طراحی و ساخت غشا نانوفیبری به روش الکترواسپینینگ و بررسی تجربی و تحلیلی رفتار دارورسانی غشاء ساخته شده

مهدیه علی‌محمدی
دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی مکانیک دانشگاه فردوسی مشهد
mahdieh.alimohammadi@mail.um.ac.ir

سید علی موسوی شائق
استادیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد
واحد توسعه تحقیقات بالینی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
mousavisha@mums.ac.ir

محمد پسندیده‌فرد
استاد گروه مهندسی مکانیک دانشگاه فردوسی مشهد
mpfard@um.ac.ir

چکیده

در چند دهه اخیر استفاده از غشاءهای نانوفیبری[1] به عنوان بستری مناسب برای حمل گونه‌های دارویی و زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. برای ساخت این بسترهای میکرو/نانو فیبری روش‌های مختلفی وجود دارد. روش الکترواسپینیگ[2] یکی از روش‌های کارآمد برای ساخت این بسترها به شمار می‌آید. در پژوهش پیش‌رو، غشاء الکتروریسی شده متشکل از پلیمرهای پلی کپرولاکتون[3] (PCL) و کیتوسان[4] (CS)، ساخته شده است و رهاسازی[5] دارو از غشاء ساخته شده به صورت تجربی و تحلیلی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است. PCL یک پلیمر مصنوعی می‌باشد که خاصیت آبگریزی دارد و CS یک پلیمر طبیعی با خاصیت آبدوستی است. ترکیب این دو پلیمر باعث می‌شود تا نرخ زیست تخریب پذیری[6] کنترل شود و در نتیجه رهاسازی دارو به مدت طولانی‌تری انجام گردد. بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که نانوفیبرها دارای اندازه یکنواخت و کیفیت سطح قابل قبولی هستند. در پژوهش انجام شده تاثیر مقدار درصد PCL استفاده شده در ساخت نانوفیبرها، بر خواص مکانیکی غشاءهای تولیدی، تخریب پذیری برون بدنی غشاء و فرآیند رها سازی دارو، مورد بررسی قرار گرفته است. در انتها مدل ریاضی بر مبنای قانون دوم فیک ارائه شده است و نتایج تجربی حاصل از رهاسازی دارو با نتایج حاصل از حل تحلیلی مقایسه شده است.

کلمات کلیدی: دارو رسانی، الکترواسپینینگ، نانو فایبر، قانون دوم فیک.

فهرست علائم (در صورت لزوم)

D	ضریب پخش	t	زمان
C	غلظت دارو در داخل نانوفیبرها	M	جرم دارو
R	شعاع نانوفیبر	J	شار دارو از سطح نانوفیبرها
A	مساحت	Q	مقدار کل دارو رهاشده

[1] Nanofibers mat
[2] Electrospinning
[3] Polycaprolactone
[4] Chitosan
[5] Release
[6] Biodegradation

۱- مقدمه

دارورسانی هدفمند موضوعی است که در چند دهه اخیر مورد مطالعه و بررسی گسترده‌ایی قرار گرفته است. در این راستا پژوهشگران به طراحی سیستم‌های مختلف دارورسانی پرداخته‌اند و روش‌های گوناگونی را آزموده‌اند. در اکثر این سیستم‌ها از روش‌های سنتی دارورسانی استفاده می‌شود [۱]. ظهور علم نانوتکنولوژی باعث شد تا روش‌های جدیدی در این راستا مطرح شود. استفاده از غشاءهای میکرو/نانو فیبری به عنوان بستری مناسب برای حمل گونه‌های دارویی و زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. روش‌های مختلفی از جمله خودسامانی مولکولی[۷] ، جدایش فاز[۸] و الکترواسپینینگ برای ساخت داربست‌های فیبری وجود دارد که از مهم‌ترین آن‌ها فرآیند الکترواسپینینگ است [۲]. الکترواسپینینگ یک روش بسیار ساده و اقتصادی برای تولید فیبرهایی با قطر چند نانومتر[۹] تا چند میکرومتر[۱۰] و هندسه‌ای قابل کنترل است که بسیار شبیه و سازگار با بافت‌های اطراف سلولی می‌باشد [۳]. آنچه الکترواسپینینگ را از سایر روش‌های تولید داربست‌های فیبری متمایز می‌سازد تنها اقتصادی بودن این روش نیست. آماده کردن محلول الکتروریسی و فرآیند ساخت نانو فیبرها به وسیله‌ی دستگاه الکترواسپینیگ نسبت به روش‌های خود سامانی مولکولی و جدایش فاز سریع تر است علاوه بر این دستگاه الکترواسپینیگ بسیار ساده راه‌اندازی می‌شود و می‌توان با تغییر مؤلفه های حاکم ، غشایی با خواص هندسی و مکانیکی مورد نظر ساخت [۴]. روش الکترواسپینیگ این امکان را فراهم می‌آورد تا غشاءی تولیدی دارای نسبت سطح به حجم بالا، تخلخل زیاد با اندازه قابل کنترل داشته‌باشد. این ویژگی‌ها سبب می‌شود تا مولکول‌های دارو از داخل غشاء پلیمری رهاسازی مداوم داشته باشند و به صورت تدریجی به بافت هدف برسند [۳، ۵].

اساس پدیده الکترواسپینیگ نیروهای الکترواستاتیک می‌باشند. دستگاه الکتروریسی شامل سه قسمت مهم می‌باشد: منبع تغذیه ولتاژ بالا، پمپ سرنگ و کلکتور[۱۱] [۶]. در این روش محلولی از پلیمر مورد نظر با درصد جرمی مناسب آماده شده و درون سرنگ ریخته می‌شود. سرنگ در داخل دستگاه الکترواسپینیگ جایگذاری می‌شود. نرخ حجمی مشخصی برای پمپ سرنگ تعریف می‌شود. اعمال ولتاژ بین نوک سوزن سرنگ و کلکتور، معمولا بین kV ۳۰-۱، باعث بوجود آمدن میدان الکتریکی می‌شود. با افزایش ولتاژ اعمالی، نیروی جاذبه ایجاد شده بین محلول پلیمری و کلکتور افزایش می‌یابد و باعث اعمال نیروی کششی به قطره خارج شده از نوک سوزن می‌شود. با افزایش بیشتر میدان الکتریکی، نیروهای الکترواستاتیک بر نیروهای کشش سطحی قطره خارج شده از نوک سوزن غلبه می‌کند، بنابراین قطره، شکل کروی مانند خود را از دست می‌دهد و به شکل مخروطی در می‌آید [۷]. اگر ولتاژ اعمالی از این حد نیز بگذرد نهایتا رشته‌ی بسیار باریک پلیمری به سمت کلکتور پرتاب می‌شود. فاصله بین نوک سوزن تا کلکتور فرصتی را ایجاد می‌کند که حلالِ محلول خارج شده از نوک سوزن تا رسیدن به کلکتور، تبخیر شود و رشته‌های پلیمری بر روی کلکتور انباشته شوند. شکل ۱ شماتیکی از دستگاه الکترواسپینینگ را نمایش می‌دهد.

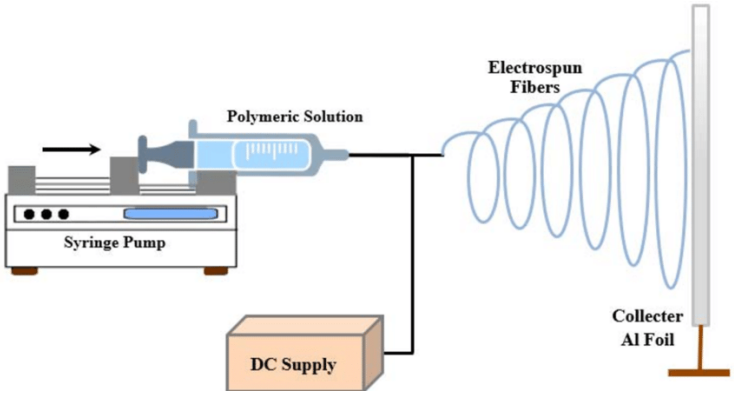
با استفاده از غشاء الکتروریسی شده به عنوان بستر حامل دارو، چندین الگوی رهاسازی دارو که شامل: رهاسازی فوری، تدریجی و تاخیری می‌باشد، می‌تواند شکل گیرد [۸]. با توجه به نیازهای بالینی، سیستم دارورسانی باید به شکلی عمل کند که شامل یک مرحله رهاسازی اولیه باشد و باقیمانده دارو را به صورت تدریجی در مدت زمان تعیین شده‌ای بعد از آن رها کند [۱]. پلیمر انتخاب شده برای ساخت بستر دارورسانی و همچنین روش بارگذاری دارو از عواملی هستند که مکانیزم رهاسازی دارو را تحت تاثیر قرار می‌دهند [۶]. مطالعات فراوانی در زمینه ساخت بستر نانوفیبری به روش الکترواسپینینگ به منظور رسانش گونه‌های مختلف درمانی به بافت هدف، بدون ایجاد اختلال برای سایر بافت‌ها، انجام شده است. در این راستا، سولتانوا[۱۲] و همکاران [۸] به بررسی تجربی رهاسازی آمپیسیلین[۱۳]به عنوان یک دارو آبدوست، پرداختند. آن‌ها برای رهاسازی طولانی

---

[7] Molecular self-assembly
[8] Phase separation
[9] Nanometers
[10] Micrometers
[11] Collector
[12] Sultanova
[13] Ampicillin

مدت دارو از الکترواسپینینگ هسته-پوسته استفاده کردند. در نانوفیبر ساخته شده توسط سولتانوا [۸] مخلوط دارو و پلیمر PCL به عنوان هسته استفاده شده و پوسته نیز از PCL بدون دارو تشکیل شده بود. استفاده از این روش برای ساخت نانوفیبرها باعث می‌شود تا پخش[۱۴] مولکول‌های دارو از داخل نانوفیبرها به محیط بیرون به سادگی صورت نگیرد در نتیجه مدت زمان دارو رسانی افزایش می‌یابد. لیو[۱۵] و همکاران [۹] در پژوهشی به بررسی تجربی برون بدنی و درون بدنی رهاسازی فاکتور رشد[۱۶] از داخل بستر الکتروریسی شده پلی ال-لاکتیک اسید [۱۷] (PLLA) که شامل نانوذرات دکستران[۱۸] بود، پرداختند. وجود نانو ذرات نه تنها بر کنترل رهاسازی فاکتور رشد در مدت زمان تعیین شده تاثیر داشت بلکه باعث شد تا فعالیت زیستی فاکتور رشد طی عملیات الکترواسپینینگ دچار اختلال نشود. در پژوهشی دیگر هو و همکاران [۱۰] برای رهاسازی طولانی مدت ایبوپروفن[۱۹] (بیش از ۱۰۰روز) به طراحی سیستمی پرداختند که شامل پلیمر PLLA همرا با نانو ذرات مزوپروس سیلیکا[۲۰] بود. وجود نانو ذرات باعث شد تا مدت زمان رهاسازی دارو ۸۰ روز بیشتر از حالت بدون نانوذره شود. بثورث [۲۱]و همکاران [۱۱] در پژوهشی به بررسی اثر جهت گیری نانوفیبرها بر دارورسانی پرداختند. آن‌ها دریافتند که این مؤلفه اثر مستقیمی بر رهاسازی دارو از بستر پلیمری دارد. در پژوهش دیگری که توسط چو [۲۲]و وودرو[۲۳] [۱۲] صورت گرفت، غشاء تولیدی توسط این گروه ترکیبی از پلیمرهای PCL و پلی‌لاکتیک-کو-گلایکلیک اسید[۲۴] (PLGA) بود. در این پژوهش، تاثیر تغییر نسبت‌های این دو پلیمر و همچنین وجود و عدم وجود دارو بر خواص مکانیکی مطالعه شد.

در این پژوهش برای بهره‌مندی از مزایای هر دو دسته از پلیمرها مانند سازگاری با بافت‌های داخل بدن و همچنین خواص مکانیکی بهتر، ترکیبی از پلیمرهای طبیعی و مصنوعی برای طراحی سیستم دارورسانی، استفاده شده است [۱۳]. در این مطالعه، به ساخت و بررسی تجربی سیستم دارورسانی بر پایه پلیمر PCL و CS به روش الکترواسپینینگ پرداخته شده است. غشاء ساخته شده قادر به رهاسازی داروی ضد التهاب می‌باشد. در پژوهش انجام شده به بررسی تاثیر مقدار درصد PCL استفاده شده در ساخت نانوفیبرها پرداخته می‌شود. خواص مکانیکی، تخریب پذیری و همچنین الگو و مکانیزم رهاسازی دارو از تمامی غشاءهای تولید شده بررسی شده است. در ادامه مدل ریاضی بر مبنای قانون دوم فیک ارائه شده است و نتایج تجربی حاصل از رهاسازی دارو با نتایج حاصل از حل تحلیلی مقایسه شده است.



شکل ۱: شماتیک دستگاه الکترواسپینینگ.

[14] Diffiusion
[15] Liu
[16] Gross factor
[17] poly L-lactic acid
[18] Dextran nanoparticles
[19] Ibuprofen
[20] Mesoporous silica
[21] Bosworth
[22] Chou
[23] Woodrow
[24] Poly(lactic-*co*-glycolic acid)

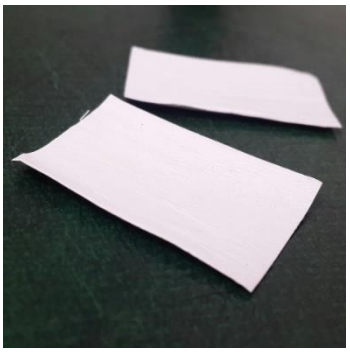
۲- بررسی آزمایشگاهی و نتایج تجربی

در این قسمت به معرفی بستر آزمایشگاهی می‌پردازیم و ابتدا مراحل ساخت غشاء نانوفیبری ارائه شده است. سپس به بررسی هندسه غشاء نانوفیبری با استفاده از تصویربرداری SEM پرداخته می‌شود. در ادامه مراحل انجام آزمایش مکانیکی توضیح داده می‌شود و به ارائه نتایج پرداخته خواهد شد. در مرحله بعد آزمایش تخریب پذیری و رهاسازی دارو را توضیح داده می‌شود و نتایج ارائه می‌شود.

۲-۱- ساخت و بررسی غشاءهای نانوفیبری

ساخت نانوفیبرها بر مبنای روش مرسوم الکترواسپینینگ انجام شده است. به این منظور دو محلول پلیمری (محلول PCL و محلول CS) آماده شده است. ابتدا محلول PCL با غلظت‌های جرمی ٪۳، ٪۵ و ٪۷ در حلال حاوی ٪۵۰ حجمی دی‌میتیل‌فرمامید[25] (DMF) و ٪۵۰ حجمی دی‌کلرومتان[26] (DCM) فراهم شده است. سپس دارو به نسبت ۱:۵ (جرم دارو به جرم PCL) در داخل تمامی محلول‌ها حل شده است. برای آماده سازی محلول دوم، پلیمر CS با غلظت ٪۲ در داخل حلال حاوی ٪۸۰ حجمی اسید استیک و ٪۲۰ حجمی آب دیونیزه، حل شده است.

برای انجام الکتروریسی محلول PCL در داخل یک سرنگ و محلول CS در سرنگ دیگری قرار می‌گیرند. بین کلکتور و نوک سرنگ‌ها ولتاژی بین kV ۲۲-۱۸برقرار می‌شود و سرعت جریان بین ml/h ۱/۱- ۰/۹ و فاصله نوک سوزن تا سطح کلکتور نیز ۱۲ سانتی‌متر، تنظیم می‌شود. شکل ۲ نمونه‌ای از غشاءهای تولیدی را نشان می‌دهد. در جدول ۱ نامگذاری هر یک از نمونه‌ها به همراه ترکیب مواد استفاده شده نشان داده شده است.



شکل ۲: غشاء الکتروریسی شده.

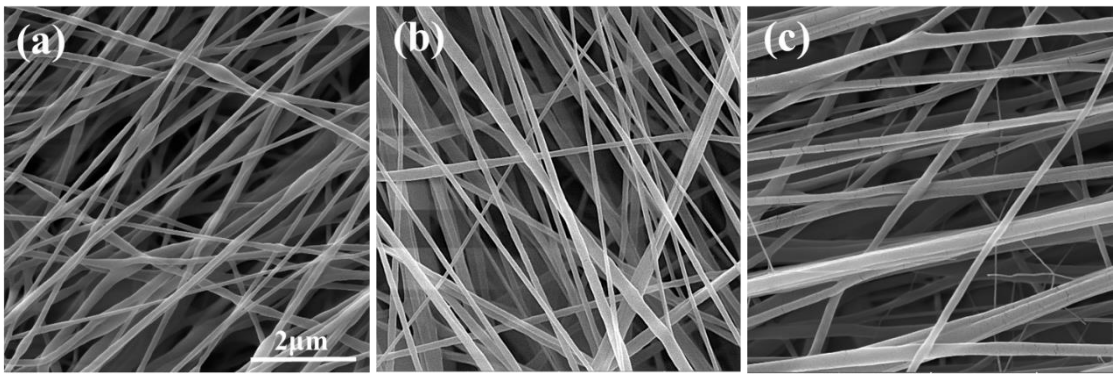
جدول ۱: کد گذاری و ترکیبات هر یک از نمونه‌ها.

کد نمونه‌ها	ترکیبات		
	PCL w/v (%)	Chitosan w/v (%)	Drug/PCL (w:w)
PAC32	۳	۲	۱:۵
PAC52	۵	۲	۱:۵
PAC72	۷	۲	۱:۵

[25] Dimethyl formamide
[26] Dichloromethane

۲-۲- بررسی هندسه غشاءهای نانوفیبری

برای بررسی هندسه غشاءهای نانو فیبری تولید شده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) استفاده می‌شود. تمامی تصاویر SEM در پژوهشکده بوعلی مشهد تصویربرداری شده است. در شکل ۳ تصاویر SEM مربوط به غشاءهای الکتروریسی شده با درصدهای مختلف PCL نشان داده شده است. به منظور اندازه گیری قطر نانوفیبرها از هر کدام از غشاءها ۳ عدد عکس SEM از نواحی مختلف گرفته شده است و با استفاده از نرم افزار Image J میانگین قطر فیبرها در هر حالت بدست آمده است. نتایج نشان می‌دهد با افزایش غلظت PCL ، میانگین قطر فیبرها افزایش می‌یابد. قطر میانگین در حالت‌های PDC32، PDC52 و PDC72 به ترتیب برابر با ۱۲۸/۴۳±۳۷/۳۵ نانومتر، ۱۴۹/۷۸±۵۰/۷۷ نانومتر و ۲۳۲/۴۱±۶۸/۱۲ نانومتر می‌باشد. به عبارتی دیگر با افزایش درصد PCL، قطر میانگین نانوفیبرها افزایش می‌یابد. علاوه بر آن، شکل ۳ نشان می‌دهد که نانوفیبرها به صورت یکنواخت ریسیده شده و دارای کیفیت سطح قابل قبولی می‌باشند و به صورت کاملا تصادفی بر روی هم انباشته شده‌اند. همچنین دارو به صورت کاملا یکنواخت در داخل فیبرها قرار دارد و اثری از انباشتگی دارو دیده نمی‌شود.

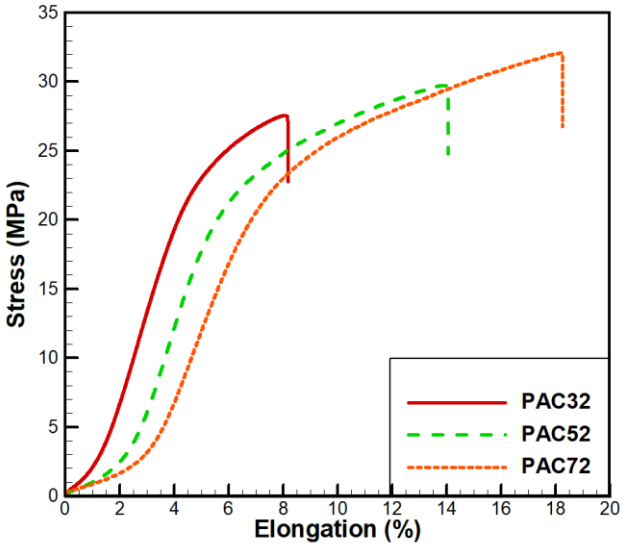


شکل ۳: تصاویر SEM غشاءهای الکتروریسی شده. a) PDC32، b) PDC52 و c) PDC72

۲-۳- بررسی خواص مکانیکی

برای بررسی خواص مکانیکی غشاءهای تولیدی از دستگاه کشش (SANTAM)، آزمایشگاه استخوان و مفصل بیمارستان قائم، استفاده شده است. به منظور انجام این آزمایش، غشاءهای نانو فیبری که دارای ضخامت ۲۰۰ میکرومتر هستند به اندازه‌های ۱cm×۵cm بریده می‌شوند. نمونه‌ها به صورت عمودی بین دو گیره دستگاه قرار می‌گیرند به شکلی که ۳cm از طول غشاء بین دو گیره تحت بار کششی قرار گیرد. سرعت کشش دستگاه ۰/۵ m/s تنظیم می‌شود. تعداد نمونه‌های مورد آزمایش ۵ عدد می‌باشد. استحکام کششی نهایی، قابلیت کشش و از نمودار تنش-کرنش بدست می‌آیند.

خواص مکانیکی غشاءهای نانوفیبری در تعیین عملکرد آن‌ها در کاربردهای بالینی اهمیت فراوانی دارد چراکه ممکن است این سیستم در قسمتی از بدن به کار رود که تحت نیروی زیادی قرار می‌گیرد و باید بتواند نیروهای وارده را تحمل کند.



شکل ۴: منحنی تنش-کرنش برای غشاءها آزمایش شده.

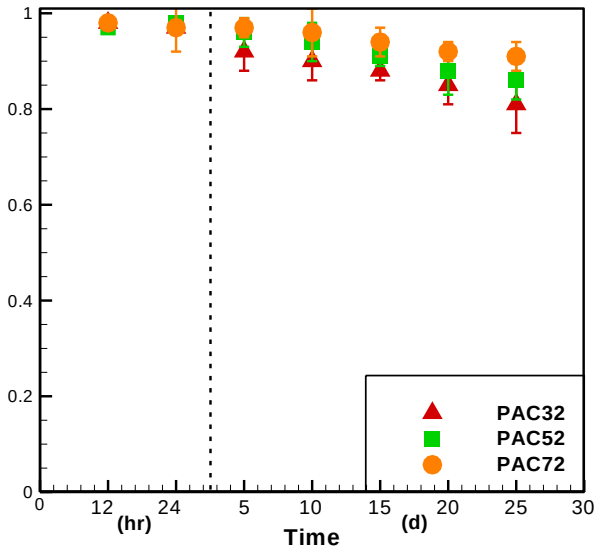
شکل ۴ نمودار تنش-کرنش نمونه‌های مورد آزمایش را نشان می‌دهد. این شکل نشان می‌دهد تمامی غشاءها استحکام مکانیکی بالایی دارند. با بررسی دقیق‌تر نتایج می‌توان دریافت که افزایش درصد مشارکت PCL نه تنها باعث افزیش استحکام نهایی می‌شود بلکه انعطاف‌پذیری غشاء پلیمری را نیز افزایش می‌دهد. همانطور که از نتایج جدول قابل مشاهده است، استحکام نهایی PAC72 تقریبا MPa ۲/۴ بیشتر از PAC52 و PAC52 نیز تقریبا MPa ۲/۲ استحکام نهایی بیشتری نسبت به PAC32 دارد. کرنش نهایی PAC72 نیز به ترتیب تقریبا ٪ ۴/۳ و ٪ ۹/۷ بیشتر از PAC52 و PAC32 است.

۲-۴- بررسی تخریب پذیری و رهاسازی دارو

برای بررسی رهاسازی دارو از داخل بستر نانوفیبری، ابتدا نمونه‌های کوچکی به ابعاد ۲cm×۳cm بریده شده است. وزن تقریبی نمونه‌ها حدود ۴۵ mg بوده است. نمونه‌ها در حجم ۲۰ ml محلول بافری فسفات‌سالین[۲۷] (PBS, pH 7.4) غوطه‌ور شده‌اند و داخل دستگاه انکوباتور شیکر[۲۸] در دمای ۳۷درجه سانتیگراد و دور ۵۰ cycles/min، قرار گرفته‌اند. در بازه‌های زمانی از پیش تعیین شده، ۲ ml از محلول PBS از محیط آزمایش برداشته می‌شود و در داخل میکروتیوب ریخته می‌شود. در ۲۴ ساعت اول شروع آزمایش، نمونه گیری هر ۱۲ ساعت یکبار انجام می شود و بعد از این زمان، تا ۲۵ روز با فاصله زمانی هر ۵ روز، نمونه گیری انجام می شود. برای تعیین میزان رهاسازی دارو از دستگاه اسپکتروفتومتر اشعه ماوراء بنفش[۲۹] (UV-vis) در طول موج ۲۰۷ nm استفاده شده است. منحنی کالیبراسیون دستگاه با استفاده از چند محلول استاندارد با غلظت مشخصی از دارو تعیین می‌شود. مقدار غلطت دارو در هر مرحله از نمونه گیری با تطبیق عدد جذب بدست آمده از دستگاه با منحنی کالیبراسیون (C= 1.796A-0.0264 که در اینجا C مقدار غلظت دارو (mg/ml) و A میزان جذب را در طول موج ۲۰۳ nm، نشان می‌دهد) بدست می‌آید. داده‌های گزارش شده در این مرحله، میانگین ۵ تکرار انجام شده برای هر نمونه است. برای بررسی میزان کاهش جرم نمونه‌ها در اثر تخریب ساختار پلیمرها در هر بازه‌ی زمانی تعیین شده (دقیقا همان زمان‌هایی که نمونه برداری برای آزمایش رهاسازی دارو انجام می‌شود.)، نمونه‌ها از محیط PBS خارج می‌شوند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در داخل کوره آزمایشگاهی قرار می‌گیرند تا کاملا خشک شوند. سپس وزن آن‌ها اندازه‌گیری می‌شود. کاهش این وزن نسبت به وزن اولیه مقدار جرم کاسته شده را نشان می‌دهد. به این منظور مؤلفه α به عنوان وزن کاهیده شده به شکل زیر تعریف می‌شود:

$$\alpha = \frac{\text{Mass in n}^{\text{th}}\ \text{time}}{\text{Initial mass}} \qquad (۱)$$

[27] Phosphate buffered saline
[28] Incubator shaker
[29] Ultraviolet–visible spectrophotometer



شکل ۵: تغییرات α بر حسب زمان در طول مدت آزمایش برای غشاءهای آزمایش شده.

نمودار α بر حسب زمان در شکل ۵ آمده است. همانطور که در شکل پیداست کاهش وزن نمونه‌ها نسبت به زمان با افزایش درصد مشارکت PCL کاهش می‌یابد. به عبارتی نرخ تخریب پذیری غشاء در نمونه PAC72 کمتر از PAC52 و PAC52 کمتر از PAC32 می‌باشد. دلیل این امر را می‌توان به خاصیت آبگریزی پلیمر PCL نسبت داد. هر چه میزان درصد PCL در غشاء تولیدی بیشتر باشد، غشاء خاصیت آبگریزی بیشتری دارد بنابراین نفوذ آب به داخل منافذ غشاء الکتروریسی شده کمتر و سخت‌تر است. نفوذ کمتر آب باعث می‌شود تا پیوندهای پلیمری دیرتر شکسته شوند و پلیمر با نرخ کندتری تخریب شود. نکته قابل توجه دیگر در نمودار این است که در همه حالت‌ها نرخ کاهش جرم تا مدتی کند است و بعد از آن سرعت بیشتری می‌گیرد. برای مثال در حالت PAC52 تا ۱۰ روز اول شروع آزمایش مقدار α ۲٪ کاهش داشته است در صورتی که در ۱۰ روز بعدی (از روز ۱۰ام تا روز ۲۰ام) مقدار α ۵٪ افزایش می‌یابد. دلیل این اتفاق را می‌توان این گونه توجیه کرد که با با گذشت زمان و تخریب تدریجی برخی از فیبرها، منافذ ایجاد شده در ساختار متخلخل غشاء افزایش می‌یابد بنابراین میزان آب نفوذی نیز در داخل غشاء افزایش پیدا می‌کند در نتیجه نرخ کاهش جرم را می‌افزاید. در نهایت در انتها ۲۵ روز تمامی غشاءها کاهش جرمی کمتر از ۲۰٪ داشته‌اند. با توجه به منابع موجود--- می‌دانیم که میزان تخریب پلیمر PCL به دلیل ساختار مولکولی و همچنین خاصیت آب‌گریزی که دارد بسیار پایین است. در مقابل نرخ تخریب پذیری CS بسیار بیشتر از PCL می‌باشد که دلیل این امر نیز علاوه بر ساختار ساکاریدی CS، آبدوستی بالای این پلیمر است [۱۴]. بنابراین این‌گونه نتیجه می‌شود کاهش وزنی که نمونه‌ها در همه حالت‌ها داشته‌اند بیشتر متاثر از تخریب نانوفیبرهای CS می‌باشد و PCL یا دچار تخریب نشده است در این مدت زمان و یا بسیار بسیار کم‌تر از CS تخریب شده است. بنابراین می‌توان با فرض قابل قبولی از تخریب پذیری پلیمر PCL در مدت زمان آزمایش شده، چشم پوشید.

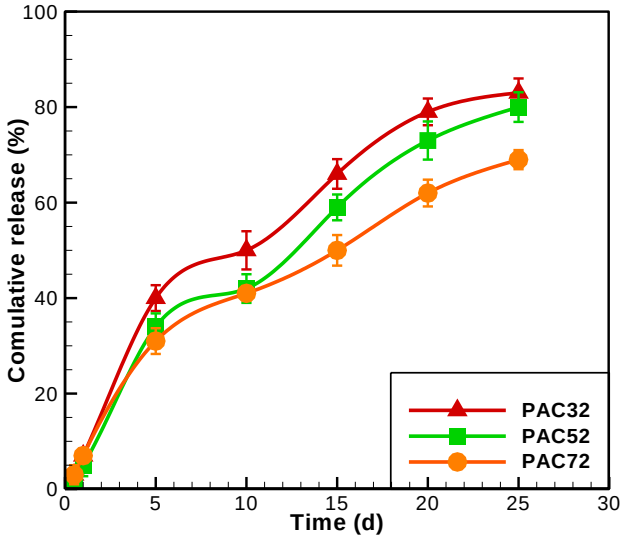
از جمله مهمترین مکانیزم‌های رهاسازی دارو از نانوفیبرها، تراوش[۳۰] از سطح نانوفیبرها، پخش از داخل نانوفیبرها و همچنین تخریب فیبرها به حساب می‌آید. فرآیند رهاسازی دارو در تمامی مدت زمان دارورسانی تحت تاثیر این سه مکانیزم قرار دارد. رهاسازی اولیه دارو از غشاء الکتروریسی شده که در مجاورت محلول آبی قرار دارد، عمدتا به دلیل تراوش مولکول‌های دارو از سطح نانوفیبرها می‌باشد. رها سازی تمامی مولکول‌های دارو اعم از آن‌هایی که به سطوح بیرونی نانوفیبرها چسبیده اند و چه آن‌هایی که به سطوح داخلی چسبیده‌اند توسط این مکانیزم انجام می‌شود. از طرفی گرادیان غلظت بین تخلخل‌های غشاء نانوفیبری و محیط بیرون باعث ایجاد پخش مولکولی دارو می‌شود. این مکانیزم در تمامی طول مدت رهاسازی دارو فعال است و به مؤلفه های مانند ضریب پخش دارو از داخل پلیمر و ضخامت غشاء ارتباط دارد. صرف نظر از روش ساخت نانو فیبرها، در

[30] Desorption

پلیمرهای زیست تخریب پذیر، تخریب پذیری ساختار پلیمر نقش اساسی و مهمی در رهاسازی دارو ایفا می‌کند [۱۳]. در این سیستم‌ها پخش و تخریب پذیری دو مکانیزمی هستند که رهاسازی تدریجی دارو را کنترل می‌کنند. در سیستم‌های دارورسانی زیست تخریب پذیر، فضاهایی که به واسطه تخریب پلیمر در داخل غشاء ایجاد می‌شود باعث می‌شود تا رهاسازی دارو سرعت گیرد. بنابراین پلیمری باید انتخاب شود که مکانیزم تخریب پذیری مناسبی داشته باشد تا بتواند رهاسازی دارو را با توجه به کاربرد بالینی در نظر گرفته شده برای سیستم دارورسانی، کنترل کند.

شکل ۶ درصد کل داروی رهاشده را نسبت به زمان از غشاءهای الکتروریسی از ابتدای شروع آزمایش نشان می دهد. درصد کل دارو رهاشده در هر زمان (Cumulative release of drug) به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$\text{Cumulative release of drug (\%)} = \frac{\text{total mass of released drug}}{\text{total mass of initially loaded drug}} \times 100 \qquad (۲)$$



شکل ۶: نتایج تجربی مقدار دارو رهاشده از غشاءهای الکتروریسی شده نسبت به زمان.

همانطور که از شکل پیداست این پژوهش موفق شده‌است تا با استفاده از روش الکترواسپینینگ ترکیب اقدام به ساخت سیستم های دارورسانی نماییم که قادر به کنترل رهاسازی دارو هستند. چرا که در شکل مشاهده می شود میزان رهاسازی اولیه دارو (در ۲۴ ساعت اول) در نمونه ها بین ۷ تا ۱۰٪ می‌باشد. حال آنکه تا روز ۲۵ام رهاسازی دارو ادامه داشته است. همانطور که از شکل پیداست با افزایش درصد مشارکت PCL مقدار دارو رها شده در هر بازه زمانی کاهش پیدا می کند. دلیل این امر را می‌توان این گونه توجیه کرد که افزایش PCL همانطور که در قسمت قبل توضیح داده شد آب‌دوستی غشاء را کاهش می دهد که در نتیجه آن منطبق با نتایج قسمت قبل تخریب پذیری کاهش پیدا می‌کند. هر چه میزان تخریب پذیری کمتر باشد میزان ایجاد منافذ در داخل غشاء الکتروریسی شده کمتر و همچنین اندازه تخلخل ها تقریبا ثابت باقی می ماند. این موضوع باعث می‌شود تا نفوذ آب به داخل غشا کم شود و نرخ پخش دارو کاهش یابد. علاوه بر دلیلی که توضیح داده شد از منظری دیگر نیز این پدیده قابل تأمل است. در قسمت بررسی هندسه غشاءهای نانوفیبری به این نتیجه رسیدیم که با افزایش مقدار PCL میانگین قطر فیبرها افزایش پیدا می‌کرد و در صد فیبرهایی با قطر بالاتر بیشتر می‌شد هرچه قطر فیبرها افزایش یابد، نسبت سطح به حجم کاهش می یابد. با کاهش نسبت سطح به حجم مولکول هایی از دارو که بر روی سطح نانو فیبرها قرار دارند و باعث رهاسازی اولیه دارو می شوند سخت تر از سطح ها جدا می‌شوند. نسبت سطح به حجم پایین باعث می‌شود که نرخ پخش نیز که اصلی‌ترین مکانیزم رهاسازی دارو از داخل نانوفیبر ها می باشد، کاهش یابد بنابراین تمامی این دلایل باعث می‌شود تا با افزایش درصد مشارکت PCL مقدار دارو کمتری در هر بازه زمانی رها شود. برای مثال بعد از گذشت ۱۵ روز از شروع آزمایش PAC32، ۶۶٪ از دارو بارگذاری شده را رها کرده است. حال‌آنکه این مقدار برای PAC72، ۵۰٪ است. یکی دیگر از نکات قابل توجه در نمودار روند رهاسازی دارو از PAC32 می باشد. همانطور که در شکل قابل ملاحظه است نرخ سازی دارو در این حالت از روز ۵ام تا

۱۰ام تغییر چندانی نداشته است و بعد از روز ۱۰ام مجددا سرعت می گیرد. در حالت PAC52 نیز این روند دیده می شود اما کمتر از حالت PAC32 می‌باشد. اگر به شکل ۵ که تخریب پذیری پلیمر را نشان می دهد، دقت کنیم متوجه می‌شویم که در حقیقت نرخ تخریب پذیری پلیمر نیز در حالت‌های PAC32 و PAC52 (مخصوصاPAC32) از روز ۱۰ام بعد شدت بیشتری می‌گیرد. این پدیده با افزایش منافذ ایجاد شده در غشا در اثر تخریب پذیری پلیمر و در نتیجه نفوذ بیشتر محلول آبی در داخل بستر پلیمری قابل توجیه است.

۳- توسعه مدل ریاضی

با توجه به اینکه طول نانوفیبرها را می‌توان بینهایت فرض کرد پس بنابراین پخش دارو از داخل نانوفیبرها تنها در جهت شعاعی درنظرگرفته می‌شود. فرم دیفرانسیلی قانون دوم فیک برای سیستم استوانه‌ای در شرایطی که پدیده پخش را یک بعدی در جهت شعاعی در نظر بگیریم، به صورت زیر می‌باشد:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{1}{r}\frac{\partial C}{\partial t}\right), \quad 0 \le r \le R \qquad (۱)$$

که در این معادله R شعاع نانوفیبر و D ضریب پخش دارو از داخل نانوفیبر می‌باشد. ضریب D در حل این سوال ثابت در نظر گرفته شده‌است. فرض می‌شود در لحظه t=0 غلظت دارو در داخل نانوفیبرها به صورت یکنواخت و برابر C_0 می‌باشد. همچنین به دلیل اینکه ضریب پخش دارو در محلول آبی نفوذ کرده در داخل غشاء بسیار بیشتر از ضریب پخش دارو در داخل پلیمر می‌باشد، بر روی سطح نانوفیبرها شرط غلظت صفر درنظرگرفته می‌شود. همچنین در سیستم استوانه‌ای لازم است شرط غلظت محدود در مرکز استوانه برقرار باشد. شرایط مرزی و شرط اولیه در نظرگرفته شده به شرح زیر می‌باشد:

$$C(r,0) = C_0 \qquad 0 \le r \le R \qquad (۲)$$

$$C(R,t) = 0 \qquad (۳)$$

$$C(0,t) = \text{finite} \qquad (۴)$$

برای حل معادله دیفرانسیل فوق از روش جداسازی متغیرها استفاده می‌کنیم. با استفاده از این روش و اعمال شرایط مرزی حاکم بر مسئله به رابطه زیر می‌رسیم:

$$C\left(r,t\right) = 2C_0 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{J_0\left(\lambda_n r\right)}{\lambda_n R J_1\left(\lambda_n R\right)} e^{-D\lambda_n t} \qquad (۵)$$

که در این رابطه λ_n مقدار مشخصه می‌باشد که از اعمال شرط مرزی غلظت صفر بر روی سطح نانوفیبرها بدست می‌آید و ریشه معادله زیر می‌باشد.

$$C\left(R,t\right) = 0 = J_0\left(R\lambda_n\right) \qquad (۶)$$

شار دارو در مرز فیبرپلیمری به صورت زیر تعریف می‌شد:

$$\hat{J}(t) = -D\left.\frac{\partial \hat{C}}{\partial r}\right|_{r=R} \qquad (۷)$$

می‌دانیم که $J_0\left(ax\right) = -aJ_1\left(ar\right)$ پس با مشتق‌گیری از $C(r,t)$ در $r = R$ داریم:

$$J(t) = \frac{2C_0 D}{R}\sum_{n=1}^{\infty} e^{-D\lambda_n^2 t} \qquad (۸)$$

مقدار کل دارو رها شده از نانو فیبرها در مدت زمان t را می‌توان با انتگرال گیری از عبارت بالا بدست آورد:

$$Q(t) = \int_0^t AJ(\tau)d\tau \qquad (۹)$$

با انتگرال گیری از رابطه ۸ داریم:

$$Q(t)=\frac{2C_0A}{R}\sum_{n=1}^{\infty}\frac{1}{\lambda_n}\left[1-e^{-D\lambda_n^2 t}\right] \quad (۱۰)$$

سطح کل نانوفیبرها $A=2\pi Rh$ می‌باشد. که h طول کل فیبرها است. بنابراین:

$$Q(t)=4\pi C_0 h\sum_{n=1}^{\infty}\frac{1}{\lambda_n}\left[1-e^{-D\lambda_n^2 t}\right] \quad (۱۱)$$

تا این جا مقدار داروی رها شده از داخل نانوفیبرها با شعاع R بدست آمده‌است. از آنجایی که همه نانوفیبرهای الکتروریسی شده دارای قطر ثابتی نیستند همانطور که از معادله به دست آمده مشخص است قطر نانوفیبرها تاثیر مستقیمی بر پروفیل رهاسازی دارو دارند و هر کدام از فیبرها متناسب با شعاعی که دارند در رهاسازی دارو سهیم هستند. بنابراین لازم است که توزیع قطر نانو فیبرها به دست آید. برای به دست آوردن سهم یک گروه از نانوفیبرهای با قطر برابر، در رهاسازی دارو لازم است که چگالی احتمال $p(R_i)$ برای هر گروه تعریف شود. بنابراین میزان دارو رهاشده از گروه i-امین گروه فیبرها به شکل زیر به دست می آید:

$$Q_i(t)=4\pi C_0 h_i\sum_{n=1}^{\infty}\frac{1}{\lambda_{n_i}}\left[1-e^{-D\lambda_{n_i}^2 t}\right] \quad (۱۲)$$

در اینجا R_i قطر و h_i طول i-امین گروه از نانوفیبرها می‌باشد. از آنجایی که $V_i=\pi R_i^2 h_i$، که V_i حجم فیبرها گروه iام می‌باشد، می‌توان نوشت $\pi R_i^2 h_i C_0=V_i C_0=M_i$ که M_i مقدار کل دارو بارگذاری شده در داخل این گروه از نانوفیبرها است.

و مقدار کل دارو در تمامی فیبرها:

$$M_{total}=\sum_{i=1}^{m}\pi h_i R_i^2 C_0 \quad (۱۳)$$

m تعداد گروه‌های قطری نانوفیبرها می‌باشد و در نهایت می‌توان نوشت:

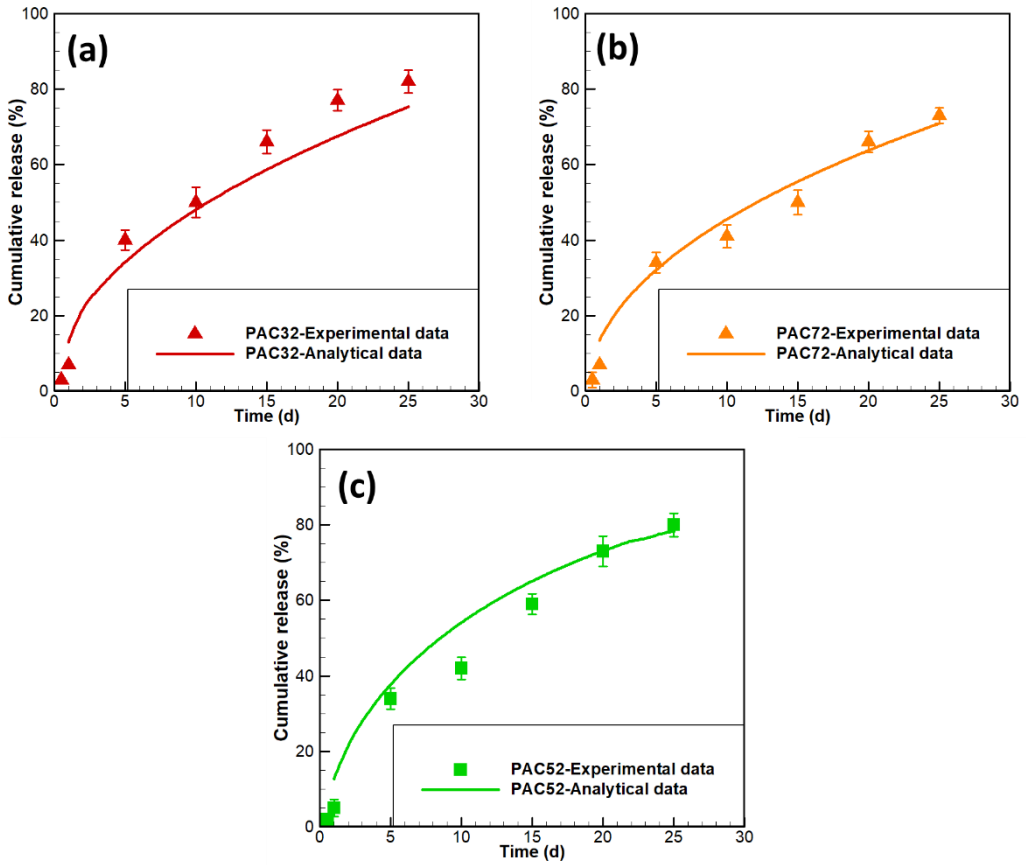
$$Q_{total}(t)=4M_{total}\sum_{i=1}^{m}\sum_{n=1}^{\infty}\frac{P(R_i)}{\overline{R}^2}\frac{1}{\lambda_{n_i}}\left[1-e^{-D\lambda_{n_i}^2 t}\right] \quad (۱۴)$$

تابع $P(R_i)$ تابع چگالی احتمال می‌باشد و $\overline{R}^2=\sum_{i=1}^{n}R_i^2 p(R_i)$. حل معادله فوق در نرم افزار MATLAB انجام می‌شود و نتایج حل تحلیلی با نتایج آزمایشگاهی مقایسه می‌گردد.

۳-۲- مقایسه نتایج تجربی و تحلیلی

شکل ۷**Error! Reference source not found.** نتایج حل تحلیلی به همراه نتایج تجربی را برای حالت‌های PAC32، PAC52 و PAC72 نشان می‌دهد. همانطور که از دقت در سه نمودار مشخص است، در تمامی حالت ها در ۲۴ ساعت اول حل تحلیلی نسبت به نتایج تجربی، مقدار بیشتری را برای رهاسازی دارو پیش‌بینی می‌کند. دلیل این امر این است که در حالت آزمایشگاهی با توجه به اینکه PCL پلیمر آب‌گریزی می‌باشد، زمانی طول می‌کشد تا غشاء کاملا جذب کند و آب به داخل تمامی منافذ غشاء نفوذ کند در حالی میزان آب‌دوستی نانوفیبرها در حل تحلیلی در نظر گرفته نشده است. این موضوع باعث می‌شود حل تحلیلی مقدار بیشتری را برای رهاسازی دارو پیش‌بینی کند. همانطور که در شکل ۷**Error! Reference source not found.** مشخص است، نتایج تجربی با نتایج حل عددی در حالت PAC32 تا روز ۱۰ام، انطباق خوبی را نشان می‌دهد. بعد از روز ۱۰ام مقادیر تجربی، از مقادیر تحلیلی پیشی می‌گیرند. علت این پدیده را می‌توان این‌طور بیان کرد که در غشاء PAC32 همان طور که در قسمت آزمایش تخریب پذیری نتیجه گیری شد، از یک زمانی به بعد (۱۰ روز به بعد) میزان تخریب پذیری بیش از سایر غشاءهاست. این مکانیزم خود نیز بر رهاسازی دارو تاثیر مستقیم دارد. در حالی که اثر تخریب پذیری در حل تحلیلی در نظر گرفته نشده است و فقط مکانیزم پخش دارو از داخل نانوفیبرها در نظر گرفته شده است. بر طبق همین دلیل است که

مشاهده می‌کنیم در PAC52 تطابق داده های تجربی و تحلیلی بیشتر از حالت PAC32 است و PAC72 نیز بهتر از PAC52 می‌باشد. چرا که تخریب پذیری در PAC72 بسیار ناچیز بوده است.



شکل ۷: مقایسه نتایج تجربی و حل تحلیلی در (a) PAC32، (b) PAC52 و (c) PAC72

۴- نتیجه‌گیری

پس از انجام آزمایش‌ها، بحث و بررسی، مهم‌ترین نتایج زیر حاصل شد:

- ✓ با استفاده از عکس‌برداری میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد که کیفیت هندسه نانوفیبرها قابل قبول، خالی از بید و همچنین بدون تجمع دارویی می‌باشد.
- ✓ نتایج حاصل از آزمایش مکانیکی نشان می‌دهد با افزایش درصد PCL استحکام نهایی و کرنش نهایی افزایش می‌یابد.
- ✓ نتایج حاصل از بررسی زیست تخریب پذیری غشاءهای الکتروریسی شده نشان می‌دهد با افزایش درصد مشارکت PCL، به علت کاهش میزان آب‌دوستی غشاء، نرخ کاهش جرم کاهش می‌یابد. بیشینه مقدار کاهش جرم، مربوط به نمونه PAC32 بوده که در مدت ۲۵ روز ۲۰٪ کاهش جرم داشته است.
- ✓ با توجه به سرعت زیست تخریب پذیری بالای پلیمر CS، کاهش جرم در نمونه‌ها به تخریب CS نسبت داده می‌شود و با فرض قابل قبولی از تخریب پذیری PCL می‌توان چشم پوشید.
- ✓ نتایج حاصل از رهاسازی برون بدنی دارو نشان می‌دهد سیستم دارورسانی طراحی شده موفق به کنترل رهاسازی تدریجی و طولانی مدت دارو شده است. به نحوی که رهاسازی اولیه دارو تا ۱۰٪ کل دارو بارگذاری شده می‌باشد و تا مدت زمان ۲۵ روز رهاسازی دارو ادامه داشته است.

- ✓ نتایج حاصل از آزمایش رهاسازی دارو نیز نشان می‌دهد که افزایش PCL باعث کاهش مقدار داروی آزاد شده می‌شود. این امر نه تنها به دلیل ساختار آبگریز PCL می‌باشد، بلکه در غشاءهایی با درصد PCL بیشتر، به دلیل کاهش نسبت سطح به حجم نانوفیبرها (در اثر افزایش قطر میانگین فیبرها)، مولکول‌های دارو به سختی از سطح فیبرها جدا می‌شوند.

تشکر و قدردانی

از پشتیبانی مالی موسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی جمهوری اسلامی ایران (نیماد) تحت پژوهانه به شماره ۹۴۲۵۹۴، صمیمانه سپاسگزاری می شود.

مراجع

[۱] Y.-N. Jiang, H.-Y. Mo and D.-G. Yu, Electrospun drug-loaded core–sheath PVP/zein nanofibers for biphasic drug release, *International journal of pharmaceutics,* Vol. 438, No. 1-2, pp. 232-239, 2012.

[۲] S. Thakkar, Introducing bioactivity into electrospun scaffolds for in situ cardiovascular tissue engineering, 2018.

[۳] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnology advances,* Vol. 28, No. 3, pp. 325-347, 2010.

[٤] X. Hu, S. Liu, G. Zhou, Y. Huang ,Z. Xie and X. Jing, Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications, *Journal of controlled release,* Vol. 185, pp. 12-21, 2014.

[٥] W. J. Li, R. M. Shanti and R. S. Tuan, Electrospinning technology for nanofibrous scaffolds in tissue engineering, *Nanotechnologies for the Life Sciences: Online*, 2007.

[٦] T. J. Sill and H. A. von Recum, Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials,* Vol. 29, No. 13, pp. 1989-2006, 2008.

[٧] J. Doshi and D. H. Reneker, Electrospinning process and applications of electrospun fibers, *Journal of electrostatics,* Vol. 35, No. 2-3, pp. 151-160, 1995.

[٨] Z. Sultanova, G. Kaleli, G. Kabay and M. Mutlu, Controlled release of a hydrophilic drug from coaxially electrospun polycaprolactone nanofibers, *International journal of pharmaceutics,* Vol. 505, No. 1-2, pp. 133-138, 2016.

[٩] S. Liu, M. Qin, C. Hu, F. Wu, W. Cui, T. Jin and C. Fan, Tendon healing and anti-adhesion properties of electrospun fibrous membranes containing bFGF loaded nanoparticles, *Biomaterials,* Vol. 34, No. 19, pp. 4690-4701, 2013.

[۱۰] C. Hu, S. Liu, Y. Zhang, B. Li, H. Yang, C. Fan and W. Cui, Long-term drug release from electrospun fibers for in vivo inflammation prevention in the prevention of peritendinous adhesions, *Acta Biomaterialia,* Vol. 9, No. 7, pp. 7381-7388, 2013.

[۱۱] L. A. Bosworth, N. Alam, J. K. Wong and S. Downes, Investigation of 2D and 3D electrospun scaffolds intended for tendon repair, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine,* Vol. 24, No. 6, pp. 1605-1614, 2013.

[۱۲] S.-F. Chou and K. A. Woodrow, Relationships between mechanical properties and drug release from electrospun fibers of PCL and PLGA blends, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials,* Vol. 65, pp. 724-733, 2017.

[۱۳] Q. Zhang, Y. Li, Z. Y. W. Lin, K. K. Wong, M. Lin, L. Yildirimer and X. Zhao, Electrospun polymeric micro/nanofibrous scaffolds for long-term drug release and their biomedical applications, *Drug discovery today,* Vol. 22, No. 9, pp. 1351-1366, 2017.

[۱٤] M. Z. Elsabee, H. F. Naguib and R. E. Morsi, Chitosan based nanofibers, review, *Materials Science and Engineering: C,* Vol. 32, No. 7, pp. 1711-1726, 2012.