونی شود، به سرعت (کمتر از ۳۰ دقیقه) از آندوزوم‌ها/لیزوزوم‌ها فرار کند و متعاقباً در سیتوپلاسم و میتوکندری منتشر شود. [۶۲] این امر به علت بار مثبت LDH است که باعث تسهیل نفوذ آن به غشای سلولی می‌شود و در نتیجه کارایی تحویل داخل سلولی را تا حد زیادی بهبود می‌بخشد. غشاهای بیولوژیکی موانع اصلی برای انتقال مؤثر داروها، ژن‌ها و مولکول‌های زیستی به سیتوپلاسم سلولی هستند. [۶۴،۶۳] بنابراین براساس نتایج MTT و همچنین مطالعات گذشته می‌توان فرض کرد که ترکیب نانوذرات LDH با پلیمرهای زیست تخریب‌پذیری مثل PCL و GEL باعث پایداری بالا و رهایش موثرتر دارو در طولانی مدت می‌شود. به همین دلیل است که پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در مقایسه با ۲۴ ساعت انکوباسیون، سطح زنده مانی سلول‌های B16F10 کاشته شده بر روی PCL/GEL/LDH/Drug بیشتر کاهش می‌یابد.

۵. نتیجه‌گیری:

در این مطالعه، داربست‌های نانوالیافی PCL/GEL/LDH/hymecromone الکترونیسی‌شده را به عنوان سیستم دارورسانی ساخته شد. داربست پلی‌کاپرولاکتون در ترکیب با ژلاتین دارای خاصیت آبدوستی و زیست تخریب پذیری بیشتری می‌گردد [۲۴] علاوه بر آن اضافه کردن LDH به داربست PCL/GEL استحکام مکانیکی داربست و ازدیاد طول آن را بهبود می‌بخشد [۴۱] نتایج SEM و تست کششی نانوالیاف نشان داد که بهترین خواص مکانیکی در داربست حاوی ۱ درصد وزنی LDH است، بنابراین از این داربست برای انجام مطالعات سلولی استفاده شد. نتایج MTT نشان داد که داربست پلیمری PCL/GEL/LDH نه تنها هیچ گونه عارضه جانبی برای سلول‌ها ایجاد نمی‌کند بلکه باعث افزایش زنده مانی در سلول‌های B16F10 شد. ترکیب داروی ضد سرطان هایمکرومون با نانوذرات LDH و پلیمرهای PCL/GEL از طریق تسهیل نفوذ دارو به سلول‌ها، افزایش پایداری دارو و تحویل مداوم دارو به سلول‌های B16F10 باعث کاهش موثرتر زنده مانی این سلول‌ها نسبت به استفاده از داروی هایمکرومون به تنهایی بود. همچنین به علت رهایش مداوم دارو از سیستم PCL/GEL/LDH/hymecromone زنده مانی پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون کاهش بیشتری نسبت به ۲۴ ساعت انکوباسیون داشته است. بنابراین استفاده از داربست نانوالیافی PCL/GEL/LDH/hymecromone گزینه‌ای مناسب به عنوان سیستم‌های دارورسانی در زمینه‌های زیست پزشکی است.

۶. مراجع

1. Naves, L.B., Dhand, C., Venugopal, J.R. et al. Nanotechnology for the treatment of melanoma skin cancer. *Prog Biomater* 6, 13–26 (2017). <https://doi.org/10.1007/s40204-017-0064-z>
2. Barriera-Silvestrini P, Iacullo J, Knackstedt TJ. American joint committee on cancer staging and other platforms to assess prognosis and risk. *Clin Plast Surg* 2021;48(4):599-606. doi:10.1016/j.cps.2021.05.004
3. Saeidi, Z., et al. (2023). "Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems in the Transdermal Treatment of Melanoma." *Adv Pharm Bull* 13(4): 646-662.
4. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of Melanoma. *Med Sci (Basel)* (2021) 9(4):63. doi: 10.3390/medsci9040063
5. Sabt, A.; Abdelhafez, O.M.; El-Haggag, R.S.; Madkour, H.M.F.; Eldehna, W.M.; El-Khrisy, E.E.A.M.; Abdel-Rahman, M.A.; Rashed, L.A. Novel coumarin-6-sulfonamides as apoptotic anti-proliferative agents: Synthesis, in vitro biological evaluation, and QSAR studies. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2018, 33(1), 1095-1107. <http://dx.doi.org/10.1080/14756366.2018.1477137> PMID: 29944015
6. Chuang, J-Y.; Huang, Y-F.; Lu, H-F.; Ho, H-C.; Yang, J-S.; Li, T-M.; Chang, N-W.; Chung, J-G. Coumarin induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through a mito-chondria- and caspase-3 dependent mechanism and NF-kappaB down-regulation. *In Vivo*, 2007, 21(6), 1003-1009. PMID: 18210747
7. Kimura, Y.; Sumiyoshi, M. Antitumor and antimetastatic actions of dihydroxycoumarins (esculetin or fraxetin) through the inhibition of M2 macrophage differentiation in tumor-associated macrophages and/or G1 arrest in tumor cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 2015, 746, 115-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.10.048> PMID: 25445053
8. Lee, S.; Sivakumar, K.; Shin, W-S.; Xie, F.; Wang, Q. Synthesis and anti-angiogenesis activity of coumarin derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, 16(17), 4596-4599. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.06.007> PMID: 16793260
9. Yasser Fakri Mustafa, Noora Thamer [Abdulaziz. Biological potentials of Hymecromone-based derivatives: A systematic review. Sys Rev Pharm](#) 2020;11(11):438-452
10. Noora Thamer Abdulaziz, Yasser Fakri Mustafa, Anticancer properties of hymecromone-derived compounds: A [review. ISSN](#) 0975-2366 DOI: <https://doi.org/10.31838/ijpr/2021.13.01.347>
11. Kim, T., et al. (2023). "A 7-Hydroxy 4-Methylcoumarin Enhances Melanogenesis in B16-F10 Melanoma Cells." *Molecules* 28(7).
12. Zeng H, Li J, Hou K, Wu Y, Chen H, Ning Z. Melanoma and Nanotechnology-Based Treatment. *Front Oncol.* 2022 Mar 9;12:858185. doi: 10.3389/fonc.2022.858185. PMID: 35356202; PMCID: PMC8959641.
13. Malikmammadov, E.; Tanir, T.E.; Kiziltay, A.; Hasirci, V.; Hasirci, N. PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2018, 29, 863–893[CrossRef][PubMed].

14. Amir-Reza Arvaneh, Mehdi [Sadat-Shojai](#). Biodegradable Aliphatic Polyesters for Application in Tissue [Engineering.Iran](#). J. Polym. Sci. Technol. (Persian), Vol. 34, No. 4, 319-348 October-November 2021 ISSN: 1016-3255 Online ISSN: 2008-0883 DOI: 10.22063/JIPST.2021.2929.2081
15. V. R. Sinha, K. Bansal, R. Kaushik, R. Kumria, and A. Trehan, Int. J. Pharm. 278, 1–23(2004), <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.01.044>.
16. Hajiali, F., S. Tajbakhsh and A. Shojaei (2018). "Fabrication and properties of polycaprolactone composites containing calcium phosphate-based ceramics and bioactive glasses in bone tissue .207-4engineering: a review." Polymer reviews 58(1): 16
17. Liu, X.; Won, Y.; and Ma, P.X., Journal of Bio-medical Materials Research Part A. 74(1), 84-91, 2005
18. Bhavsar MD, Amiji MM (2008). "Development of novel biodegradable polymeric nanoparticles-in-microsphere formulation for local plasmid DNA delivery in the gastrointestinal tract". AAPS PharmSciTech. 9 (1): 288–94.
19. Y. Wan, X. Lu, S. Dalai, and J. Zhang, Thermochim. Acta 487, 33–38 (2009), <https://doi.org/10.1016/j.tca.2009.01.007>
20. Alihosseini, F. (2016). Plant-based compounds for antimicrobial textiles. antimicrobial [textiles.Elsevier](#): 155-19
21. R. Ortega-Toro, G. Santagata, G. Gomez d' Ayala, P. Cerruti, P. T. Oliag, M.A. Chiralt Boix, and M. Malinconico, Carbohydr. Polym. 147, 16–27 (2016), <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.070>.
22. Oh, J. M., et al. (2011). "Intracellular drug delivery of layered double hydroxide nanoparticles." J Nanosci Nanotechnol 11(2): 1632-1635.
23. Xu, R., et al. (2023). "Recent Advances in Biodegradable and Biocompatible Synthetic Polymers Used in Skin Wound Healing." Materials (Basel) 16(15).
24. Santoro M, Tatara AM, Mikos [AG.Gelatin](#) carriers for drug and cell delivery in tissue engineering. J Control Release 2014;190:210-18 .. A review highlighting some of the latest studies performed on gelatin modifications for immune system evasion, drug stabilization and targeted delivery, as well as gelatin composite systems based on synthetic or natural polymers.
25. Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos AG. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. J Control Release 2005;109:256-74. A review describing gelatin as a carrier matrix for controlled release of bioactive molecules for several applications.
26. Wang H, Zou Q, Boerman OC, et al. Combined delivery of BMP-2 and bFGF from nanostructured colloidal gelatin gels and its effect on bone regeneration in vivo. J Control Release 2013;166:172-81
27. Kim YH, Furuya H, Tabata Y. Enhancement of bone regeneration by dual release of a macrophage recruitment agent and platelet-rich plasma from gelatin hydrogels. Biomaterials 2014;35:214-24
28. Madan J, Pandey RS, Jain UK, et al. Sterically stabilized gelatin microassemblies of noscapine enhance cytotoxicity, apoptosis and drug delivery in lung cancer cells. Colloids Surf B Biointerfaces 2013;107:235-44
29. Lee SJ, Yhee JY, Kim SH, et al. Biocompatible gelatin nanoparticles for tumor-targeted delivery of polymerized siRNA in tumor-bearing mice. J Control Release 2013;172:358-66
30. Kimura Y, Tabata Y. Controlled release of stromal-cell-derived factor-1 from gelatin hydrogels enhances angiogenesis. J Biomater Sci Polym Ed 2010;21:37-51

31. Saito T, Tabata Y. Preparation of gelatin hydrogels incorporating low-molecular-weight heparin for anti-fibrotic therapy. *Acta Biomater* 2012;8:646-52
32. Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL (2007) Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv Drug Del Rev.* 59(14):1413–1493
33. Shyna, S.; Nair, P.D.; Thomas, L.V. A nonadherent chitosan-polyvinyl alcohol absorbent wound dressing prepared via controlled freeze-dry technology. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 150, 129–140.
34. Pike RD (1999). Superfine microfiber nonwoven web. US Patent 5965883 A
35. Whilton NT, Vickers PJ, Mann S. Bioinorganic clays: synthesis and characterization of amino- and polyamino acid intercalated layered double hydroxides. *J Mater Chem* 1997;7(8):1623-9
36. Choy J-H, Kwak S-Y, Park J-S, Jeong Y-J. Cellular uptake behavior of [g-32P]. labeled ATP-LDH nanohybrids. *J Mater Chem* 2001;11(6):1671-4
37. Xu ZP, Zeng QH, Lu GQ, Yu AB. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chem Eng Sci* 2005;61(3):1027-40
38. Kriven WM, Kwak S-Y, Wallig MA, Choy J-H. Bio-resorbable nanoceramics for gene and drug delivery. *MRS Bulletin* 2004;29(1):33-7
39. Xu ZP, Niebert M, Porazik K, et al. Subcellular compartment targeting of layered double hydroxide nanoparticles. *J Control Release* 2008;130(1):86-94
40. Choy J-H, Kwak S-Y, Jeong Y-J, Park J-S. Inorganic layered double hydroxides as nonviral vectors. *Angew Chemie Int Ed* 2000;39(22):4042-5
41. Choy J-H, Kwak S-Y, Park J-S, et al. Intercalative nanohybrids of nucleoside monophosphates and DNA in layered metal hydroxide. *J Am Chem Soc* 1999;121(6):1399-400
42. W. Jin, D. Lee, Y. Jeon, D.-H. Park, *Minerals* 10, 172 (2020)
43. F. Lv, L. Xu, Y. Zhang, Z. Meng, *ACS Appl. Mater.* 7, 19104 (2015)
44. S. Senapati, R. Thakur, S.P. Verma, S. Duggal, D.P. Mishra, P. Das et al., *J. Control Release* 224, 186 (2016)
45. V.A. Shirin, R. Sankar, A.P. Johnson, H. Gangadharappa, K. Pramod, *J. Control Release* 330, 398–426 (2020)
46. A.K. Barui, R. Kotcherlakota, V.S. Bollu, S.K. Nethi, C.R. Patra, *Biopolymer-Based Composites* (Elsevier, New York, 2017), p. 325
47. S. Saha, S. Ray, R. Acharya, T.K. Chatterjee, J. Chakraborty, *Appl. Clay Sci.* 135, 493 (2017)
48. Ahmadi, S., et al. (2022). "Electrospun Nanofibrous Scaffolds of Polycaprolactone/Gelatin Reinforced with Layered Double Hydroxide Nanoclay for Nerve Tissue Engineering Applications." *ACS Omega* 7(32): 28351-28360.
49. Wong, Shing & Baji, Avinash & Leng, Siwei. (2008). Effect of fiber diameter on tensile properties of electrospun poly(ε-caprolactone). *Polymer.* 49. 4713-4722. 10.1016/j.polymer.2008.08.022.
50. Talebi, et al. (2019). "Proliferation and differentiation of mouse spermatogonial stem cells on a three-dimensional surface composed of PCL/gel nanofibers." *Int J Morphol* 37 (3), 1132-1141, 2019

51. Semitela, A., et al. (2020). "Electrospinning of bioactive polycaprolactone-gelatin nanofibres with increased pore size for cartilage tissue engineering applications." *J Biomater Appl* 35(4-5): 471-484.
52. Rojas, R.; Mosconi, G.; Pablo, J.; Gil, G.A. Layered double hydroxide applications in biomedical implants. *Appl. Clay Sci.* 2022, 224, 106514.
53. JH Multifunctional Layered Double Hydroxides for Drug Delivery and Yu S, Choi G, Choy
PMID: .۱۳۰۶۱۱۰۲ nano/۱۰.۳۳۹۰ doi: .۱۱۰۲:(۶)۱۳;۱۹ Mar ۲۰۲۳ Imaging. *anomaterials* (Basel).
۱۰۰۵۸۷۰۵ PMCID: PMC ;۳۶۹۸۵۹۹۶
54. Electrospun Janus .Yang, J.; Wang, K.; Yu, D.G.; Yang, Y.; Bligh, S.W.A.; Williams, G.R .۵۳
nanofibers loaded with a drug and inorganic nanoparticles as an effective antibacterial wound
[CrossRef] .۱۱۰۸۰۵ ,۱۱۱ ,۲۰۲۰ dressing. *Mater. Sci. Eng. C*
55. rids of Lv, H.; Guo, S.; Zhang, G.; He, W.; Wu, Y.; Yu, D.G. Electrospun structural hyb .۵۴
.۴۲۸۶ ,۱۳ ,۲۰۲۱ polyacrylonitrile at acyclovir for modifying drug release. *Polymers -acyclovir*
[CrossRef]
56. Maestri, G.; Boemo, R.L.; Soares, L.D.A.; de Souza, A.A.U.; Immich, A.P.S. Development .۵۵
for epistaxis treatment. *J. Drug Deliv. Sci. of drug reservoirs based on nanofibers and capsules*
[CrossRef] .۱۰۱۳۹۸ ,۵۵ ,۲۰۲۰ Technol.
57. Bishari, Bilal A. -Baadani, Kendrick Hii Ru Yie, Abdullrahman M. Al-Mohammed A. Al .۵۶
n Shen, Alshobi, Zixin Zhou, Kai Fang, Binwei Dai, Yiding Shen, Jianfeng Ma, Jinsong Liu, Xinku
electrospinning polycaprolactone/gelatin membrane as a tunable drug delivery system for bone -Co
,۱۲۷۵-۰۲۶۴ ISSN ,۱۰۹۹۶۲ ,۲۰۲۱ ,۲۰۹ tissue regeneration, *Materials & Design*, Volume
.۲۰۲۱.۱۰۹۹۶۲ j.matdes./۱۰.۱۰۱۱ https://doi.org/
58. ckson, J.K., Plackett, D. et al. The application of layered double Chakraborti, M., Ja .۵۷
glycolic acid) (PLGA) film composites for the controlled -co-poly(lactide-hydroxide clay (LDH)
(۲۰۱۲) ۱۷۱۳-۱۷۰۵ ,۲۳ release of antibiotics. *J Mater Sci: Mater Med*
y-۴۶۳۸-۰۱۲-۱۰۸۵۶ s/۱۰.۱۰۰۷ https://doi.org/
59. Khandwekar, A.P.; Patil, D.P.; Shouche, Y.; and Doble, M.; *Journal of biomaterials*
applications. 26(2), 227-252, 2010.
60. Dhanaraju, M.D.; Gopinath, D.; Ahmed, M.R.; Jayakumar, R.; Vamsadhara, C. Characterization
of polymeric poly(epsilon-caprolactone) injectable implant delivery system for the controlled
delivery of contraceptive steroids. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2006, 76, 63-72.
61. Sun H, Zhang H, Evans DG, et al. Synthesis and characterization of nanoscale magnetic drug-
inorganic composites. *Chin Sci Bulletin* 2005;50(8):752-7
62. Zhu, Chaojie, Jiang, Jianping, Jia, Yingbo, Xu, Zhi Ping, and Zhang, Lingxiao (2023). Beyond
drug delivery system: immunomodulatory layered double hydroxide nanoadjuvants take an
essential step forward in cancer .immunotherapy. *Accounts of Materials Research* 4 (9) 758-771
- 63.62. TY - CHAP AU - Govind Kumar Sharma AU - Nirmala Rachel James ED - Maaz Khan ED
- Samson Jerold Samuel Chelladurai Y1 - 2022-08-23 PY - 2022 T1 - Electrospinning: The
Technique and Applications - BT - Recent Developments in Nanofibers Research SP - Ch. 1 UR -
https://doi.org/10.5772/intechopen.105804 DO - 10.5772/intechopen.105804 SN - 978-1-80356-
387-9 PB - IntechOpen CY - Rijeka Y2 - 2024-11-15 ER -
- 64.63. Bi, Xue & Zhang, Hui & Dou, Liguang. (2014). Layered Double Hydroxide-Based
Nanocarriers for Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 6. 298-332. 10.3390/pharmaceutics6020298.