

بررسی تاثیر نسبت ترکیب نانولیفچه‌های کیتوسان/نانوذرات اکسید روی بر روی خصوصیات نانوالیاف مرکب تولید شده

مرضیه رنجبر محمدی^{۱*}، پریناز شکوری^۱

^۱ گروه مهندسی نساجی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بناب، بناب، ایران
M.Ranjbar@ubonabu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۹

چکیده

هدف: در این مطالعه قابلیت استفاده از ساختار نانولیفی، با تقلید از ماتریس خارج سلولی (ECM) طبیعی بدن متشکل از کراتین/پلی وینیل الکل (K/PVA) و پلی لاکتیک اسید (PLA) به همراه نانولیفچه کیتوسان/نانوذرات اکسید روی (ZnONPs/CHNF) (CSZ) مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از روش الکترورسی، داربست‌های نانولیفی هیبریدی با استفاده از K/PVA و PLA تولید شدند. برای این منظور، محلول K/PVA از یک سرنگ و محلول PLA از یک سرنگ دیگر تزریق شدند نانوالیاف هیبریدی تولید شود. نانوالیاف (ZnONPs/CHNF) (CSZ) در سه نسبت مختلف (۱:۰، ۱:۱ و ۱:۲) به محلول‌های پلیمری حاوی K/PVA اضافه شدند تا تاثیر نسبت ترکیب این ساختارها بر روی خصوصیات محصول نهایی ارزیابی گردد. نتایج نشان داد که افزودن ZnONPs به محلول CSZ منجر به کاهش قطر نانوالیاف و افزایش زاویه تماس داربست‌های تولیدی شد. همچنین، رشد گسترده و مناسبی از سلول‌های فیبروبلاست بر روی نمونه (۲:۱) PLA/CSZ - (۲:۱) K/PVA/CSZ مشاهده شد. این نمونه به علت داشتن قطر 352.50 ± 31 نانومتر و زاویه ترشوندگی $47 \pm 3^\circ$ درجه، به‌طور نزدیکی ساختار ECM بدن را بیان می‌کند و نسبت سطح به حجم بالایی دارد که باعث افزایش سرعت رشد، چسبندگی و تکثیر سلولی می‌شود و به عنوان نمونه بهینه گزارش شد.

کلمات کلیدی: کراتین، پلی وینیل الکل، پلی لاکتیک اسید، نانولیفچه کیتوسان/نانوذرات اکسید روی، نانوالیاف

Investigation of the effect of the composition ratio of chitosan nanofibrils/zinc oxide nanoparticles on the properties of the produced composite nanofibers

Marziyeh Ranjbar-Mohammadi^{1*}, Parinaz Shakoori¹

¹Textile group, Faculty of Engineering, University of Bonab, Bonab, Iran

M.Ranjbar@ubonabu.ac.ir

Abstract

This study investigated the potential application of a nanofibrous structure mimicking the natural extracellular matrix (ECM) of the body, composed of keratin/polyvinyl alcohol (K/PVA), polylactic acid (PLA), and chitosan nanofibrils/zinc oxide nanoparticles (ZnONPs/CHNF) (CSZ). In this research, hybrid nanofibrous scaffolds were produced using K/PVA and PLA via the electrospinning method. K/PVA from one syringe and PLA from another were injected to produce hybrid nanofibers. Nanofibrillated chitosan/zinc oxide nanoparticles (ZnONPs/CHNF) (CSZ) at three different blend ratios (1:0, 2:1, and 1:2) were incorporated into the polymeric solutions containing K/PVA. The hydrophilicity of the samples was evaluated by measuring the contact angle, and the morphology of the produced scaffolds was examined using a scanning electron microscope (SEM). The effect of CSZ on morphology, hydrophilicity, and cell culture properties was then assessed. The results demonstrated that the addition of ZnONPs to the CSZ solution led to a reduction in nanofiber diameter and an increase in the contact angle of the produced scaffolds. Extensive and suitable fibroblast cell growth was observed on the (2:1) PLA/CSZ-(2:1) K/PVA/CSZ sample. This sample, with a diameter of 352.50 ± 31 nm and a contact angle of $47 \pm 3^\circ$, closely mimics the structure of the body's extracellular matrix (ECM). Its high surface-to-volume ratio enhances cell adhesion, proliferation, and growth, identifying it as the optimal sample.

Keywords: Keratin, Poly vinyl alcohol, Polylactic acid, Nanofibers, Nanofibrillated chitosan/ZnO nanoparticles

۱-مقدمه

خاصیت ضد میکروبی مناسب، توسعه یافته و می‌تواند متناسب با نیاز خاص برای درمان زخم بکار رود. همچنین، این داربست‌ها به علت داشتن قطر و ساختار مشابه با ECM طبیعی بدن و نسبت سطح به حجم بالا، فرآیند رشد، چسبندگی، مهاجرت و تکثیر سلولی، سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست‌های الکترورسی شده را تسریع می‌کنند [۵].

از جمله مهم‌ترین عوامل در طراحی داربست نانولیفی، انتخاب زیست ماده مناسب برای ساختار با خواص مطلوب در کاربرد مدنظر می‌باشد. کراتین، یک پلیمر طبیعی و پروتئین غیرخوراکی فراوان است که به دلیل زیست سازگاری و زیست‌تخریب پذیری می‌تواند مشابه با فیبروئین و کلاژن در انواع کاربردهای پزشکی مورد استفاده قرار گیرد [۱، ۶]. خواص مکانیکی ضعیف کراتین بازسازی شده و بی‌ثبات بودن ساختار آن در محیط‌های آبی، موجب محدودیت در ترکیب با پلیمرهای مناسب با خواص ساختاری بهتر می‌شود [۶]. علاوه بر این، کراتین قابلیت دیسپرس شدن در آب را دارد ولی به دلیل عدم درگیری کافی و ضعف ساختاری‌اش، به تنهایی قابلیت استفاده در فرآیند الکترورسی را ندارد، برای حل این مسئله می‌توان از کراتین در مخلوط با پلیمر دیگری استفاده کرد [۷]. در مطالعه‌ای، نانو الیاف کامپوزیتی مبتنی بر کراتین که از موی انسان استخراج شد، همراه با پلی کاپرولاکتون (PCL) با نسبت‌های مختلف با استفاده از روش الکترورسی جهت کاربرد در مهندسی بافت تهیه شد. سپس خصوصیات فیزیکی-شیمیایی آن مانند

الکترورسی یک روش ساده و در عین حال پرکاربرد برای تولید نانوالیاف پلیمری با استفاده از نیروی الکترواستاتیک می‌باشد که در سال‌های اخیر به سرعت توسعه یافته است [۱]. نانوالیاف تولید شده با استفاده از روش الکترورسی، در بسیاری از حوزه‌های زیست‌پزشکی مانند داربست‌های مهندسی بافت، پانسمان زخم، ایمپلنت، رهایش دارو، همچنین منسوجات محافظتی و فرآیندهای غشائی ظهور پیدا کرده‌اند [۲].

نانوالیاف پلیمری به دلیل توانایی آنها در تقلید و ترمیم عملکرد ECM طبیعی موجود در بافت‌ها، برای تولید زیست‌مواد در کاربردهای زیست‌پزشکی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است [۳]. همچنین، بسیاری از پلیمرهای طبیعی دارای مکان‌های اتصال سلول و مشخصه زیست‌مولکولی هستند که می‌توانند بافت طبیعی را تقلید کنند، از طرفی پلیمرهای سنتزی نیز خواص مکانیکی خوبی در مقایسه با پلیمرهای طبیعی دارند، اما به دلیل آبریزی و عدم وجود مکان‌های سطحی شناسایی سلول، میل سلولی محدودی دارند. بنابراین، انتظار می‌رود سیستم الکترورسی هیبریدی به طور قابل توجهی خواص مواد را بهبود بخشد و داربست تولیدی برای طیف وسیعی از کاربردهای زیست‌پزشکی مناسب باشد [۴].

به دنبال توسعه مواد پزشکی و فناوری دارویی، داربست‌های نانولیفی الکترورسی شده با تخلخل بالا و بهم‌پیوسته، با تبادل بهتر اکسیژن، جذب رطوبت بالا و

شکل‌شناسی، استحکام مکانیکی، تبلور، ساختار شیمیایی و یکپارچگی در محیط آبی مورد بررسی قرار گرفت و سازگاری سلولی آن تعیین شد. نانوالیاف کراتین/پلی کاپرولاکتون (K/PCL) با نسبت (۱۰۰/۰) تا (۷۰/۳۰) یکنواختی خوبی در شکل‌شناسی، الیاف و خواص مکانیکی مناسب نشان داده شد و یکپارچگی ساختار لیفی خود را در محلول‌های بافر حفظ کردند [۸].

پلی وینیل الکل (PVA) نیز، یک پلیمر مصنوعی زیست سازگار و زیست تخریب پذیر، دارای مقاومت شیمیایی و خصوصیات فیزیکی و مکانیکی عالی، غیرسمی و بسیار آب دوست است که برای کاربردهای زیست‌پزشکی و زیست محیطی از جمله ترمیم زخم، حسگرهای زیستی، لباس‌های خود تمیز شونده جراحی و برای تصفیه پساب استفاده می‌شود [۹]. علاوه بر این PVA به علت داشتن قابلیت الکتروروسی آسان، به عنوان جزء دوم خوش‌ریس برای پلیمرهای طبیعی، جهت غلبه بر محدودیت‌های فرآیند الکتروروسی بکار می‌رود [۱۰، ۱۱]. در یک مطالعه، عصاره کدوی تلخ^۱ (MC) که یک داروی طبیعی برای بیماران دیابتی است، در ترکیب با PVA با استفاده از روش الکتروروسی بارگذاری شد. خواص ضدباکتریالی نانوالیاف PVA/MC با استفاده از روش انتشار دیسک بررسی شد و مشاهده شد که نانوالیاف PVA/MC دارای خصوصیات ضدباکتری بالایی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بودند. بررسی خواص شکل‌شناسی، نانوالیاف PVA/MS نشان داد که افزودن عصاره MC

به PVA باعث تشکیل دانه تسبیحی^۲ در هنگام الکتروروسی شده و با افزایش غلظت MC در محلول، تشکیل دانه تسبیحی‌ها افزایش یافت تا جایی که با رسیدن مقدار آن به ۵۰٪ پاشش محلول پلیمری نیز افزایش یافت. بنابراین نمونه‌های دارای ۴۰٪ MC با ویژگی‌های شکل‌شناسی، ضدباکتریالی و خواص حرارتی بهتر، به عنوان نمونه بهینه معرفی شدند. احتمال واکنش شیمیایی بین عامل‌های فعال PVA و MC نیز توسط FTIR-ATR مشاهده شد، اما تغییر پیک قابل توجهی مشاهده نشد. سمیت سلولی نانوالیاف تهیه شده نیز نتایج رضایت بخشی داشت. تبلور و خواص مکانیکی نیز توسط پراش اشعه (XRD) و (UTM) مورد مطالعه قرار گرفت. اما استحکام کششی با افزایش غلظت عصاره MC در محلول PVA/MC کاهش یافت [۹].

اسپارزا^۳ و همکارانش در سال ۲۰۱۷، نانوالیاف مخلوط کراتین پر (K) و پلی وینیل الکل (PVA) با ۱۰، ۲۰ و wt. % ۳۰ K، را با استفاده از فرآیند الکتروروسی جهت کاربردهای مربوط به مهندسی بافت تولید نمودند. نتایج بررسی‌ها نشان داد که با افزایش غلظت K از ۰٪ به ۲۰٪، ویسکوزیته‌ی محلول پلیمری کاهش یافته و منجر به کاهش قطر آنها از ۵۶۵ nm به ۲۷۴ nm شد. علاوه بر این، بر روی داربست‌های تولیدی از محلول K/PVA، کشت سلولی انجام شد و بعد از ۱۴ روز مشاهده شد که تکثیر سلولی روی داربست حاوی ۲۰٪ K بیشتر است [۱۲].

² beads³ Esparza¹ Momordicaccharantia

پلی لاکتیک اسید (PLA) یک پلیمر زیست تخریب پذیر است که به دلیل خواص مطلوب و سهولت در تهیه، مورد توجه و مطالعه‌های گسترده‌ای قرار گرفته است. این پلیمر به خاطر زیست‌سازگاری، استحکام مکانیکی خوب و پایداری در برابر سلول‌ها، بافت‌ها، آنزیم‌ها و مواد مختلف بدن، به عنوان گزینه‌ای مناسب برای کاربردهای زیست پزشکی شناخته می‌شود [۱۳].

با این حال، از معایب این پلیمر می‌توان به پایداری حرارتی پایین، خواص بازدارندگی ضعیف و شکنندگی زیاد آن اشاره کرد، که سبب محدود شدن کاربرد آن در بعضی صنایع شده است [۱۴]. زاهدی و همکاران در سال ۲۰۱۲، تولید نانوالیاف کامپوزیتی PLA/PCL با نسبت ۲۵۰ و ۵۰۰ $\mu\text{g/mL}$ داروی تتراسایکلین هیدروکلراید را جهت کاربرد به عنوان پانسمان زخم مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه با نتایج یک نمونه تجاری شناخته شده‌ی پانسمان زخم به نام کامفیل^۱، از نظر سرعت آزادسازی پایدار و مناسب دارو، جذب آب، نفوذپذیری و فعالیت‌های ضدباکتریالی مقایسه شد. نتایج آنالیز SEM نشان داد که نمونه‌های PLA، PCL و PLA/PCL (۵۰/۵۰) با PLA/PCL با غلظت‌های ۱۲ و ۱۵ wt. % مناسب‌ترین شکل‌شناسی، را داشتند. همچنین نتایج حاصل از آزمایش نفوذ پذیری بخار آب و زاویه تماس برای نمونه‌های PLA، PCL و PLA/PCL (۵۰/۵۰)، بیشترین مقدار بود. همچنین، برای نمونه (۵۰/۵۰) PLA/PCL همراه با ۵۰۰ $\mu\text{g/mL}$ داروی تتراسایکلین هیدروکلراید، بالاترین

نرخ رهایش دارو در حدود ۷۰٪ در محلول بافر فسفات و موثرترین فعالیت ضدباکتری در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس^۲ در بین سایر نمونه‌ها، گزارش شد. علاوه بر این، نتایج نشان داد که نانوالیاف حاوی PCL و PLA/PCL نسبت به پانسمان‌های زخم تجاری عملکرد بهتری نسبت به میزان جذب و نفوذپذیری آب در میزان جذب دارو و فعالیت ضدباکتریالی داشتند [۱۵].

کیتوسان زیست پلیمری ارزان قیمت و فراوان در طبیعت است [۱۶] که مشتق شده از کیتین می‌باشد [۱۷] در پوسته‌ی سخت پوستان و قارچ‌ها یافت می‌شود و با دی اسیله کردن جزئی از کیتین به دست می‌آید. وجود دو گروه عاملی آمینو و هیدروکسیل در کیتوسان سبب شده است که این پلیمر قابلیت پیوند با یون‌های فلزی را داشته باشد و [۱۸] سبب سرعت یافتن زیست تخریب پذیری، زیست‌سازگاری، فعالیت ضدباکتریالی و بازسازی بافت می‌شود [۱۹]. استفاده از آن در ساختار محلول پلیمری برای تهیه نانوالیاف در کاربردهای زیستی مختلف به وفور بررسی شده است اما تهیه نانوالیاف به تنهایی از این پلیمر با روش الکتروریسی، به راحتی مقدور نیست [۲۰]. در پژوهش عادل و همکاران در سال ۲۰۱۸، داربست‌های نانولیفی PVA/کیتوسان/نشاسته برای کاربرد در مهندسی بافت پوست و استفاده به عنوان زخم‌پوش و پانسمان ارائه شد. برای تهیه داربست‌های فوق، محلول کیتوسان ۲٪ حل شده در استیک اسید و ۹٪ PVA حل شده در آب مقطر را تهیه نموده و نشاسته در نسبت‌های مختلف ۵،

² Staphylococcus aureus

¹ Comfeel Plus

شد. طبق تصاویر SEM و AFM (میکروسکوپ نیروی اتمی) نانوالیاف تولیدی، میانگین قطر و دامنه عرض CHNF به ترتیب ۷۹ و ۳۵-۱۹۰ nm گزارش شد. علاوه بر این، تکثیر و چسبندگی سلول‌ها با ترکیب CHNF به نانوالیاف افزایش یافت. نتایج نشان داد که داربست PCL/CHNF می‌تواند برای کاربردهای مهندسی بافت مناسب باشد [۲۱].

نانوذرات روی اکسید (ZnONPs)، یکی از نانوذرات غیرآلی شناخته شده است که خواص فوق العاده‌ای همچون فعالیت ضد میکروبی بالا برای گستره‌ای از میکروارگانیسم‌ها، سمی نبودن در غلظت‌های کم، محافظت در برابر پرتو UV و پایداری زیادی دارند. از این نانوذرات در صنایع مختلف از جمله داروسازی و پزشکی استفاده می‌شود [۲۳]. همچنین، این نانوذرات نسبت به عوامل ضدباکتریالی آلی با ثبات‌تر بوده و از نسبت سطح به حجم بالا برخوردار هستند [۲۴]. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۹، نانوکامپوزیت‌هایی حاوی ژلاتین/CHNF به همراه ZnONPs (G.CHNF.ZnONPs) برای بسته بندی مواد غذایی زیست‌تخریب پذیر تولید شد. نتایج نشان داد که نانوکامپوزیت‌های تولیدی خواص مکانیکی بالا، زیست سازگاری و خواص دفع آب مناسبی داشتند. علاوه بر این، اثر هم‌افزایی بین CHNF و ZnONPs اثر ضدباکتریالی نانوکامپوزیت را بهبود بخشید که برای بسته بندی مواد غذایی مناسب هستند. از بین نمونه‌ها، نانوکامپوزیت G.CHNF.ZnONPs فعالیت ضدباکتریالی بالایی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به

۱۰ و ۱۵ wt.% به محلول کیتوسان و PVA در مدت دو ساعت اضافه گردید، سپس محلول‌های تهیه شده، الکتروریسی شدند. ساختار یکنواخت و بدون دانه تسبیحی، تخلخل پیوسته، چسبندگی و تکثیر سلولی مناسب، استحکام بالا، جذب بالای ترشحات زخم، تبادل گازی و داشتن خواص ضدباکتریالی بالا در برابر باکتری‌های گرم منفی اشریشیاکلی و گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس، از جمله ویژگی‌های عالی داربست‌های تولیدی بود [۱۰].

نانولیفچه کیتوسان (CHNF) را می‌توان به طور مشابه به عنوان نانو پرکننده^۱ دوست‌دار محیط زیست که قابلیت استفاده در کامپوزیت‌های پلیمری را دارد، معرفی نمود [۲۱]. CHNF ساختارهایی هساند که قطر کمتر از ۱۰۰ nm دارند. پس از تبدیل کیتوسان به CHNF، برخی خواص آن از جمله تبلور، چگالی بار سطحی و خاصیت ضد میکروبی افزایش می‌یابد. تخلخل زیاد، نسبت سطح به حجم بالا، اندازه کم منافذ بین لیفی از دیگر مزایای CHNF می‌باشد [۲۲]. در مطالعات قبلی، زیست نانوکامپوزیت PCL/CHNF توسط روش الکتروریسی ارائه شد. محلول خالص PCL با غلظت ۸ و ۱۰ wt.% قابل الکتروریسی نبوده، اما با افزودن ۵-۱۰٪ CHNF، این محلول دارای قابلیت الکتروریسی شد. همچنین افزودن CHNF با تغییرات قابل توجهی در ویسکوزیته، باعث بهبود خصوصیات مکانیکی، رسانایی و الکتروریسی‌پذیری محلول‌ها و همچنین رطوبت پذیری داربست‌های تولیدی

^۱ nanofiller

۲-۱-مواد

پلی لاکتیک اسید (PLA) نوع D3251 محصول شرکت NatureWorks آمریکا با Mn و Mw به ترتیب برابر ۲۹۰۰۰ و ۵۲۰۰۰ g/mol استفاده شد. کراتین (K) استخراج شده از پشم گوسفندی از شرکت افشاری خریداری شد [۲۷]. پلی وینیل الکل (PVA) دارای وزن مولکولی ۷۲ KDa (۹۹/۵٪) = (Hy) از شرکت مرک خریداری شد. ژل آبی کیتوسان با درجه استیل زدایی ۸۵٪ از شرکت نانو نوین پلیمر با درجه استیلاسیون ۸۵٪ تهیه شد. (کیتوسان مورد استفاده، دارای وزن مولکولی ۵۰ تا ۸۰ KDa، قطر و طول CHNF به ترتیب ۴۳ nm و بیشتر از ۵ μm است). همچنین دی کلرومتان، با درجه خلوص ۹۸٪ نیز برای حل نمودن PLA استفاده گردید. ترکیب‌های ۱:۲ و ۲:۱ CSZ از دانشگاه گلستان تهیه شدند که به ترتیب شامل ۰/۶ g CHNF (نانوژل g % ۲/۵ وزنی) و ۰/۳ g روی اکسید و ۰/۳ g CHNF (نانوژل g % ۲/۵ وزنی) ۰/۶ g روی اکسید می‌باشد.

۲-۲- دستگاه ها و روش‌ها

۲-۲-۱-تهیه‌ی محلول‌های مورد نیاز برای

الکترورسی

ترکیبات نانو هیبریدی CSZ با نسبت‌های مختلف (۲:۱) و (۱:۲) از گروه مهندسی پلیمر دانشگاه گلستان در قالب هدیه دریافت گردید. محلول کراتین/پلی وینیل الکل (۵۰/۵۰) K/PVA با غلظت

باکتری گرم منفی اشرشیاکلی^۱ و آئروژینوزا^۲ نشان داد [۲۴].

در مطالعات پیشین، مقدار بهینه ترکیب CHNF/ZnONPs (CSZ) در ابتدا بر روی نمونه PLA با استفاده از طراحی آزمایش تاگوچی با تغییر دادن فاکتورهای غلظت PLA، غلظت CSZ و ترکیب درصد به دست آمد سپس مقدار بهینه (۱۰ wt/%) در مطالعات قبلی ما گزارش شد [۲۵]. سپس، تولید داربست‌های هیبریدی نانولیفی شامل K/PVA و PLA به عنوان اجزای اصلی و CSZ به عنوان عنصر نانوپرکننده با استفاده از روش الکترورسی دو نازله مورد بررسی قرار گرفت و خصوصیات حرارتی، زبری سطحی، ضد باکتری داربست های تهیه شده مورد بررسی قرار گرفت [۲۶]. در این مقاله، اثر تغییر نسبت ترکیب CSZ، ۱:۰، ۲:۱ و ۱:۲ بر خواص شکل شناسی، آبدوستی و رفتار سلولی ساختارها مورد بررسی قرار گرفت. CHNF برای تأمین خواص ضد میکروبی و زیستی مطلوب، K و PVA به علت داشتن زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری، غیرسمی و آبدوست بودن، همچنین پلیمر سنتزی PLA برای تأمین خواص مکانیکی و پایداری در محیط آبی و ZnONPs به دلیل داشتن خواص ضد میکروبی و ضد قارچ به کار گرفته شدند تا داربست مناسبی تهیه شود. شکل شناسی سلول‌ها بر روی ساختارهای تهیه شده مورد بررسی قرار گرفت.

۲- تجربیات

¹ Escherichia coli
² P. aeruginosa

برای تهیه داربست‌های نانولیفی از دستگاه الکتروریسی ساخت شرکت اطلس سازه آریا استفاده شد. ویژگی‌های آبدوستی و آبگریزی داربست‌های نانولیفی از جمله مهم‌ترین خواص تعیین‌کننده برای استفاده در کاربردهای زیستی می‌باشد. در این مطالعه، به این منظور تشخیص مقدار آبدوستی نمونه‌ها از روش چکاندن قطره آب روی سطح نانوالیاف با اندازه‌ی مربعی به مساحت 1 cm^2 و تهیه تصویر از شکل قطره استفاده شد. نحوه قرارگیری قطره روی سطح الیاف با تجهیزات ویدئویی مدل JIKAN CAG10-9610IL58300 ساخت شرکت CAG-10 تصویربرداری شد. سپس، با اندازه‌گیری زاویه تماس میان قطره آب و سطح نمونه، ماهیت آبگریزی یا آبدوستی داربست‌ها بررسی شد. برای گزارش مقدار زاویه آبدوستی از نرم‌افزار Image J استفاده شد. میکروسکوپ الکترونی پویشی مدل-JSM 810A ساخت کشور ژاپن برای مطالعه شکل شناسی و اندازه‌گیری قطر نانوالیاف تهیه شده به کار گرفته شد. از آنجا که SEM شعاع‌های الکترونی را به سطح نمونه می‌تاباند. بنابراین، سطح نمونه باید دارای رسانندگی الکتریکی باشد. از این‌رو، لایه نازکی از طلا روی سطح نمونه‌ها نشانداده شد. سپس، از نرم‌افزار Web Plot Digitalizer برای اندازه‌گیری قطر نانوالیاف الکتروریسی شده استفاده شد.

همچنین به منظور بررسی شکل‌شناسی سلول‌های فیبروبلاست بر نانوالیاف هیبریدی از میکروسکوپ

wt. % ۱۲ در آب حل شد [۲۶]. سپس هر یک از ترکیبات (CS) CHNF، CSZ(۲:۱) و CSZ(۱:۲)، با غلظت wt. % ۱۰ با توجه به وزن پلیمر خشک مورد استفاده برای تهیه محلول به ترتیب به محلول K/PVA اضافه شد. محلول‌های پلیمری حاوی K/PVA/CS، K/PVA/CSZ(۲:۱) و K/PVA/CSZ(۱:۲)، به یکی از سرنگ‌های دستگاه الکتروریسی تزریق شدند. همچنین PLA با غلظت wt. % ۹ در دی کلرومتان حل شد. این محلول پلیمری با یکی از ترکیبات CSZ حل شد و به نازل دوم تزریق شدند. سرانجام، جهت تولید داربست‌های K/PVA/CS-PLA/CS (۲:۱) و K/PVA/CSZ(۲:۱)PLA/CSZ (۱:۲) توسط دستگاه الکتروریسی دوناژله، در یک سرنگ ml ۱۰ با فاصله‌ی ریسندگی mm ۱۴۰، ولتاژ KV ۱۵ و با نرخ تغذیه ml/h ۱/۳ برای نازل اول و ml/h ۱ برای نازل دوم (مقدار نرخ تغذیه جهت تهیه الیاف با نسبت ترکیب ۵۰:۵۰ از دو محلول پلیمر مختلف K/PVA و PLA محاسبه شده است) مورد ریسندگی قرار گرفته و نانوالیاف بر روی جمع‌کننده‌ی دوار به صورت شبکه بی‌بافت جمع شدند. سپس قطر، شکل‌شناسی، زاویه تماس نانوالیاف و رفتار رشد سلول‌های فیبروبلاست بر روی ساختارهای نانولیفی بررسی شد.

۳- بررسی خواص نمونه‌ها

نانولیفی تولیدی مؤثر است. عواملی مانند قطر و یکنواختی قطری الیاف بر خواص شکل‌شناسی الیاف اثرگذارند. تصاویر SEM مربوط به نانوالیاف تولیدی به همراه منحنی هیستوگرام قطر در شکل ۱ و اندازه‌ی متوسط قطر نانوالیاف تولیدی نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود الیاف کاملاً صاف، یکنواخت و بدون مهره تولید شدند.

طبق شکل ۱، قطر محاسبه شده برای نمونه K/PVA/CS-PLA/CS، $30 \pm 374/22$ nm گزارش شد. با افزودن ZnONPs به ترکیب K/PVA/CS-PLA/CS قطر نانوالیاف تولید شده به میزان قابل توجهی کاهش یافت ($P_{\text{value}} \leq 0.05$) و قطر گزارش شده برای نانوالیاف (۲:۱) PLA/CSZ-PLA/CSZ(۱:۲) و K/PVA/CSZ(۲:۱) به ترتیب $31 \pm 352/50$ nm و $30 \pm 333/61$ بود. از آنجایی که ZnONPs یک ماده نیمه‌رسانایی است، در طول فرایند الکترورسی محلول پلیمری با ZnONPs دارای بار بیشتری بوده و باعث ایجاد نیروی الکتریکی قوی‌تر در حین تولید الیاف می‌شود و بنابراین قطر الیاف تولیدی کوچک‌تر می‌شود [۲۸]. یو^۲ و همکاران گزارش کردند که قطر نانوالیاف الکترورسی شده poly hydroxybutyrate (PHBV) (3 hydroxyvalerate) با افزودن wt. %

الکترونی روبشی نشر میدانی^۱ (FE-SEM) استفاده شد. سلول‌های فیبروبلاست از موسسه تحقیقات پاستور ایران، واقع در تهران، تهیه شدند. این سلول‌ها در شرایط استاندارد کشت سلولی نگهداری و مورد استفاده قرار گرفتند. محیط کشت مورد استفاده شامل DMEM (محیط کشت مناسب دیگر) به همراه ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی (FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین-استرپتومایسین) بود. سلول‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده شدند. بعد از گذشت ۷۲ ساعت کشت سلول بر روی نانوالیاف‌های هیبریدی، سلول‌ها سه مرتبه با PBS شست‌وشو و با گلو تار آلدهید ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه تثبیت شدند. به دنبال آن با استفاده از اتانول ۵۰، ۷۰، ۹۵ و ۱۰۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه، عملیات آگیری انجام گرفت. نمونه‌ها توسط هوا خشک و با ورقه طلا در ولتاژ ۱۵ KV تحت گاز آرگون پوشش و توسط میکروسکوپ FE-SEM مدل mira3 (Česko) تصاویر تهیه شد.

۴- نتایج و بحث

۴-۱- بررسی قطر و شکل شناسی نمونه‌ها

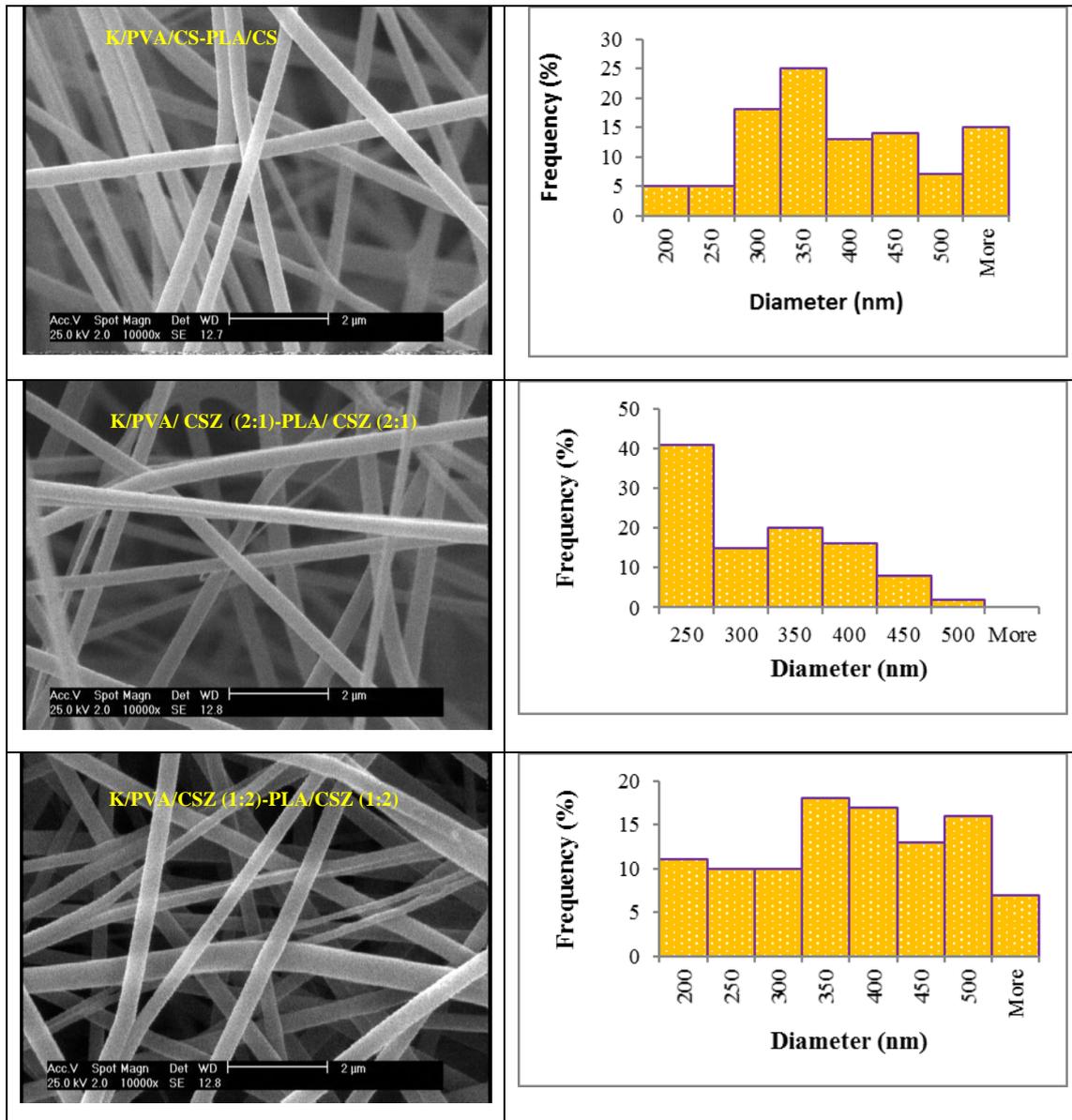
یکی از روش‌های پرکاربرد برای مشاهده ساختار نانوالیاف و بررسی شکل‌شناسی آن‌ها استفاده از SEM است که بر بسیاری از خواص داربست‌های

² Yu

¹ Field Emission Scanning Electron Microscope- FE-SEM

± 230 کاهش یافت [۲۹]

ZnONPs به PHBV از 12 ± 30 nm به ۷۰ nm



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

۲-۴- بررسی خاصیت ترشوندگی نمونه‌ها

طبیعت آبدوستی یا آبگریزی داربست‌ها در کاربردهای پزشکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا داربست نانولیفی باید با محیط آبی پیرامون محل اثر، در تعامل باشد. داربست‌های نانولیفی آبگریز ممکن است به علت دافعه از فاز آبی، از اتصال و چسبندگی سلول‌ها بر سطح-شان ممانعت به عمل بیاورند. بنابراین استفاده از پلیمرهای

آبدوست در کاربردهای پزشکی مدنظر است که می‌توان با اضافه نمودن پلیمرهای آبدوست، خاصیت ترشوندگی داربست را بهبود بخشید [۳۰]. اندازه گیری زاویه تماس آب برای ارزیابی ماهیت آب دوستی نانوالیاف در سه بار پس از عبور ۴ ثانیه از تشکیل قطره انجام شد. سپس میانگین زاویه تماس برای

داربست‌ها گزارش شد. شکل قطره بر روی هر غشا در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: نتایج زاویه تماس نانوالیاف پس از گذشت ۴ ثانیه

پلیمرکراتین بعنوان یکی از خانواده‌های لیفی شکل پروتئین هاست که دارای ماهیت آب دوست می‌باشد که در ساختارش گروه‌های آب دوست آزاد مانند آمین‌ها وجود دارد [۳۱]. نادری و همکارانش در سال ۲۰۲۰ به بررسی خصوصیات ترشوندگی نانوالیاف الکترورسی شده پلی ۳-هیدروکسی بوتیریت^۱ (PHB) و کراتین پرداختند. نتایج نشان داد که زاویه تماس داربست‌های تولیدی با افزودن کراتین به محلول پلیمری از ۱۲۰° به ۷۵° کاهش یافت. علت این امر با توجه به نتایج حاصل از XRD و DSC، کاهش تبلور الیاف و طبق نتایج FTIR، سبب تشکیل پیوند هیدروژنی بین PHB و کراتین شده که ترشوندگی سطح و کشش سطحی را بهبود می‌بخشد [۳۱]. پلی وینیل الکل، نیز یک پلیمر نیمه بلوری و آب دوست است؛ که ثبات حرارتی و شیمیایی مطلوبی دارد [۳۲].

طبق مطالعات قبلی، زاویه تماس نانو الیاف استات سلولزی حدود ۴۷° بود که با افزودن ZnONPs به ۱۲۴° افزایش یافت [۳۳]. لیو و همکاران نشان داد که زاویه تماس نانوالیاف بدون ZnONPs در حدود ۱۱۹/۳° است و با افزودن ۱، ۱/۵ و ۲ wt. % از ZnONPs به نانوالیاف، مقادیر گزارش شده به ترتیب ۱۲۹/۷°، ۱۳۴/۰° و ۱۲۸/۵° بود [۳۴].

۴-۳- شکل‌شناسی رشد سلول‌های فیبروبلاست بر

روی داربست‌ها

به منظور بررسی رفتار سلولی بر روی داربست‌های تهیه شده، از کشت سلول‌های فیبروبلاست بر روی داربست‌ها استفاده شد. سلول‌های فیبروبلاست به کار برده شده در این مطالعه، بعد از کشت به سمت داربست‌ها کشیده شده و شروع به چسبیدن به داربست‌ها کردند. نتایج تصاویر FE-SEM (شکل ۳) نشان داد که داربست‌های نانولیفی تولید شده، در ایجاد سیگنال قوی برای مهاجرت سلول‌ها به

پلیمرکراتین بعنوان یکی از خانواده‌های لیفی شکل پروتئین هاست که دارای ماهیت آب دوست می‌باشد که در ساختارش گروه‌های آب دوست آزاد مانند آمین‌ها وجود دارد [۳۱]. نادری و همکارانش در سال ۲۰۲۰ به بررسی خصوصیات ترشوندگی نانوالیاف الکترورسی شده پلی ۳-هیدروکسی بوتیریت^۱ (PHB) و کراتین پرداختند. نتایج نشان داد که زاویه تماس داربست‌های تولیدی با افزودن کراتین به محلول پلیمری از ۱۲۰° به ۷۵° کاهش یافت. علت این امر با توجه به نتایج حاصل از XRD و DSC، کاهش تبلور الیاف و طبق نتایج FTIR، سبب تشکیل پیوند هیدروژنی بین PHB و کراتین شده که ترشوندگی سطح و کشش سطحی را بهبود می‌بخشد [۳۱]. پلی وینیل الکل، نیز یک پلیمر نیمه بلوری و آب دوست است؛ که ثبات حرارتی و شیمیایی مطلوبی دارد [۳۲].

طبق شکل ۳، میانگین زاویه تماس برای نمونه K/PVA/CS-PLA/CS، $45 \pm 2^\circ$ با افزودن ZnONPs به ترکیب K/PVA/CS-PLA/CS ($45 \pm 2^\circ$) زاویه تماس نانوالیاف K/PVA/CSZ(۲:۱)-PLA/CSZ(۲:۱) و

طریق توانایی آن در تحریک شکل گیری بافت جدید، تسریع کند [۳۵].

۵- تعیین نمونه بهینه

طبق نتایج نشان داده شده، داربست نانولیفی (۲:۱)-K/PVA/CSZ(۲:۱)PLA/CSZ به دلیل داشتن ساختار یکنواخت و بدون مهره، با قطر $31 \pm 352/50$ nm، زاویه ترشوندگی $3^\circ \pm 47$ و رفتار رشد و تکثیر سلولی مناسب با داشتن مقدار کم ZnONPs ($0/3$ g) نسبت به دو نمونه‌ی دیگر، عملکرد بهتری از خود نشان داد.

ادغام نانوذرات خواص داربست را بدون به خطر انداختن یکپارچگی ساختاری آن افزایش می‌دهد و این امر آن را به گزینه‌ای بهینه برای کاربردهای بیولوژیکی تبدیل می‌کند. در نتیجه، توسعه چنین داربست‌های نانولیفی نشان‌دهنده پیشرفت قابل‌توجهی در زمینه زیست‌مواد است و راه‌حل‌های بالقوه‌ای برای بهبود مؤثر زخم و بازسازی بافت ارائه می‌دهد.

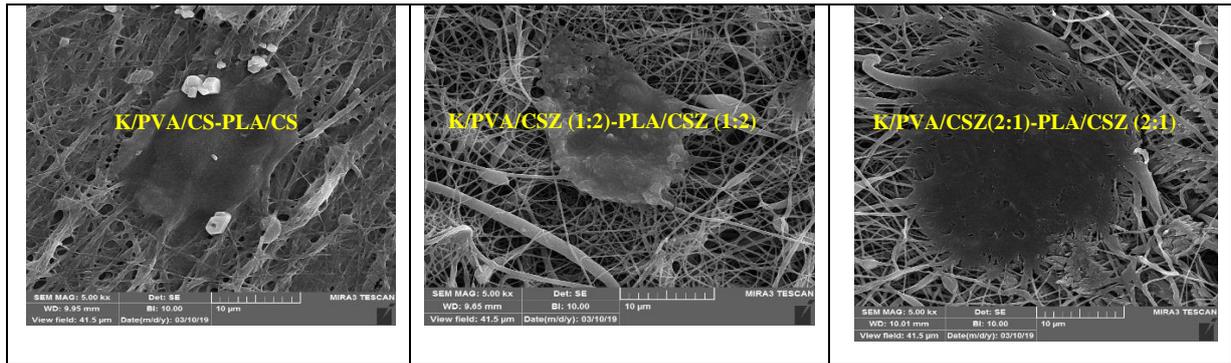
تعداد بین یکپارچگی ساختاری و سازگاری بیولوژیکی برای موفقیت این مواد در کاربردهای بالینی بسیار مهم است. خواص منحصربه‌فرد داربست (۲:۱)-K/PVA/CSZ(۲:۱)PLA/CSZ از جمله معماری بدون مهره و تخلخل بالا، تبادل مواد مغذی و حذف مواد زائد را تسهیل کرده و از رشد سلولی و بازسازی بافت حمایت می‌کند. طراحی این داربست با روندهای فعلی در توسعه مواد چندمنظوره که می‌توانند ماتریکس خارج سلولی را تقلید کنند، مطابقت دارد و در نتیجه نتایج مهندسی بافت را بهبود می‌بخشد [۳۶].

سمت آن، رشد و تکثیر بر روی بستر نانوالیاف بعد از کشت موفق عمل کردند.

همچنین نتایج نشان داد که بعد از ۷۲ ساعت سلول‌های فیبروبلاستی به طور یکنواخت بر روی سطح داربست نانولیفی حاوی K/PVA/CS-PLA/CS (۲:۱)-K/PVA/CSZ(۲:۱)PLA/CSZ و K/PVA/CSZ(۱:۲)-PLA/CSZ گسترده شده‌اند و آن را کاملاً پوشانده‌اند، به طوری که بر روی آنها، رشد سه بعدی سلول قابل مشاهده است اما بر روی K/PVA/CSZ(۱:۲)-PLA/CSZ نسبت به دو داربست دیگر کلونی سلول ایجاد شده کوچک‌تر و در نتیجه میزان رشد سلول کمتری را ایجاد کرده است.

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۱، رفتار رشد و کشت سلولی در شرایط آزمایشگاهی^۱ نشان داد که پوشش پلی کاپرولاکتون/کیتوسان (PCL/CS) با ZnONPs با بار کم (۲ و ۴ wt. %)، به طور قابل توجهی سازگاری سلولی را بهبود بخشید اما در پوشش‌هایی حاوی ZnONPs با بار زیاد (۶ wt. %)، مقدار سلول‌ها به طرز چشمگیری کاهش یافت و منجر به سمیت سلولی شد. علت این امر، این است که یون‌های اضافی روی (Zn) باعث تأثیر منفی بر سلول‌ها می‌شوند. در نهایت پوشش‌های PCL/CS/2ZnO بیشترین قابلیت را برای تحریک تکثیر سلولی نشان داد. یافته‌ها نشان می‌دهد که روی اکسید می‌تواند روند بیولوژیکی را که می‌تواند منجر به ترمیم اندام شود، از

^۱In vitro



شکل ۳: رفتار کشت سلولی نمونه های K/PVA/CS-PLA/CS، K/PVA/CSZ(۲:۱)-PLA/CSZ(۲:۱) و K/PVA/CSZ(۱:۲)-PLA/CSZ(۱:۲).

۶- نتیجه گیری.

$\pm 333/61$ کاهش یافت. این کاهش قطر می تواند به

بهبود خواص مکانیکی و سطحی نانوالیاف کمک کند و در

نهایت بر عملکرد داربستها تأثیر مثبت بگذارد.

علاوه بر این، CHNF/ZnONPs افزوده شده به نمونه

PLA/CSZ-K/PVA/CSZ از نظر ترشوندگی نیز مورد

مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزودن

CHNF/ZnONPs، خاصیت ترشوندگی نانوالیاف تولیدی

به طور قابل ملاحظه ای تحت تأثیر قرار گرفت. به گونه ای

که زاویه تماس برای نمونه K/PVA/CS-PLA/CS برابر با

30 ± 43 بود، در حالی که برای نمونه های

K/PVA/CSZ(۲:۱)-PLA/CSZ(۲:۱) و

K/PVA/CSZ(۱:۲)-PLA/CSZ(۱:۲) به ترتیب $30 \pm$

45 و 10 ± 72 گزارش شد. این تغییرات در زاویه تماس

نشان دهنده تأثیر نانوذرات بر تعاملات سطحی و خواص

آبدوستی نانوالیاف است.

نتایج حاصل از آزمایش های آبدوستی نشان داد که

حضور CHNF، خاصیت آبدوستی داربستها را افزایش

می دهد، در حالی که افزودن ZnONPs سبب کاهش

ترشوندگی آنها شد. این یافته ها می تواند به ما کمک کند

تا در طراحی داربست های نانولیفی با خواص مطلوب تر،

نانوالیاف ترکیبی PLA/CSZ-K/PVA/CSZ با استفاده از

سه نوع ترکیب مختلف شامل CSZ(۱:۰)، (۲:۱) و (۱:۲)

از طریق روش الکترورسی دونا زله تولید شدند. این روش

به دلیل توانایی در تولید نانوالیاف با ویژگی های منحصر به

فرد و کنترل شده، به طور گسترده ای در تحقیقات

زیست مواد مورد استفاده قرار می گیرد. خواص

شکل شناسی و آبدوستی این نانوالیاف به دقت ارزیابی شد

تا پتانسیل کاربردی آنها در زمینه های مختلف، به ویژه

در پزشکی و مهندسی بافت مشخص گردد.

استفاده از نانولیفچه های کیتوسان و هیبریدهای

CHNF/ZnONPs برای تولید داربست های نانولیفی

هیبریدی با موفقیت انجام شد. نانولیفچه های کیتوسان به

دلیل خواص زیستی و سازگاری بالا، به عنوان یک گزینه

مناسب در طراحی داربست های زیست سازگار شناخته

می شوند. نتایج نشان داد که با افزودن ZnONPs به

ترکیب، قطر نانوالیاف برای نمونه های (۲:۱)-PLA/CSZ-

K/PVA/CSZ(۲:۱) و (۱:۲)-PLA/CSZ-

K/PVA/CSZ(۱:۲) به ترتیب به $31 \pm 352/50$ و 30 nm

بنابراین، بر اساس بررسی‌های انجام شده و نتایج به‌دست‌آمده، داربست نانولیفی (۲:۱) PLA/CSZ- K/PVA/CSZ(۲:۱)، به عنوان یک گزینه عالی برای استفاده در کاربردهای پزشکی و ترمیم زخم در نظر گرفته می‌شود. این داربست می‌تواند به عنوان یک بستر مناسب برای رشد سلول‌ها و نیز بهبود فرآیندهای ترمیم بافت در شرایط بالینی مورد استفاده قرار گیرد و به پیشرفت‌های قابل‌توجهی در زمینه درمان و بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده منجر شود.

۷- منابع

1. Li, S. and X.-H. Yang, Fabrication and characterization of electrospun wool keratin/poly (vinyl alcohol) blend nanofibers. *Advances in materials science and engineering*, 2014. 2014.
2. Gao, Y., et al., Electrospun antibacterial nanofibers: Production, activity, and in vivo applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 2014. 131(18).
3. Wan, Z., et al., Controlled hydrophobic biosurface of bacterial cellulose nanofibers through self-assembly of natural zein protein. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2017. 3(8): p. 1595-1604.
4. Boakye, M.A., et al., Fabrication and characterization of electrospun PCL-MgO-keratin-based composite nanofibers for biomedical applications. *Materials*, 2015. 8(7): p. 4080-4095.
5. Liu, Y., et al., Electrospun nanofibers as a wound dressing for treating diabetic foot ulcer. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019. 14(2): p. 130-143.

به‌ویژه در کاربردهای پزشکی، بهینه‌سازی‌های لازم را انجام دهیم.

تصاویر FE-SEM نیز نشان‌دهنده رشد سه‌بعدی و یکنواخت سلول‌های فیبروبلاست بر روی سطح داربست‌های K/PVA/CS-PLA/CS (۲:۱) - PLA/CSZ(۲:۱) K/PVA/CSZ(۲:۱) و (۱:۲) - PLA/CSZ(۱:۲) K/PVA/CSZ(۱:۲) بود. با این حال، میزان رشد سلول‌ها بر روی K/PVA/CSZ(۱:۲)-PLA/CSZ(۱:۲) در مقایسه با سایر نمونه‌ها کمتر بود. این نکته می‌تواند به ما اطلاعات مهمی در مورد سازگاری زیستی و قابلیت رشد سلول‌ها بر روی داربست‌های مختلف ارائه دهد.

6. Xing, Z.-C., et al. Keratin nanofibers as a biomaterial. in *Int Conf Nanotechnology and Biosensors*, Singapore. 2011.
7. He, M., et al., Fabrication and characterization of electrospun feather keratin/poly (vinyl alcohol) composite nanofibers. *RSC advances*, 2017. 7(16): p. 9854-9861.
8. Edwards, A., et al., Poly (ϵ -caprolactone)/keratin-based composite nanofibers for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2015. 103(1): p. 21-30.
9. Hashmi, M., S. Ullah, and I.S. Kim, Electrospun *Momordica charantia* incorporated polyvinyl alcohol (PVA) nanofibers for antibacterial applications. *Materials Today Communications*, 2020. 24: p. 101161.
10. Adeli, H., M.T. Khorasani, and M. Parvazinia, Wound dressing based on electrospun PVA/chitosan/starch nanofibrous mats: Fabrication, antibacterial and cytocompatibility evaluation and in vitro healing assay. *International*

- journal of biological macromolecules, 2019. 122: p. 238-254.
11. Ding, B., et al., Preparation and characterization of nanoscaled poly (vinyl alcohol) fibers via electrospinning. *Fibers and Polymers*, 2002. 3(2): p. 73-79.
 12. Esparza, Y., et al., Preparation and characterization of thermally crosslinked poly (vinyl alcohol)/feather keratin nanofiber scaffolds. *Materials & Design*, 2017. 133: p. 1-9.
 13. Râpă, M., et al., Development of Bionanocomposites Based on PLA, Collagen, and AgNPs and Characterization of Their Stability and In Vitro Biocompatibility. *Applied Sciences*, 2020. 10(7): p. 2265.
 14. Zakaria, Z., et al., Mechanical properties and morphological characterization of PLA/chitosan/epoxidized natural rubber composites. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2013. 2013.
 15. Zahedi, P., et al., Preparation and performance evaluation of tetracycline hydrochloride loaded wound dressing mats based on electrospun nanofibrous poly (lactic acid)/poly (ϵ -caprolactone) blends. *Journal of Applied Polymer Science*, 2012. 124(5): p. 4174-4183.
 16. Vakili, M., et al., Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dye removal from water and wastewater: A review. *Carbohydrate polymers*, 2014. 113: p. 115-130.
 17. Fadaie, M. and E. Mirzaei, Nanofibrillated chitosan/polycaprolactone bionanocomposite scaffold with improved tensile strength and cellular behavior. *Nanomedicine Journal*, 2018. 5(2): p. 77-89.
 18. Crini, G., Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Progress in polymer science*, 2005. 30(1): p. 38-70.
 19. Shan, X., et al., Electrospinning of chitosan/poly (lactic acid) nanofibers: the favorable effect of nonionic surfactant. *Journal of applied polymer science*, 2014. 131(22).
 20. Majidi, H.J., et al., Investigating the best strategy to diminish the toxicity and enhance the antibacterial activity of graphene oxide by chitosan addition. *Carbohydrate polymers*, 2019. 225: p. 115220.
 21. Fadaie, M., et al., Incorporation of nanofibrillated chitosan into electrospun PCL nanofibers makes scaffolds with enhanced mechanical and biological properties. *Carbohydrate polymers*, 2018. 199: p. 628-640.
 22. Almasi, H., P. Jafarzadeh, and L. Mehryar, Fabrication of novel nanohybrids by impregnation of CuO nanoparticles into bacterial cellulose and chitosan nanofibers: Characterization, antimicrobial and release properties. *Carbohydrate Polymers*, 2018. 186: p. 273-281.
 23. Radwan-Pragłowska, J., et al., Hybrid Bilyer PLA/Chitosan Nanofibrous Scaffolds Doped with ZnO, Fe₃O₄, and Au Nanoparticles with Bioactive Properties for Skin Tissue Engineering. *Polymers*, 2020. 12(1): p. 159.
 24. Amjadi, S., et al., Preparation and characterization of gelatin-based nanocomposite containing chitosan nanofiber and ZnO nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, 2019. 216: p. 376-384.
 25. Ranjbar-Mohammadi, M., et al., Fibrous Structures Fabricated from Poly (lactic acid) and Nanofibrillated Chitosan/Zinc Oxide Nanoparticles. *Iranian Journal of Polymer Science and Technology*, 2021. 34(2): p. 174-191.
 26. Ranjbar-Mohammadi, M., P. Shakoori, and Z. Arab-Bafrani, Design and characterization of keratin/PVA-PLA nanofibers containing hybrids of nanofibrillated chitosan/ZnO nanoparticles.

- International Journal of Biological Macromolecules, 2021. 187: p. 554-565.
27. Ranjbar-Mohammadi, M., et al., Designing hybrid nanofibers based on keratin-poly (vinyl alcohol) and poly (ϵ -caprolactone) for application as wound dressing. *Journal of Industrial Textiles*, 2021: p. 1528083721988978.
 28. Lee, S.J., et al., Electrospun chitosan nanofibers with controlled levels of silver nanoparticles. Preparation, characterization and antibacterial activity. *Carbohydrate polymers*, 2014. 111: p. 530-537.
 29. Yu, W., et al., Influence of zinc oxide nanoparticles on the crystallization behavior of electrospun poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanofibers. *Polymer*, 2010. 51(11): p. 2403-2409.
 30. Leung, V. and F. Ko, Biomedical applications of nanofibers. *Polymers for Advanced Technologies*, 2011. 22(3): p. 350-365.
 31. Naderi, P., et al., Evaluation of the effects of keratin on physical, mechanical and biological properties of poly (3-hydroxybutyrate) electrospun scaffold: Potential application in bone tissue engineering. *European Polymer Journal*, 2020. 124: p. 109502.
 32. Koski, A., K. Yim, and S. Shivkumar, Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Materials Letters*, 2004. 58(3-4): p. 493-497.
 33. Anitha, S., et al., Optical, bactericidal and water repellent properties of electrospun nano-composite membranes of cellulose acetate and ZnO. *Carbohydrate polymers*, 2012. 87(2): p. 1065-1072.
 34. Liu, Y., et al., Simultaneous Enhancement of Strength and Toughness of PLA Induced by Miscibility Variation with PVA. *Polymers*, 2018. 10(10): p. 1178.
 35. Bakhsheshi-Rad, H.R., et al., Improved bacteriostatic and anticorrosion effects of polycaprolactone/chitosan coated magnesium via incorporation of zinc oxide. *Materials*, 2021. 14(8): p. 1930.
 36. Moradi, S., et al., A novel composite nano-scaffold with potential usage as skin dermo-epidermal grafts for chronic wound treatment. *Journal of Skin and Stem Cell*, 2022. 9(4).