

Fabrication and Characterization of Carrageenan-Gallic Acid Scaffold Containing Halloysite Nanotubes Loaded with Erythromycin for Skin Tissue Engineering Application

Samaneh Ashoorifard ¹, Jhamak Nourmohammadi ^{2*}, Rahele Mashhadi ³

¹ M.Sc. Student, College of Interdisciplinary Science and Technology, University of Tehran, Tehran, Iran.

² Associate Professor, College of Interdisciplinary Science and Technology, University of Tehran, Tehran, Iran.

³ Ph.D. Student, College of Interdisciplinary Science and Technology, University of Tehran, Tehran, Iran.

*Corresponding Author's Email: j_nourmohammadi@ut.ac.ir (Jhamak Nourmohammadi)

Paper History:

Received: 2025-02-10

Revised: 2025-03-11

Accepted: 2025-05-14

Keywords:

Carrageenan,
Gallic Acid,
Tissue Engineering,
Halloysite Nanotubes

Abstract This study explores a carrageenan-Gallic acid scaffold incorporating halloysite nanotubes loaded with erythromycin for potential applications in skin tissue engineering. In this regard, erythromycin was encapsulated within halloysite nanotubes, and scaffolds containing 1, 3, and 5 wt% carrageenan were fabricated using the freeze-drying technique. The physicochemical and biological properties of the scaffolds were evaluated through scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), mechanical strength assessment, water absorption capacity, degradation rate analysis, antibacterial activity, antioxidant properties, and fibroblast cell viability and migration assays. According to the SEM results, the porosity percentages of the scaffolds containing 1, 3, and 5 wt% carrageenan were calculated as $62.43 \pm 1.8\%$, $69.28 \pm 2.1\%$, and $71.28 \pm 3.9\%$, respectively. An increase in carrageenan content led to a rise in pore size and porosity, which consequently enhanced water absorption, accelerated degradation, and improved fibroblast cell viability and migration. However, a reduction in compressive strength and Young's modulus was observed. The antibacterial evaluation demonstrated that the scaffold with 5 wt% carrageenan exhibited superior antibacterial efficacy due to increased drug release. Additionally, the antioxidant analysis revealed that the scaffold containing 1 wt% carrageenan exhibited the highest antioxidant activity, which was attributed to the greater release of Gallic acid. Overall, the scaffold with 5 wt% carrageenan demonstrated optimal biocompatibility, superior antibacterial properties, and enhanced fibroblast viability and migration, making it a promising candidate for skin tissue engineering applications.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2025.505765.1319>

URL: https://www.jamt.ir/article_220784.html

1. INTRODUCTION

Natural and synthetic polymers have been widely used as biomaterials for the fabrication of scaffolds in skin tissue engineering (Liu et al., 2020). Carrageenan is a hydrophilic polysaccharide known for its high strength and good compatibility, making it suitable for wound dressings (Rode et al., 2018). Gallic acid is a colorless or slightly yellow crystalline compound with antioxidant, antimicrobial, and anticancer properties. The composite obtained from the synthesis of these two groups has gained significant attention due to its biodegradability, high biocompatibility, and favorable mechanical properties.

2. MATERIALS AND METHODS

Carrageenan and gallic acid scaffolds were synthesized in three ratios: C₁G₁, C₃G₁, and C₅G₁. Halloysite nanotubes loaded with erythromycin were then added to the scaffolds.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Scanning electron microscopy (SEM) images revealed that the lowest porosity was observed in the sample with the lowest carrageenan content (Figure 1).

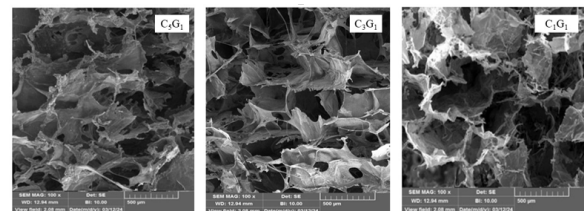


Figure 1. SEM images of the scaffold at 200 μm magnification.

FTIR analysis confirmed the presence of carrageenan, gallic acid, erythromycin, and halloysite nanotubes (Figure 2). In the compressive strength test, the highest modulus was observed in the C₁G₁ sample, which was 2.12 ± 0.38 kPa. With an increase in the carrageenan ratio, this value decreased to 1.47 ± 0.11 kPa in the C₃G₁ sample and 1.39 ± 0.16 kPa in the C₅G₁ sample.

The drug release test for erythromycin from the scaffolds revealed that the highest drug release was observed in the C₅G₁ sample, and the C₃G₁ sample also showed a higher drug release compared to the C₁G₁ sample (Figure 3).



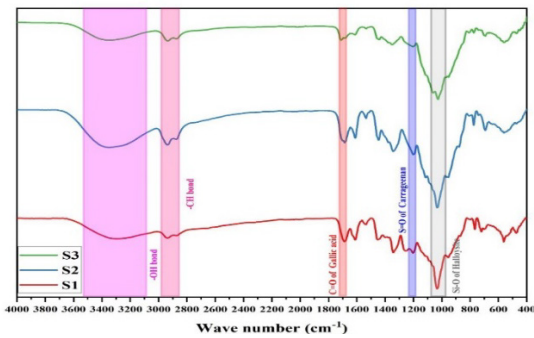


Figure 2. FTIR spectrum of carrageenan-gallic acid scaffolds containing halloysite nanotubes loaded with erythromycin.

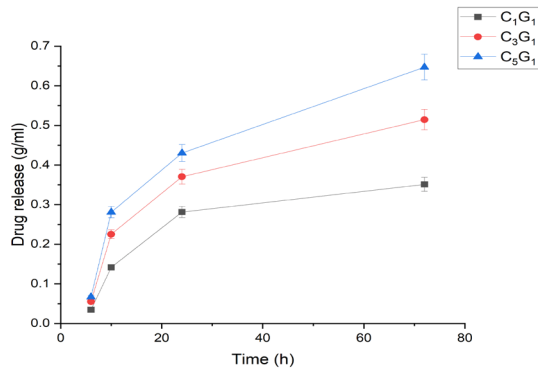


Figure 3. Graph of the drug release concentration from the scaffolds at 6, 10, 24, and 72 hours.

The results of the water absorption test of the scaffolds showed that the lowest water absorption was observed in the C₁G₁ sample. Since carrageenan is a hydrophilic polymer, as the amount of this polymer in the scaffold structure increases, the water absorption also increases (Figure 4).

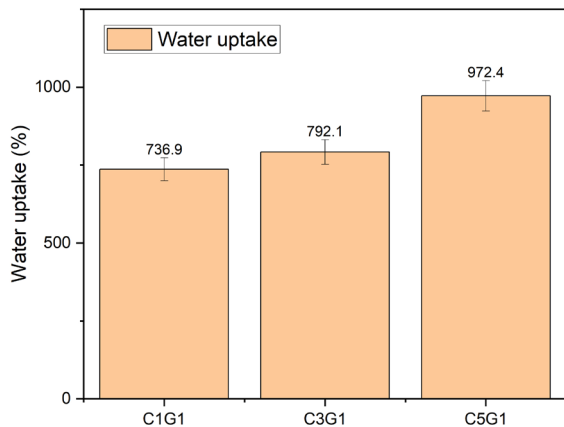


Figure 4. The water absorption percentage of the samples after 24 hours of immersion in deionized water.

The degradation rate of the scaffolds showed that the highest degradation occurred in the C₅G₁ sample. This can be attributed to the larger pore size and higher porosity percentage, as well as the weaker mechanical properties of this scaffold compared to the other samples. The lowest degradation was observed in the C₁G₁ sample, which also exhibited the best mechanical properties according to the mechanical tests (Figure 5).

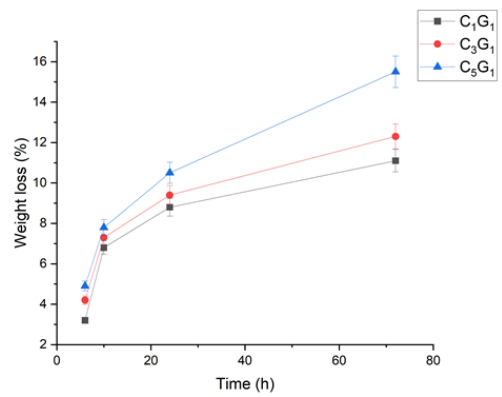


Figure 5. Scaffold degradation percentage chart over 6, 10, 24, and 72 hours.

The results of the antibacterial test indicated that all three scaffolds showed significant inhibitory effects against *Staphylococcus aureus*. However, the reduction rate for Gram-negative bacteria was lower than for Gram-positive bacteria. This can be attributed to the greater effectiveness of erythromycin and gallic acid against Gram-positive bacteria (Figure 6).

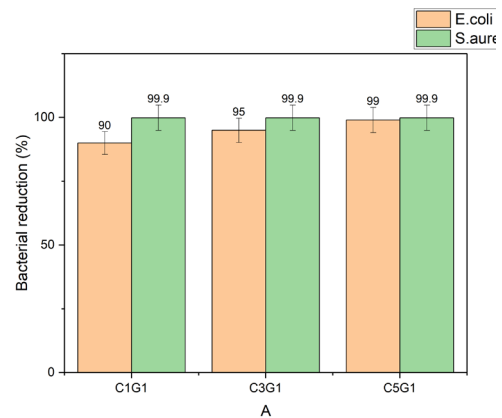


Figure 6. Bacterial viability reduction percentage chart for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* exposed to the scaffolds.

Antioxidant activity of the scaffolds shows that the highest antioxidant activity was observed in the first sample, C₁G₁, which contains a 1:1 ratio of carrageenan to gallic acid (Figure 7).

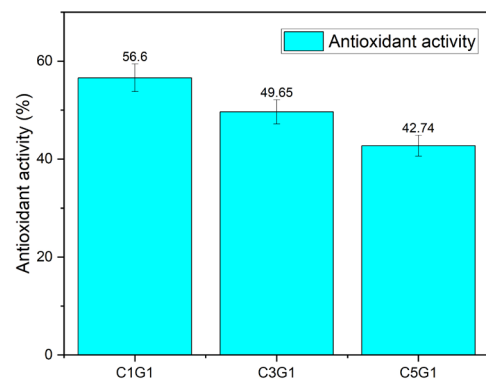


Figure 7. Bar chart of the antioxidant percentage of the scaffolds.

The results of the MTT assay also showed that increasing the carrageenan content in the scaffold composition—and consequently the hydrophilicity—led to an increase in fibroblast cell viability, with the C₅G₁ sample exhibiting the highest cell viability. Furthermore, DAPI staining of the samples confirmed these findings. In the scratch assay, cell migration ability was evaluated, and again, the C₅G₁ sample demonstrated superior migration capacity compared to the other samples (Figure 8).

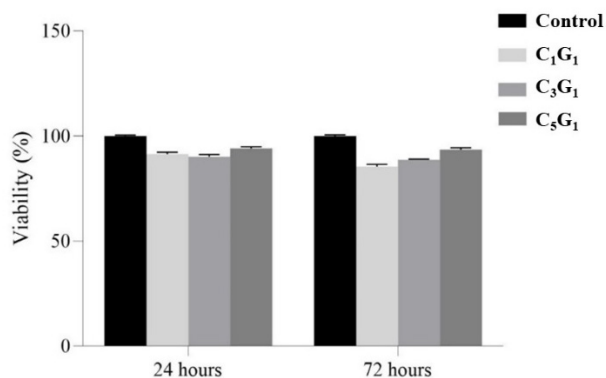


Figure 8. Fibroblast cell viability chart in response to the scaffolds over 24 and 72 hours.

4. CONCLUSION

The results of this study showed that the properties of the carrageenan-gallic acid scaffold containing halloysite nanotubes loaded with erythromycin in a 5:1 ratio could serve as a suitable scaffold for skin tissue engineering applications.

4. ACKNOWLEDGMENTS

The authors of this study sincerely thank and appreciate the University of Tehran for its support in providing the laboratories and research facilities.

REFERENCES

1. Liu, J., Yong, H., Liu, Y., & Bai, R. (2020). Recent advances in the preparation, structural characteristics, biological properties and applications of gallic acid grafted polysaccharides. *International journal of biological macromolecules*, 156, 1539-1555. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.202>
2. Rode, M. P., Batti Angulski, A. B., Gomes, F. A., da Silva, M. M., Jeremias, T. D. S., de Carvalho, R. G., ... & Calloni, G. W. (2018). Carrageenan hydrogel as a scaffold for skin-derived multipotent stromal cells delivery. *Journal of Biomaterials Applications*, 33(3), 422-434. <https://doi.org/10.1177/0885328218795569>



مقاله کامل پژوهشی

ساخت و بررسی خواص داربست کاراگینان-گالیک‌اسید حاوی نانولوله‌های هالوسایت بارگذاری شده با

اریتروماسین برای کاربرد مهندسی بافت پوست

سمانه عاشوری فرد^۱، ژامک نورمحمدی^{۲*}، راحله مشهدی^۳

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده‌گان علوم و فناوری‌های میان‌رشته‌ای، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲دانشیار، دانشکده‌گان علوم و فناوری‌های میان‌رشته‌ای، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۳دانشجوی دکتری، دانشکده‌گان علوم و فناوری‌های میان‌رشته‌ای، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۴۰۳/۱۱/۲۲

بازنگری: ۱۴۰۳/۱۲/۲۱

پذیرش قطعی: ۱۴۰۴/۰۲/۲۴

کلیدواژه‌ها:

کاراگینان،

گالیک‌اسید،

نانولوله‌های هالوسایت،

مهندسی بافت

چکیده این پژوهش به بررسی داربست کاراگینان-گالیک‌اسید حاوی نانولوله‌های هالوسایت بارگذاری شده با اریتروماسین با هدف کاربرد در مهندسی بافت پوست می‌پردازد. براین اساس، داری اریتروماسین درون نانولوله‌های هالوسایت بارگذاری شد و داربست‌هایی با نسبت‌های وزنی ۱، ۳ و ۵ درصد کاراگینان به روش خشک‌کایش انجمادی تهیه شد. خصوصیات داربست‌ها از طریق آزمون‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، طیف‌سنجی تبدیل فوری مادون قرمز (FTIR)، سنجش استحکام مکانیکی، میزان جذب آب، سرعت تخریب، خاصیت آنتی‌باکتریال، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ارزیابی زنده‌مانی و مهاجرت سلول‌های فیبروبلاست بررسی شد. طبق نتایج آزمون SEM، درصد تخلخل $1/8 \pm 62/43$ ، $2/1 \pm 69/28$ و $3/9 \pm 71/28$ به ترتیب برای نمونه‌های حاوی ۱، ۳ و ۵ درصد وزنی کاراگینان محاسبه شد. افزایش مقدار کاراگینان به افزایش اندازه و درصد تخلخل، جذب آب بیشتر، سرعت تخریب بالاتر و بهبود زنده‌مانی و مهاجرت سلولی منجر شد، درحالی‌که کاهش استحکام فشاری و مدول یانگ مشاهده شد. نتایج آزمون آنتی‌باکتریال حاکی از آن بود که داربست حاوی ۵ درصد وزنی کاراگینان، به دلیل رهايش دارویی بیشتر، عملکرد ضدباکتریایی قوی‌تری دارد. علاوه‌براین، بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که نمونه‌ی حاوی ۱ درصد وزنی کاراگینان، به دلیل میزان رهايش بالاتر گالیک‌اسید، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارد. به‌طورکلی، ترکیب حاوی ۵ درصد وزنی کاراگینان، با توجه به زیست‌سازگاری مطلوب، خاصیت آنتی‌باکتریایی برتر و قابلیت ارتقای زنده‌مانی و مهاجرت سلولی به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای مهندسی بافت پوست پیشنهاد می‌شود.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2025.505765.1319>

URL: https://www.jamt.ir/article_220784.html

۱- مقدمه

مؤثر برای کمک به بدن به‌منظور تسریع و تحریک فرایند ترمیم زخم وجود دارد (Liu et al., 2020). پیچیدگی پدیده‌ی ترمیم زخم موجب می‌شود تا فرایند بهبودی سخت و دردناک باشد. جدا از بخش‌های بیوشیمیایی و سلولی دخیل در فرایند ترمیم، چندین مسیر خارجی درمانی می‌توانند نقش فعالی در بازسازی و کمک به درمان بافت پوست داشته باشند (Blair et al., 2020).

ترمیم زخم یکی از پیچیده‌ترین فرایندهای بیولوژیکی است که توسط فاکتورهای موضعی و سیستمی متعددی کنترل می‌شود و در مواردی که بدن قادر به ترمیم زخم از طریق فرایند طبیعی بازسازی نباشد، ضرورت به‌کارگیری روش‌های درمانی

عهده‌دار مکاتبات: ژامک نورمحمدی کوهانستانی

نشانی: ایران، تهران، خیابان کارگر شمالی - بالاتر از چهار راه جلال آل احمد - روبه روی خیابان یازدهم - دانشکده‌گان علوم و فناوری‌های میان‌رشته‌ای

پیام نگار: j_nourmohammadi@ut.ac.ir

۳-۴-تری هیدروکسی بنزوئیک یکی از فراوان‌ترین اسیدهای فنولیک در قلمرو گیاهی است. گالیک اسید ترکیب بلوری بی‌رنگ یا کمی زرد رنگ است که کاربرد وسیعی در صنایع غذایی و دارویی دارد. گالیک اسید از طریق تجزیه‌ی هیدرولیتیک تانیک اسید با استفاده از یک گلیکوپروتئین استراز تولید می‌شود. این ماده خواص ویژه‌ای نظیر آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد سرطانی دارد (Doan; Korkina et al., 2012; et al., 2015). تاکنون بررسی‌های متعددی درباره‌ی داربست‌های پلی‌ساکاریدی به همراه گروه‌های پلی‌فنولی انجام شده است. ترکیب حاصل از سنتز این دو گروه به دلیل داشتن خواصی چون زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری بالا و ویژگی‌های مکانیکی مطلوب بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

در سال‌های اخیر، تلاش‌های قابل‌توجهی در زمینه‌ی توسعه‌ی نانو تکنولوژی به منظور انتقال دارو انجام شده است که امکان انتقال داروهایی با وزن مولکولی زیاد همچون پروتئین‌ها، پپتیدها و یا ژن‌ها را حتی به صورت موضعی و یا هدفمند فراهم می‌کند. همچنین، سیستم‌های انتقال دارویی از طریق بارگذاری دارو درون نانوحامل‌های زیست‌تخریب‌پذیر مانند نانوذرات و نانولوله‌ها، در مقایسه با داروهای سنتی چندین برتری دارند که از جمله می‌توان به حلالیت، نفوذپذیری مطلوب، فرایندپذیری مناسب، زیست‌سازگاری و داشتن عمر مفید و قابل قبول در بدن اشاره کرد. علاوه بر این، مواد به‌جامانده‌ی حاصل از تخریب آن‌ها سمی نیست و از بدن قابل دفع است. بدیهی است موفقیت چنین سیستم‌های انتقال دارویی وابسته به زیست‌سازگاری حامل دارویی است که امکان بارگیری حجم بسیاری از دارو را بدون اینکه موجب رهایش قبل از موعد دارو شود فراهم می‌کند [۹]. هدف از رهایش کنترل شده‌ی دارو این است که میزان آزاد شدن دارو قبل از رسیدن به سلول و یا بافت هدف به صفر رسانده شود و برای دستیابی به این مسئله باید از حامل‌هایی استفاده شود که قابلیت رساندن دارو به بافت مورد نظر بدون رهایش در سایر بافت‌ها و اندام‌ها را داشته باشند. پیشرفت‌های اخیر در زمینه‌ی نانو تکنولوژی نشان می‌دهد که نانولوله‌های هالوسایت پتانسیل خوبی به عنوان حامل‌های دارویی دارند. نانولوله‌های هالوسایت به عنوان ماده‌ای بالقوه برای رهایش هدفمند عوامل زیستی مختلف و داروها در یک

تاکنون انواع مختلفی از داربست‌های مهندسی‌شده برای تسریع ترمیم زخم توسعه یافته‌اند. خصوصیات ایدئال یک داربست برای مهندسی بافت پوست عبارت است از استحکام مکانیکی مناسب، زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و کنترل رهایش داروها و مواد بیولوژیکی. داربست‌های پوستی باید کاملاً سطح زخم را بپوشانند و در مقابل تاثیرات عوامل و فاکتورهای خارجی از زخم مراقبت کنند. توسعه‌ی مواد جدید داربستی، که ساختار و عملکرد ماتریکس خارج سلولی را شبیه‌سازی می‌کنند بسیار مهم است تا بتوانند نیازهای مهندسی بافت پوست را برآورده کنند (Mostafalu et al., 2018). پلیمرهای طبیعی و سنتزی به‌طور گسترده به عنوان مواد زیستی برای ساخت داربست‌های مهندسی بافت پوست استفاده شده‌اند. داربست‌های پلیمری به دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد آن‌ها مانند نسبت سطح به حجم، تخلخل بالا با اندازه‌ی حفره‌ی بسیار کوچک، زیست‌تخریب‌پذیری و ویژگی‌های مکانیکی مطلوب توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند.

پلی‌ساکاریدهای طبیعی بایوپلیمرهای مهمی با خواص فیزیکوشیمیایی منحصربه‌فرد و فعالیت‌های بیولوژیکی ارزشمند هستند. به دلیل نبود گروه‌های عاملی کافی، کاربرد پلی‌ساکاریدهای طبیعی با بایوپلیمرهای مصنوعی قابل مقایسه نیست (Yang et al., 2016). کاراگینان پلی‌ساکاریدی آب‌دوست است که در چندین گونه جلبک قرمز دریایی یافت می‌شود. این پلیمر به‌طور گسترده به عنوان عوامل ژل‌کننده، امولسیون‌کننده و تثبیت‌کننده به دلیل توانایی در تشکیل ژل‌های برگشت‌پذیر حرارتی و محلول‌های ویسکوز مورد استفاده می‌شود. اخیراً، هیدروژل‌های کاراگینان در پزشکی احیاکننده به عنوان داربست‌ها و سیستم‌های رهایش کنترل‌شده برای انواع داروها، فاکتورهای رشد و تثبیت آنزیم بررسی شدند. از این ماده همچنین به دلیل استحکام بالا و سازگاری خوب در تولید زخم‌پوش استفاده می‌کنند (Rode et al., 2018). پلی‌فنول‌ها امروزه کاربردهای گسترده‌ای در ساخت داربست‌های مختلف در مهندسی پزشکی دارند. این مواد، که گروه بزرگی از ترکیبات آلی را تشکیل می‌دهند، حلقه‌های فنولی متعددی در ساختار خود دارند که گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل در آن‌ها غالب هستند. از جمله پرکاربردترین آن‌ها می‌توان به گالیک اسید اشاره کرد (Liang et al., 2021). گالیک اسید یا اسید ۵-

محلول اریترومایسین ۴ درصد حل شد (Sadeghi et al., 2020). سپس، با استفاده از روش سونیکاسیون، محلول همگن‌سازی شد تا ذرات HNT به خوبی در محلول پراکنده شوند. در ادامه، محلول با استفاده از مگنت و دستگاه همزن حرارتی به مدت ۲۴ ساعت مخلوط شد. در ادامه، محلول حاصل سانتریفیوژ شد و پس از انجماد به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه خشک‌کن انجمادی قرار گرفت.

۲-۳- تهیه داربست کاراگینان-گالیک اسید حاوی

نانولوله‌ی هالوسایت بارگذاری شده با اریترومایسین

محلول ۱ درصد وزنی کاراگینان در دمای ۷۰ درجه‌ی سلسیوس و محلول ۱ درصد وزنی گالیک اسید در دمای اتاق روی همزن مغناطیسی جداگانه تهیه شدند. سپس، سه نمونه با نسبت‌های کاراگینان- گالیک اسید (به ترتیب) ۱:۱ (C₁G₁)، ۳:۱ (C₃G₁) و ۵:۱ (C₅G₁) از این دو محلول آماده شد. پس از گذشت زمان و هم‌دما شدن نمونه‌ها با دمای اتاق، پتاسیم کلراید به نسبت ۱۰ درصد حجمی محلول به هریک اضافه شد و حدود ۲۰ دقیقه روی همزن هم‌زده شدند. در ادامه، به ازای هر میلی‌لیتر محلول، ۵۰ ماکرولیترا آلدئید به هر نمونه اضافه شد. در انتها، به نسبت ۲ درصد وزنی پلیمرها، به هر ترکیب نانولوله‌ی هالوسایت بارگذاری شده با اریترومایسین افزوده شد و حدود ۲۰ دقیقه توسط همزن مغناطیسی هم‌زده شدند. نمونه‌ها، پس از قرارگیری و انجماد در فریزر ۲۰- درجه‌ی سلسیوس، به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه خشک‌کن انجمادی قرار گرفتند.

۲-۴- بررسی ریزساختار و درصد تخلخل داربست‌ها توسط

میکروسکوپ الکترونی روبشی

به منظور مشاهده و بررسی ساختار داربست از نظر میزان به هم پیوستگی حفرات، ارزیابی اندازه‌ی حفرات و میزان تخلخل آن‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی^۳ استفاده شد. بدین منظور مقاطع مختلفی از داربست‌ها تهیه شد و بعد از پوشش‌دهی با لایه‌ی نازکی از طلا بررسی شد. میانگین قطر منافذ هر داربست توسط نرم‌افزار ImageJ تعیین شد. به منظور تأیید حضور نانولوله‌ها و نحوه‌ی پراکندگی آن‌ها در اسفنج‌های کامپوزیتی آنالیز عنصری EDS و MAP نیز انجام شد.

محل معرفی شده‌اند. این نانولوله‌ها رس‌های آلومینوسیلیکات نانولوله‌ای زیست‌سازگار هستند که به طور گسترده در کاربردهای مختلف زیست‌پزشکی مطالعه شدند و با توجه به چگالی کم و آب‌دوستی بالا می‌توانند به راحتی در بایوپلیمرهای آب‌دوست پراکنده شوند (Diani & Gall, 2006).

علاوه بر این، سطح تماس بالای آن‌ها خاصیت جذب بسیار خوبی را فراهم می‌کند که به داروها اجازه می‌دهد تا به راحتی در داخل و روی آن‌ها بارگذاری شوند (Hanif et al., 2016). همان‌طور که ذکر شد، داربست‌ها باید خواص آنتی‌باکتریال داشته باشند. داروی اریترومایسین نوعی آنتی‌بیوتیک ماکرولید است که در درمان انواع وسیعی از عفونت‌های باکتریایی استفاده می‌شود. همچنین، ممکن است برای جلوگیری از عفونت برخی از باکتری‌ها مصرف شود. بارگذاری این دارو در نانولوله‌های هالوسایت و داربست مدنظر و رهایش توسط این سیستم در موضع زخم سبب کاهش عفونت‌های باکتریایی و تسریع روند بهبود زخم خواهد شد (De Souza et al., 2016). هدف از این پژوهش ساخت و بررسی خواص داربست کاراگینان-گالیک اسید حاوی نانولوله‌ی هالوسایت بارگذاری شده با اریترومایسین به منظور یافتن نسبت بهینه‌ی این ترکیب برای دستیابی به خواص فیزیکی، مکانیکی و بیولوژیکی مطلوب و نیز افزایش کارایی این داربست برای کاربردهای مهندسی بافت پوست است. ابتدا نانولوله‌های هالوسایت حاوی اریترومایسین تهیه شدند. سپس، داربست‌های کاراگینان-گالیک اسید با نسبت‌های مختلف همراه با بارگذاری دارو سنتز شدند و خواص آن‌ها ارزیابی شد.

۲-مواد و روش تحقیق

۲-۱- مواد اولیه

کاراگینان، گالیک اسید و نانولوله‌ی هالوسایت از شرکت سیگما^۱، محلول اریترومایسین ۴ درصد از شرکت بهروزان، گلوکار آلدهید ۲۵ درصد، اتانول ۹۰ درصد و پتاسیم کلراید جامد از شرکت مرک^۲ و PBS از شرکت biobench تهیه شدند.

۲-۲- تهیه نانولوله‌ی هالوسایت حاوی اریترومایسین

در ابتدا ۳/۶ میلی‌گرم نانولوله‌ی هالوسایت در ۶۰ میلی‌لیتر

۲-۵- بررسی استحکام فشاری

از غوطه‌ور شدن در حالت خشک با استفاده از ترازوی دیجیتال (با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم) وزن شدند. پس از ۲۴ ساعت، نمونه‌های متورم از محلول خارج و بر روی کاغذ صافی غلتانده شدند تا آب اضافی سطحی آن‌ها خارج شود. وزن نمونه‌های متورم اندازه‌گیری شد و درصد جذب آب با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه شد.

$$\text{Swelling ratio}(\%) = \frac{W_s - W_0}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

در این فرمول، W_s وزن نمونه بعد از تورم و W_0 وزن نمونه در حالت خشک است.

۲-۹- بررسی سرعت تخریب داربست‌ها

بررسی میزان تخریب داربست‌ها^۵ از طریق غوطه‌وری آن‌ها در محلول PBS در چهار بازه‌ی زمانی ۶، ۱۰، ۲۴ و ۷۲ ساعت انجام شد. به این منظور، وزن مشخصی از داربست‌ها در مقدار مشخصی از محلول PBS غوطه‌ور و در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس در بازه‌های زمانی ذکر شده نگهداری شد. در هر بازه‌ی زمانی، نمونه‌ها از محلول خارج شدند و پس از خشک شدن کامل، وزن آن‌ها از طریق ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. درصد تخریب با استفاده از رابطه‌ی زیر مورد محاسبه شد.

$$\text{Weight loss ratio} (\%) = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad (2)$$

در این فرمول، W_1 وزن خشک اولیه و W_2 وزن خشک ثانویه است.

۲-۱۰- ارزیابی خاصیت آنتی‌باکتریالی داربست‌ها توسط

آزمون شمارش کلونی

به منظور اجرای آزمون حساسیت ضدباکتریایی از داربست‌ها به روش شمارش کلونی، از باکتری‌های گرم مثبت استفیلوکوکوس اورئوس^۶ و گرم منفی ایشریشیا کولی^۷ استفاده شد. پیش از اجرای آزمون، تمام وسایل مورد استفاده توسط اتوکلاو استریل شدند و تمام مراحل زیر هود بیولوژیکی انجام شد. ابتدا با استفاده از باکتری با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند (معادل 1.5×10^8 CFU/ml) با محلول سرم فیزیولوژیک

استحکام مکانیکی داربست‌ها برای عملکرد بهتر اهمیت قابل توجهی دارد. از این رو، آزمون مکانیکی برای تمام نمونه‌ها تحت تنش فشاری انجام شد. برای این آزمون، نمونه‌هایی به شکل استوانه‌هایی با قطر تقریبی ۱ سانتی‌متر و ارتفاع ۲ سانتی‌متر آماده شدند. آزمون فشار به صورت تک‌محوری اعمال شد. نمونه‌ها بین دو فک دستگاه قرار داده شدند و نیرو با سرعت ۰/۵ میلی‌متر بر دقیقه اعمال شد. اندازه‌ی مدول الاستیک داربست‌ها از شیب خط ناحیه‌ی الاستیک منحنی‌های به‌دست آمده، تعیین شدند. به علاوه، استحکام فشاری داربست‌ها از نقاط خطی، که از ۱ درصد کرنش به موازات قسمت الاستیک منحنی تنش-کرنش کشیده می‌شود به‌دست آمد.

۲-۶- آزمون طیف‌سنجی تبدیل فوریه‌ی مادون قرمز

برای بررسی و شناسایی پیوندها و گروه‌های شیمیایی موجود در داربست‌های سنتز شده از دستگاه طیف‌سنجی تبدیل فوریه‌ی مادون قرمز^۱ (شرکت Thermo مدل AVATAR ساخت کشور آمریکا) در محدوده‌ی عدد موج 400 cm^{-1} تا 4000 استفاده شد.

۲-۷- بررسی میزان رهائش داروی اریترومايسين از

داربست‌ها با آنالیز اسپکتروسکوپی مرئی ماوراء بنفش^۲

اسپکتروفتومتر UV-Vis شدت نور عبوری از محلول نمونه را در یک کووت اندازه‌گیری می‌کند و نتایج به‌دست‌آمده را با شدت نور اولیه (نوری که هنوز از نمونه عبور نکرده است) مقایسه می‌کند. از این آزمون برای بررسی غلظت و میزان رهائش دارو استفاده شد.

۲-۸- بررسی میزان جذب آب داربست‌ها^۳

رفتار تورمی و جذب آب داربست‌های به‌دست آمده با غوطه‌وری آن‌ها در محلول فسفات بافر سالین^۴ طی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس بررسی شد. همه‌ی نمونه‌ها قبل

1 FTIR

2 UV-Visible Spectroscopy

3 Water Uptake

4 Phosphate Buffered Saline (PBS)

5 Weight Loss

6 Staphylococcus aureus

7 Escherichia coli

که A_{sample} و $A_{control}$ به ترتیب محلول کنترل DPPH و محلول DPPH را با مقادیر جذب نمونه‌ها نشان می‌دهند.

۲-۱۲- ارزیابی زنده‌مانی، رنگ‌آمیزی دی^۲ و مهاجرت سلول‌های فیبروبلاست روی داربست‌ها

برای بررسی میزان زیست‌سازگاری داربست‌های ساخته‌شده، آزمون سمیت سلولی برای هر نمونه با استفاده از سلول‌های فیبروبلاست موشی رده 3T3 روزهای ۱ و ۳ انجام شد. به منظور بررسی سمیت نمونه‌ها و تأثیر آنها بر رشد و تکثیر سلول‌ها، فرایند عصاره‌گیری بر اساس استاندارد ایزو ۱۰۹۹۳-۵ انجام شد که طی آن به هر نمونه، با وزن ۵ میلی‌گرم، یک میلی‌لیتر محیط کشت افزوده شد. سپس، در فواصل زمانی مشخص به محیط خارج و به سلول‌ها افزوده شد. شرایط محیط مشخصی محیط کشت نیز شاهد در نظر گرفته شد. شرایط محیط کشت تا حد امکان مشابه بدن، دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس و pH خنثی در بازه‌های زمانی روزهای ۱ و ۳ شبیه‌سازی شد. برای بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌ها از آزمون دی‌متیل تیازول دی‌فنیل تترازولیم بروماید^۳ استفاده شد. ابتدا، ۱۰۴ سلول درون پلیت کشت سلولی ۹۶ چاهکی ریخته شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفت تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. عصاره‌ی گرفته‌شده از هر نمونه به چاهک کشت افزوده شد و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت این عصاره‌ها قرار گرفتند. پس از آن، از محیط کشت خارج شدند و ۱۰۰ ماکرولیتر MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد.

پس از گذشت ۴ ساعت، محلول روی سلول‌ها خارج شد و محلول DMSO برای حل شدن بلورهای فرامازون تشکیل‌شده درون سلول‌ها به هر چاهک وارد شد. پس از نیم ساعت، شدت رنگ ایجادشده در طول موج ۴۵۴ نانومتر محاسبه شد. چاهک‌های دارای سلول بیشتر چگالی نوری^۴ بالاتری نسبت به چاهک‌های با سلول کمتر نشان می‌دهند. بنابراین، می‌توان از رابطه‌ی زیر چاهک دارای مقدار سلول بیشتر را مشخص و با نمونه‌ی شاهد مقایسه کرد.

$$\% \text{ Viability} = \frac{\text{Average optical density of samples}}{\text{Average optical density of control}} \times 10 \quad (۴)$$

سوسپانسیون تهیه شد. در ادامه، برای رسیدن به تعداد باکتری موردنظر در محلول، سوسپانسیون باکتری رقیق‌سازی شد. در محیط کشت مایع غلظت مورد نیاز نمونه تهیه و به منظور رسیدن به غلظت نهایی 1×10^6 CFU/ml به سوسپانسیون باکتری افزوده شد و در شیکر انکوباتور قرار داده شد. در ادامه در بازه‌ی زمان‌های ۱، ۳، ۶ و ۲۴ ساعت نمونه‌برداری و کشت از محلول انجام شد. میزان ۰.۱ سی‌سی از نمونه‌ی برداشته شده به روش spread plate در محیط کشت روی سطح پلیت پخش شد. سپس در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده می‌شود. بعد از گذشت ۲۴-۴۸ ساعت، کلنی‌های تشکیل‌شده توسط دستگاه Colony Count شمارش می‌شوند. درصد کشندگی و لگاریتم کاهش بر اساس تعداد کلونی در واحد حجم محاسبه می‌شود.

۲-۱۱- ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی داربست‌ها

آنالیز ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش رادیکال ۲،۲-دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازیل^۱ آزمون‌ی است که برای سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات گوناگون اجرا می‌شود. اساس این روش بر مبنای احیای رادیکال آزاد DPPH به وسیله‌ی آنتی‌اکسیدان‌ها در غیاب سایر رادیکال‌های آزاد در محیط است. نتیجه‌ی حاصل شده برای یک ترکیب عموماً با ترکیب آنتی‌اکسیدانی شناخته‌شده‌ای مانند آسکوربیک اسید مقایسه می‌شود. در این روش، فعالیت نمونه برای پاکسازی رادیکال DPPH سنجیده می‌شود.

اساس عمل کاهش محلول الکی DPPH در حضور آنتی‌اکسیدان‌های دهنده‌ی هیدروژن مخصوصاً ترکیبات فنلی است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها، با استفاده از روش مهار رادیکال DPPH، شامل ۳ میلی‌گرم نمونه‌ی غوطه‌ور در ۳ میلی‌لیتر محلول ۷۰ میکرومولار DPPH، تهیه شده در متانول و نگهداری در تاریکی به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس بررسی شد. برای اندازه‌گیری جذب محلول‌ها از طیف‌سنجی UV-Vis در ۵۱۷ نانومتر استفاده شد. درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس رابطه‌ی زیر محاسبه شد:

$$\text{Antioxidant Activity}(\%) = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (۳)$$

درواقع، در این روش، براساس نوسانات دمایی در نمونه‌ها تخلخل ایجاد می‌شود؛ به این صورت که ابتدا نمونه‌ها در فریزر ۲۰- درجه‌ی سلسیوس منجمد می‌شوند که این کار موجب یخ زدن آب موجود در ساختار داربست شده است و با داشتن نوسانات دمایی مناسب و زمان مشخص می‌توان اندازه و پراکندگی تخلخل‌های مدنظر را به‌دست آورد (Grenier et al., 2019). تصاویر میکروساختار داربست‌ها در شکل ۱ و نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار image z نشان می‌دهد که کمترین میانگین سایز تخلخل‌ها مربوط به داربست C_1G_1 با مقدار $3/6 \pm 131/73$ میکرومتر است. با افزایش درصد کاراگینان سایز تخلخل‌ها برای داربست‌های C_3G_1 و C_5G_1 به ترتیب به مقادیر $5/06 \pm 151/48$ میکرومتر و $3/2 \pm 164/07$ میکرومتر رسیده است. به عبارت دیگر، با افزایش میزان کاراگینان حفرات بزرگتری تشکیل شده است. سایز تخلخل‌ها در مهندسی بافت پوست معمولاً بین ۵۰ تا ۲۰۰ میکرومتر و درصد تخلخل معمولاً بین ۷۰ تا ۹۰ درصد است. این میزان تخلخل باعث تسهیل تبادل مواد مغذی، مهاجرت و تکثیر سلول‌ها و تشکیل بافت می‌شود (Al-Musawi et al., 2023). همانطور که جدول ۱ نشان می‌دهد، با افزایش نسبت کاراگینان در ساختار داربست‌ها، درصد تخلخل نیز افزایش یافته است. در واقع، حلال کاراگینان آب است، لذا با افزایش درصد کاراگینان میزان آب موجود در ساختار داربست افزایش می‌یابد که حین عملیات فریزدرایر و فرایند تصعید به تخلخل تبدیل شده و برای کاربردهای مهندسی بافت پوست مطلوب شده است. به‌طورکلی، ساختار متخلخل اسفنجی ساخته‌شده شرایط مهاجرت و چسبندگی سلولی را فراهم می‌کند و موجب تبادل مواد غذایی و مواد زائد بین ساختار سه‌بعدی و محیط اطراف می‌شود (MacEwan et al., 2017).

همچنین، از آزمون مهاجرت سلولی^۱، به‌منظور بررسی فرایند مهاجرت سلولی که نشان‌دهنده‌ی شدت و توان مهاجرت سلول‌ها از نواحی مملو از سلول به نواحی خراش‌یافته (خالی از سلول) است استفاده می‌شود. در این آزمون، پس از ایجاد یک خراش نازک بر سطحی که سلول‌ها بر روی آن کشت داده شده‌اند، بررسی مستمر و روزانه‌ی روند مهاجرت سلول‌ها در کنار تغییرات ریخت‌شناسی امکان‌پذیر خواهد بود.

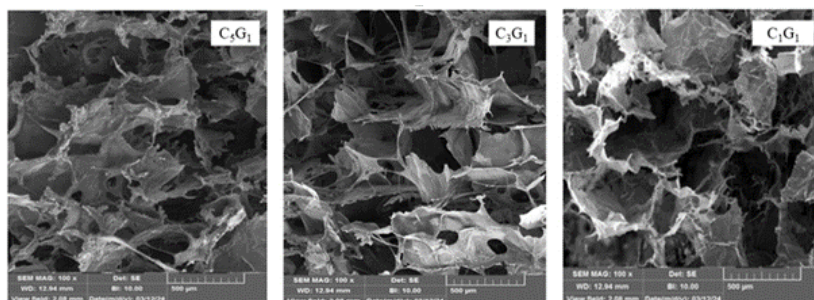
از طرف دیگر، برای بررسی میزان سلول‌های زنده در داربست‌ها از روش رنگ‌آمیزی دپی استفاده شد. دپی یک رنگ فلورسنت است که به‌شدت به مناطق غنی از آدنین-تیمین در DNA متصل می‌شود. این رنگ در میکروسکوپ فلورسانس بسیار پرکاربرد است. از آنجاکه رنگ دپی می‌تواند از طریق یک غشای سلولی دست‌نخورده عبور کند، می‌توان از آن برای رنگ‌آمیزی سلول‌های زنده و فیکس شده استفاده کرد، اگرچه در سلول‌های زنده با کارایی کمتری از غشا عبور می‌کند و به‌همین ترتیب می‌توان از آن به‌عنوان یک نشانگر بررسی زنده‌مانی غشا استفاده کرد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مشخصه‌یابی داربست‌های کاراگینان-گالیک اسید

حاوی نانولوله‌ی هالوسایت دارای اریترومايسين

تصاویر میکروسکوپ الکترونی داربست‌های ساخته شده با نسبت‌های مختلف کاراگینان-گالیک اسید در شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، داربست‌ها دارای حفرات باز هستند که با یکدیگر ارتباط دارند و نانولوله‌های حاوی دارو نیز درون داربست اسفنجی پراکنده شده‌اند و بین تخلخل‌ها گیر افتاده‌اند. استفاده از روش فریزدرایر برای ساخت داربست موجب پیدایش تخلخل در داربست‌ها شده است.



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترون روبشی داربست با بزرگنمایی ۲۰۰ میکرومتر

شده است. همانطور که در جدول مشاهده می‌شود، بیشترین مدول مربوط به نمونه‌ی C1G1 است که برابر با $۰/۳۸ \pm ۲/۱۲$ کیلوپاسکال است. با افزایش نسبت کاراگینان این مقدار به $۰/۱۱ \pm ۱/۳۹$ کیلوپاسکال در نمونه‌ی C3G1 و $۰/۱۶ \pm ۱/۳۹$ کیلوپاسکال در نمونه‌ی C5G1 کاهش یافته است. بالا رفتن میزان کاراگینان در نمونه‌ها باعث بالا رفتن درصد و اندازه‌ی تخلخل‌ها و در نتیجه کاهش استحکام داربست‌ها شده است. این موضوع با توجه به نتایج حاصل از میزان تخلخل‌ها قابل پیش‌بینی بود، زیرا طبق رابطه‌ی گیبسون-اشبی با افزایش تخلخل میزان استحکام کاهش می‌یابد:

$$E = E_s (1 - V)^2 \quad (5)$$

در این رابطه، E مدول یانگ ماده‌ی متخلخل و E_S مدول یانگ ماده‌ی جامد و V درصد تخلخل را نشان می‌دهد. در نتیجه، با افزایش تخلخل در ساختار داربست‌ها، استحکام آن‌ها کاهش می‌یابد.

جدول ۲. مدول و استحکام فشاری داربست‌ها

نمونه	مدول فشاری (KPa)	استحکام فشاری (KPa)
C1G1	$۰/۳۸ \pm ۲/۱۲$	$۰/۳۸ \pm ۲/۱۲ \times ۱۰^{-۲}$
C3G1	$۰/۱۱ \pm ۱/۳۹$	$۰/۱۱ \pm ۱/۳۹ \times ۱۰^{-۲}$
C5G1	$۰/۱۶ \pm ۱/۳۹$	$۰/۱۶ \pm ۱/۳۹ \times ۱۰^{-۲}$

۳-۴- بررسی میزان رهایش داروی اریترومايسين از داربست‌ها با آنالیز اسپکتروسکوپی مرئی ماوراءبنفش

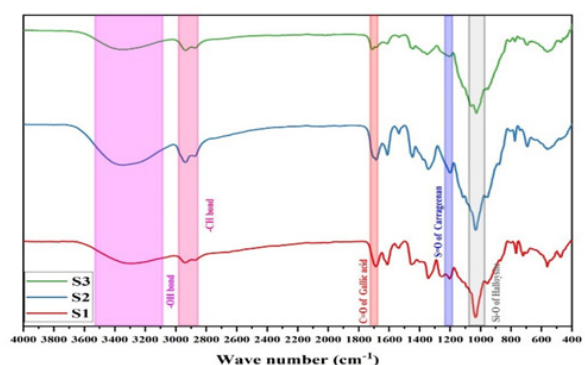
نتایج بررسی آزمون رهایش داروی اریترومايسين از داربست‌ها در محیط فسفات بافرسالین در بازه‌های ۶، ۱۰، ۲۴ و ۷۲ ساعت در نمودار شکل ۳ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، بیشترین میزان رهایش دارو مربوط به نمونه‌ی C5G1 است و در نمونه‌ی C3G1 نیز رهایش دارو بیشتر از نمونه‌ی C1G1 است. علت این امر را می‌توان به درصد و اندازه‌ی تخلخل داربست‌ها نسبت داد. همان‌طور که در تحلیل تصاویر به‌دست‌آمده از SEM گفته شد، میزان و درصد تخلخل نمونه‌ها به صورت $C1G1 < C3G1 < C5G1$ است که این مسئله نتایج ناشی از این میزان رهایش را توجیه می‌کند. بررسی نمودار رهایش داروی اریترومايسين از داربست‌های کاراگینان-گالیک‌اسید در محیط PBS نشان داد که رهایش دارو در نمونه‌ها طی ۷۲ ساعت شامل دو فاز است: رهایش انفجاری اولیه (تا ۱۰

جدول ۱. میانگین اندازه‌ی تخلخل و درصد تخلخل داربست‌ها

داربست	میانگین سایز تخلخل	درصد تخلخل
C1G1	$۱۳۱/۷۳ \pm ۳/۶$	$۶۲/۴۳ \pm ۱/۸$
C3G1	$۱۵۱/۴۸ \pm ۵/۰۶$	$۶۹/۲۸ \pm ۲/۱$
C5G1	$۱۶۴/۰۷ \pm ۳/۲$	$۷۱/۲۸ \pm ۳/۹$

۳-۲- آزمون طیف‌سنجی تبدیل فوریه‌ی مادون قرمز

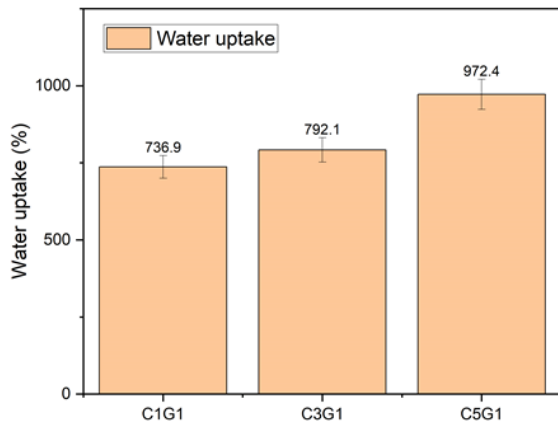
در شکل ۲، نمودار FTIR داربست‌های ساخته شده آورده شده است. در نمودار FTIR نانولوله‌های هالوسایت حاوی اریترومايسين معمولاً دو پیک مهم قابل تشخیص هستند. اولین پیک مربوط به گروه‌های عاملی اریترومايسين است که در محدوده‌ی $۳۳۰۰-۳۴۰۰ \text{ cm}^{-۱}$ قرار دارد و با پیک هیدروکسیل‌های اریترومايسين مطابقت دارد. دومین پیک مهم مربوط به نانولوله‌های هالوسایت است که در حدود $۱۰۰۰-۱۱۰۰ \text{ cm}^{-۱}$ قرار دارد و با پیک‌های سیلیکات هالوسایت مطابقت دارد. این دو پیک معمولاً برای تشخیص نانولوله‌های هالوسایت حاوی اریترومايسين در نمودار FTIR استفاده می‌شوند. از طرف دیگر، کاراگینان یک پیک در بازه‌ی $۱۲۶۰-۱۲۱۰ \text{ cm}^{-۱}$ دارد که نشان دهنده‌ی پیوندهای S=O است که در گروه‌های سولفاتی آن وجود دارد. در حالی که باند کششی در محدوده‌ی $۳۰۰۰-۳۵۰۰ \text{ cm}^{-۱}$ را می‌توان به گروه‌هایی که O=H دارد نسبت داد. به جز پیک $۱۲۶۰ \text{ cm}^{-۱}$ ، دو پیک ۹۳۰ و $۸۴۵ \text{ cm}^{-۱}$ نیز معرف وجود گروه‌های سولفاتی هستند.



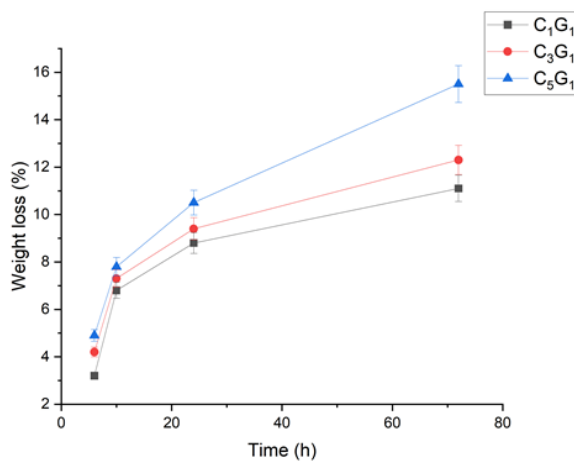
شکل ۲. طیف FTIR برای داربست‌های کاراگینان-گالیک‌اسید حاوی نانولوله‌ی هالوسایت دارای اریترومايسين

۳-۳- بررسی استحکام فشاری

اندازه‌گیری خواص فشاری از دیگر فاکتورهای مهم در طراحی داربست‌های مهندسی بافت پوست است. مدول و استحکام فشاری داربست‌های ساخته شده در جدول ۲ آورده



شکل ۴. نمودار ستونی درصد جذب آب نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در آب دی‌یونیزه



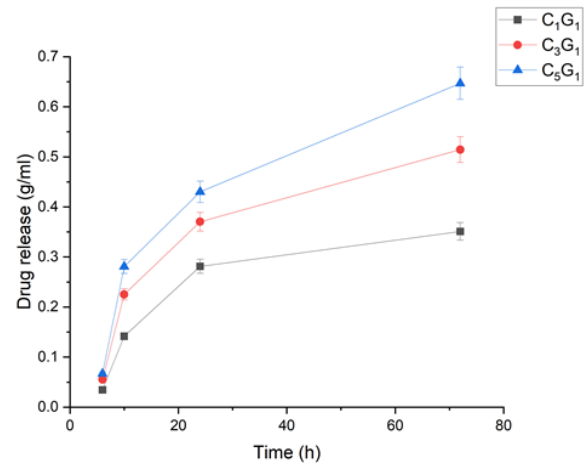
شکل ۵. نمودار درصد تخریب داربست‌ها طی بازه‌های ۶، ۱۰، ۲۴ و ۷۲ ساعت

۳-۷- ارزیابی خاصیت آنتی‌باکتریال داربست‌ها

خواص آنتی‌باکتریالی نمونه‌ها در برابر هر دو باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و گرم منفی اشیریشیا کلی در شکل ۶ نشان داده شده است. همانطور که گفته شد داربست‌ها حاوی داروی اریترومایسین هستند که یک آنتی‌بیوتیک ماکرولید است که عمدتاً برای درمان عفونت‌های باکتریایی استفاده می‌شود. این آنتی‌بیوتیک، با مهار سنتز پروتئین‌های باکتریایی، از رشد و تکثیر باکتری‌ها جلوگیری می‌کند.

از سوی دیگر، مطالعات متعدد نشان داده‌اند که اریترومایسین تأثیر بیشتری بر استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به اشیریشیا کلی دارد. برای مثال، تحقیقات دوآن و همکاران (۲۰۱۵) نشان می‌دهد که اریترومایسین با مهار فعالیت ریبوزومی استافیلوکوکوس اورئوس به شدت از رشد و تکثیر آن جلوگیری می‌کند. در مقابل، تأثیر اریترومایسین بر اشیریشیا کولی نسبتاً کمتر است، زیرا برخی

ساعت) ناشی از تخلخل بالا و رهایش غیرفیکسی بعدی (۱۰ تا ۷۲ ساعت) با مکانیسم ترکیبی نفوذ و تخریب. بیشترین رهایش در C5G1 به دلیل تخلخل و نرخ تخریب بالاتر، و کمترین در C1G1 مشاهده شد.



شکل ۳. نمودار غلظت داروی آزادشده توسط داربست‌ها در بازه‌های ۶، ۱۰، ۲۴ و ۷۲ ساعت

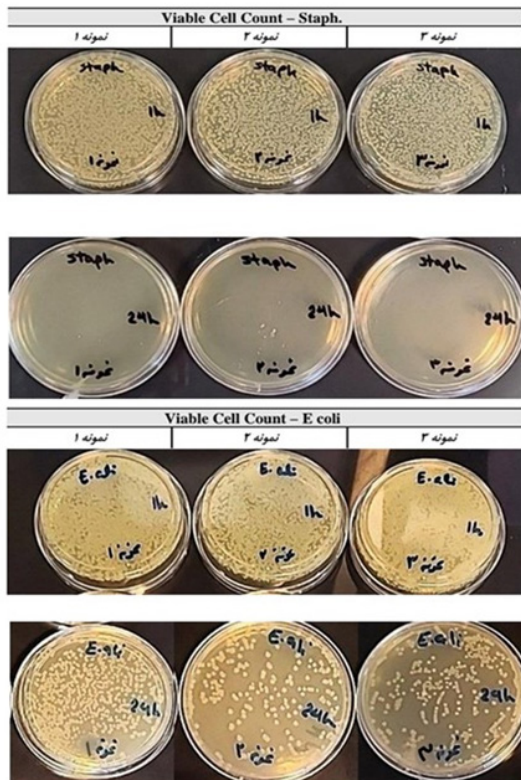
۳-۵- بررسی میزان جذب آب داربست‌ها

نمودارهای ستونی جذب آب داربست‌های کاراگینان-گالیک اسید حاوی نانولوله‌ی هالوسایت دارای اریترومایسین در شکل ۵ نشان داده شده است. کاراگینان ماهیتی آب‌دوست دارد. از طرف دیگر، داربست‌ها نیز به صورت ساختار سه‌بعدی متخلخل هستند. به همین دلیل، نمونه‌ها پس از قرارگیری در محلول PBS به سرعت متورم می‌شوند. همچنین، داربست‌ها از خود پایداری خوبی نشان دادند و طی ۲۴ ساعت تخریب نشدند.

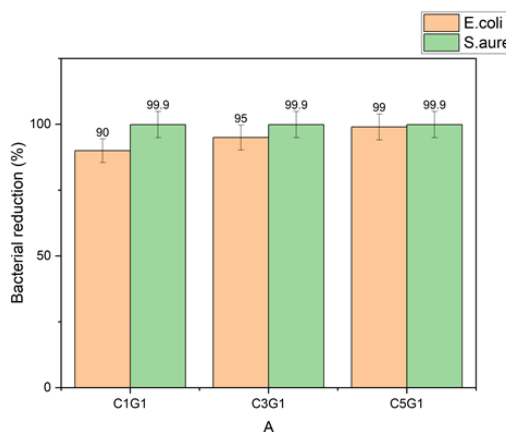
همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش درصد کاراگینان در ساختار داربست‌ها، میزان جذب آب نیز افزایش یافته است. کمترین میزان جذب آب نیز متعلق به نمونه‌ی C1G1 است. با توجه به شکل ۴ می‌توان دریافت با افزایش میزان کاراگینان تورم افزایش یافته است. از آنجاکه کاراگینان یک پلیمر آب‌دوست است، با افزایش مقدار این پلیمر در ساختار داربست جذب آب نیز افزایش یافته است.

به عبارت دیگر، حضور گروه‌های سولفونات در نمونه‌ها با افزایش کاراگینان که قابلیت جذب آب را بالا می‌برد می‌تواند دلیلی بر این مسئله باشد. به علاوه، افزایش قطر حفرات و مقدار درصد تخلخل در نمونه‌ها به دلیل افزودن مقدار کاراگینان باعث این موضوع می‌شود که این امر با نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی تطابق دارد.

محافظت می‌کنند. رادیکال‌های آزاد مواد شیمیایی نامستقر و بی‌پایانی هستند که می‌توانند با سلول‌ها، پروتئین‌ها و DNA واکنش بدهند و آسیب‌های جدی به بدن وارد کنند. گالیک اسید به‌عنوان مولکول آنتی‌اکسیدان در جلوگیری از آسیب به سلول‌ها و حفظ سلامت بدن نقش مهمی دارد (Thangavel et al., 2016). در نتیجه، با افزایش مقدار گالیک اسید در ترکیب یک داربست خواص آنتی‌اکسیدانی آن افزایش می‌یابد که این امر نتایج به‌دست‌آمده را توجیه می‌کند.



شکل ۶. نتایج حاصل از ارزیابی خواص آنتی‌باکتریال داربست‌ها روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی



شکل ۷. نمودار درصد کاهش زنده‌مانی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی در معرض داربست‌ها

از سویه‌های اشریشیا کولی مقاوم به اریترومایسین هستند (Peterson & Kaur, 2018).

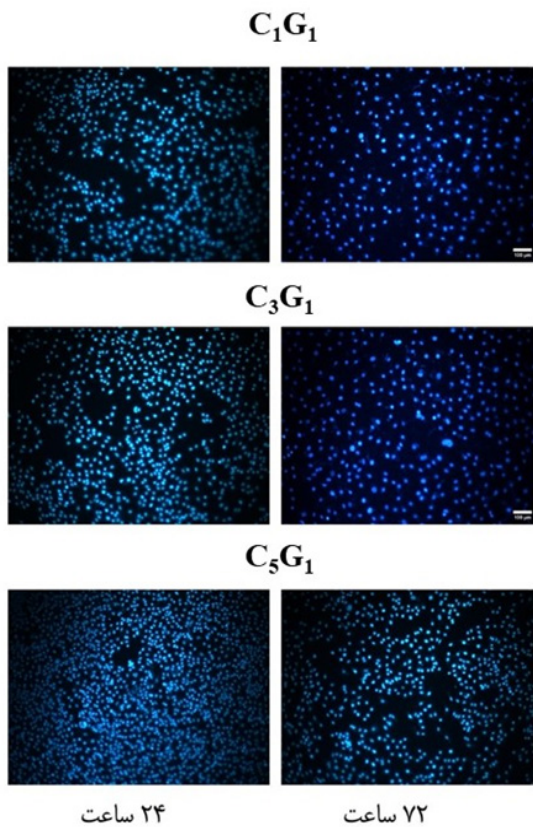
از سوی دیگر، گالیک اسید یک ترکیب پلی‌فنول طبیعی است که خواص ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی دارد. تحقیقات نشان داده است که گالیک اسید می‌تواند بر روی هر دو سویه‌ی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی تأثیرگذار باشد، اما میزان تأثیر آن متفاوت است. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که گالیک اسید تأثیر قابل‌توجهی بر استافیلوکوکوس اورئوس دارد. برای مثال، تحقیقات بورگز و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که گالیک اسید می‌تواند غشای سلولی استافیلوکوکوس اورئوس را تخریب کند و رشد این باکتری را مهار کند (Borges et al., 2013).

تأثیر گالیک اسید بر باکتری‌های گرم منفی مانند اشریشیا کلی معمولاً کمتر از باکتری‌های گرم مثبت است. این موضوع به دلیل ساختار پیچیده‌تر غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی است که مانند یک سد برای عوامل ضدباکتریایی عمل می‌کند (Cushnie & Lamb, 2011).

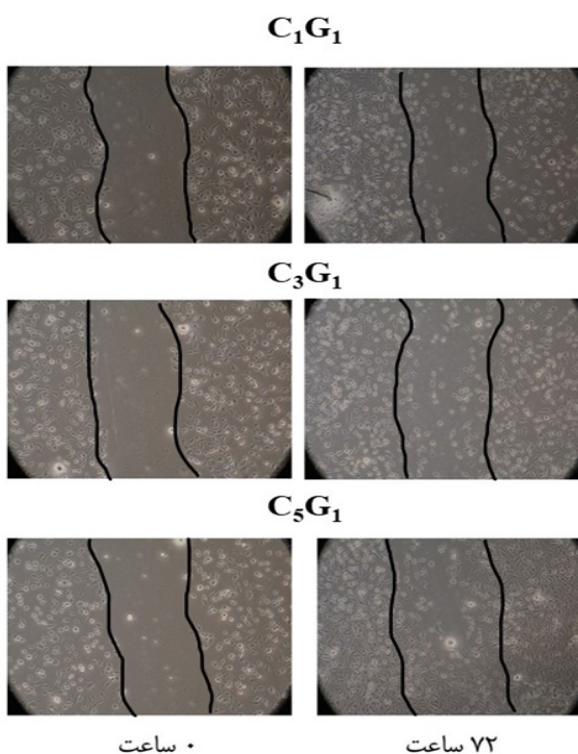
همانطور که در شکل ۷ قابل مشاهده است، نتایج به‌دست‌آمده از آزمون آنتی‌باکتریال حاکی از آن است که هر سه داربست مهارکنندگی قابل‌توجهی روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارند، اما نرخ کاهش باکتری گرم منفی از گرم مثبت کمتر بوده است. علت این امر را می‌توان به اثرگذاری بیشتر داروی اریترومایسین و گالیک اسید روی باکتری گرم مثبت نسبت داد. در شکل ۷ نیز نمودار فعالیت آنتی‌باکتریالی نمونه‌ها روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داده شده است.

۳-۸- ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی داربست‌ها

نمودار ستونی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی داربست‌ها در شکل ۸ نشان داده شده است. بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌ی اول C1G1 با نسبت یک به یک از کاراگینان و گالیک اسید مشاهده می‌شود. از سوی دیگر، در شکل ۹ میزان ره‌ایش گالیک اسید در هر سه نمونه طی ۷۲ ساعت با دستگاه UV-visible اندازه‌گیری شده است. مطابق این شکل، بیشترین میزان ره‌ایش گالیک اسید در نمونه‌ی C1G1 مشاهده می‌شود. گالیک اسید دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است و بافت‌ها را از آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد در بدن

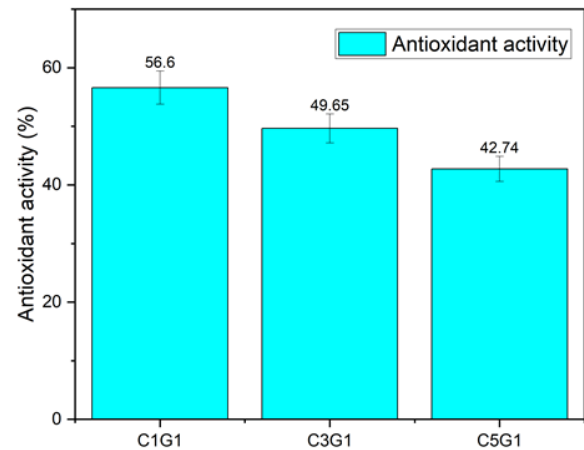


شکل ۱۱. تصاویر رنگ آمیزی دیپی داربست‌ها در ۲۴ و ۷۲ ساعت

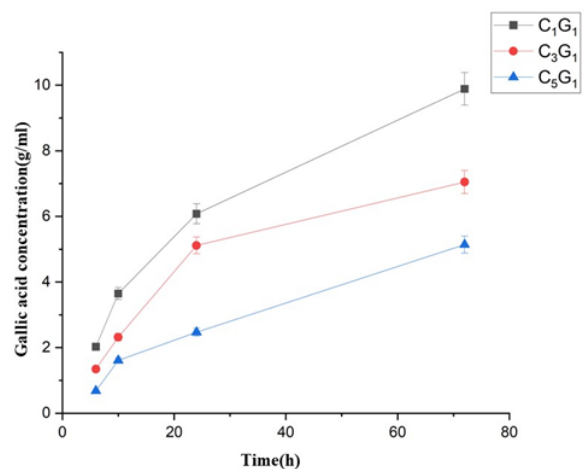


شکل ۱۲. تصاویر آزمون خراش طی ۷۲ ساعت

همانطور که قبل‌تر اشاره شد، با افزایش مقدار کاراگینان در ترکیب، آب‌دوستی نیز افزایش می‌یابد. آب‌دوستی به تمایل یک سطح یا ماده برای جذب و تعامل با مولکول‌های آب اشاره دارد.



شکل ۸. نمودار ستونی درصد آنتی‌اکسیدان داربست‌ها

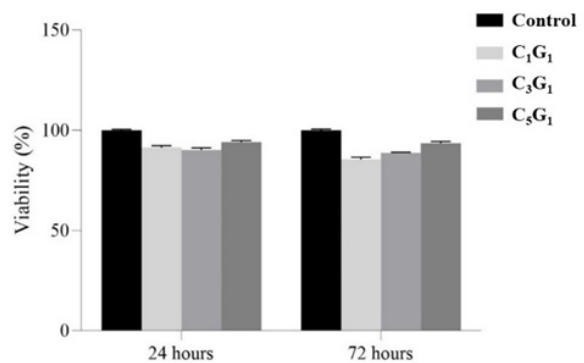


شکل ۹. نمودار رهایش گالیک‌اسید طی ۷۲ ساعت در داربست‌ها

۳-۹- بررسی زنده‌مانی، تکثیر و مهاجرت سلول‌های

فیبروبلاست روی داربست‌ها

شکل ۱۰ نمودار کمی ارزیابی زنده‌مانی سلولی برای داربست‌های ساخته‌شده با نسبت‌های مختلف بعد از گذشت ۲۴ و ۷۲ ساعت را نشان می‌دهد. همچنین، نتایج رنگ‌آمیزی دیپی در شکل ۱۱ و نتایج آزمون خراش در شکل ۱۲ آورده شده است.



شکل ۱۰. نمودار بررسی زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست در

معرض داربست‌ها طی ۲۴ و ۷۲ ساعت

این ویژگی سطحی می‌تواند تأثیر بسیاری بر رفتار سلول‌های فیروبلاست به‌ویژه در زمینه‌ی زنده‌مانی و مهاجرت آن‌ها داشته باشد. سلول‌های فیروبلاست، مانند بسیاری از سلول‌های دیگر، به محیط مناسبی برای بقا نیاز دارند.

سطوح آب‌دوست می‌توانند، با ایجاد محیط مرطوب و جلوگیری از دفع آب از سطح، شرایط مطلوب‌تری برای زنده‌مانی سلول‌ها فراهم کنند. این سطوح معمولاً باعث افزایش چسبندگی سلول‌ها به سطح می‌شوند که این موضوع می‌تواند به بهبود زنده‌مانی کمک کند. همچنین، آب‌دوستی سطحی می‌تواند بر روی تعاملات پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و گیرنده‌های سلولی تأثیر بگذارد که این مسئله می‌تواند مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با تکثیر سلولی را فعال‌تر کند. به‌طور کلی، آب‌دوستی سطحی می‌تواند نقش مثبت و مؤثری در زنده‌مانی، تکثیر و عملکرد فیروبلاست‌ها داشته باشد که این امر برای کاربردهای مهندسی بافت بسیار حائز اهمیت است. کاراگینان به‌دلیل ماهیت آب‌دوست خود قادر است آب را جذب و محیطی مرطوب اطراف سلول‌ها ایجاد کند. این محیط مرطوب به جلوگیری از خشک شدن سلول‌ها و فراهم کردن شرایط مناسب برای تبادل مواد مغذی و دفع مواد زائد کمک می‌کند که در نهایت زنده‌مانی سلول‌ها را افزایش می‌دهد (MacEwan et al., 2017).

همان‌طور که در نتایج آزمون MTT نیز مشخص است، با افزایش مقدار کاراگینان در ترکیب داربست‌ها و افزایش آب‌دوستی، زنده‌مانی سلول‌های فیروبلاست نیز افزایش یافته است و نمونه‌ی شماره‌ی C₅G₁ بیشترین میزان زنده‌مانی را دارد. از سوی دیگر، رنگ‌آمیزی آزمون دپی نمونه‌ها نیز این تفاسیر را تأیید می‌کند. در آزمون خراش نیز توانایی مهاجرت سلولی در نمونه‌ها بررسی شده است که اینجا نیز نمونه‌ی C₅G₁ در مقایسه با سایر نمونه‌ها قابلیت بیشتری از خودش نشان داده است. مهاجرت فیروبلاست‌ها فرایندی حیاتی در ترمیم زخم و بازسازی بافت است. آب‌دوستی سطح می‌تواند با تأثیر بر ساختار پروتئین‌های خارج‌سلولی (مانند فیرونکتین و کلاژن) و همچنین بهبود چسبندگی موقت سلول‌ها به این سطوح مهاجرت سلول‌ها را تسهیل کند. سطوح آب‌دوست، به‌دلیل داشتن پیوندهای ضعیف‌تر با پروتئین‌های جذب‌شده، به فیروبلاست‌ها امکان می‌دهند به راحتی از یک نقطه به نقطه‌ی دیگر مهاجرت کنند.

ساختار سه‌بعدی داربست باعث تسهیل مهاجرت سلول‌ها

در این ساختارها می‌شود. از سوی دیگر، آب‌دوستی داربست‌های تهیه شده به‌دلیل حضور کاراگینان، به فیروبلاست‌ها اجازه می‌دهد تا به راحتی به ساختار داربست بچسبند و درون آن حرکت کنند. آب‌دوستی کاراگینان می‌تواند چسبندگی موقت سلول‌ها به سطح داربست را افزایش دهد، که این چسبندگی موقت برای مهاجرت سلول‌های فیروبلاست ضروری است. آب‌دوستی سطح کاراگینان به گونه‌ای است که تعاملی مناسب بین سطح و سلول را ایجاد می‌کند و به سلول‌ها امکان می‌دهد به راحتی مهاجرت کنند (Mokhtari et al., 2021).

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، داربست‌های کاراگینان-گالیک اسید حاوی نانولوله‌های هالوسایت بارگذاری شده با اریترومایسین، به‌منظور کاربرد مهندسی بافت پوست، در سه نسبت گوناگون ساخته و خواص آن‌ها بررسی شد. حضور نانولوله‌های هالوسایت حاوی اریترومایسین در ساختار داربست‌ها توسط آزمون FTIR تأیید شد. بر اساس تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، میانگین اندازه و درصد تخلخل داربست‌ها به‌دست آمد که بیشترین مقدار مربوط به نمونه C₅G₁ با بیشترین میزان کاراگینان بود و در نتیجه بیشترین میزان جذب آب، بیشترین میزان تخریب، بهترین میزان زنده‌مانی، مهاجرت و چسبندگی سلولی برای این نمونه اتفاق افتاد. از سوی دیگر، کمترین میزان استحکام فشاری و بیشترین میزان خاصیت آنتی‌باکتریال برای نمونه C₁G₁ بود. به‌طور کلی، نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان داد که خواص داربست کاراگینان-گالیک اسید حاوی نانولوله‌های هالوسایت بارگذاری شده با اریترومایسین به‌نسبت ۵ به ۱ می‌تواند داربست مناسبی برای کاربردهای مهندسی بافت پوست باشد. ساختار سه‌بعدی داربست باعث تسهیل مهاجرت سلول‌ها در این ساختارها می‌شود. از سوی دیگر، آب‌دوستی داربست‌های تهیه شده به‌دلیل حضور کاراگینان، به فیروبلاست‌ها اجازه می‌دهد تا به راحتی به ساختار داربست بچسبند و درون آن حرکت کنند. آب‌دوستی کاراگینان می‌تواند چسبندگی موقت سلول‌ها به سطح داربست را افزایش دهد، که این چسبندگی موقت برای مهاجرت سلول‌های فیروبلاست ضروری است. آب‌دوستی سطح کاراگینان به گونه‌ای است که تعاملی مناسب بین سطح و سلول را ایجاد می‌کند و به سلول‌ها امکان می‌دهد به راحتی مهاجرت کنند.

13. MacEwan, M. R., MacEwan, S., Kovacs, T. R., & Batts, J. (2017). What makes the optimal wound healing material? A review of current science and introduction of a synthetic nanofabricated wound care scaffold. *Cureus*, 9(10). <https://doi.org/10.7759/cureus.1736>
14. Mokhtari, H., Tavakoli, S., Safarpour, F., Kharaziha, M., Bakhsheshi-Rad, H. R., Ramakrishna, S., & Berto, F. (2021). Recent advances in chemically-modified and hybrid carrageenan-based platforms for drug delivery, wound healing, and tissue engineering. *Polymers*, 13(11), 1744. <https://doi.org/10.3390/polym13111744>
15. Mostafalu, P., Tamayol, A., Rahimi, R., Ochoa, M., Khalilpour, A., Kiaee, G., ... & Khademhosseini, A. (2018). Smart bandage for monitoring and treatment of chronic wounds. *Small*, 14(33), 1703509. <https://doi.org/10.1002/sml.201703509>
16. Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in microbiology*, 9, 2928. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>
17. Rode, M. P., Batti Angulski, A. B., Gomes, F. A., da Silva, M. M., Jeremias, T. D. S., de Carvalho, R. G., ... & Calloni, G. W. (2018). Carrageenan hydrogel as a scaffold for skin-derived multipotent stromal cells delivery. *Journal of Biomaterials Applications*, 33(3), 422-434. <https://doi.org/10.1177/0885328218795569>
18. Sadeghi, S., Nourmohammadi, J., Ghace, A., & Soleimani, N. (2020). Carboxymethyl cellulose-human hair keratin hydrogel with controlled clindamycin release as antibacterial wound dressing. *International journal of biological macromolecules*, 147, 1239-1247. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.251>
19. Thangavel, P., Ramachandran, B., & Muthuvijayan, V. (2016). Fabrication of chitosan/gallic acid 3D microporous scaffold for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 104(4), 750-760. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33603>
20. Yang, D. J., Moh, S. H., Son, D. H., You, S., Kinyua, A. W., Ko, C. M., ... & Kim, K. W. (2016). Gallic acid promotes wound healing in normal and hyperglucidic conditions. *Molecules*, 21(7), 899. <https://doi.org/10.3390/molecules21070899>

۵- سپاسگزاری

نویسندگان این تحقیق، از حمایت‌های دانشگاه تهران به‌واسطه‌ی در اختیار قرار دادن آزمایشگاه‌ها و امکانات پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

مراجع

1. Al-Musawi, M. H., Rashidi, M., Mohammadzadeh, V., Albukhaty, S., Mahmoudi, E., & Ghorbani, M. (2023). Development of a novel scaffold based on basil seed gum/chitosan hydrogel containing quercetin-loaded zein microsphere for bone tissue engineering. *Journal of Polymers and the Environment*, 31(11), 4738-4751. <https://doi.org/10.1007/s10924-023-02913-y>
2. Blair, M. J., Jones, J. D., Woessner, A. E., & Quinn, K. P. (2020). Skin structure–function relationships and the wound healing response to intrinsic aging. *Advances in wound care*, 9(3), 127-143. <https://doi.org/10.1089/wound.2019.1021>
3. Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial drug resistance*, 19(4), 256-265. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0244>
4. Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 38(2), 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014>
5. de Souza, R. F. B., de Souza, F. C. B., & Moraes, Â. M. (2016). Polysaccharide-based membranes loaded with erythromycin for application as wound dressings. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(22). <https://doi.org/10.1002/app.43428>
6. Diani, J., Liu, Y., & Gall, K. (2006). Finite strain 3D thermoviscoelastic constitutive model for shape memory polymers. *Polymer Engineering & Science*, 46(4), 486-492. <https://doi.org/10.1002/pen.20497>
7. Doan, K. V., Ko, C. M., Kinyua, A. W., Yang, D. J., Choi, Y. H., Oh, I. Y., ... & Kim, K. W. (2015). Gallic acid regulates body weight and glucose homeostasis through AMPK activation. *Endocrinology*, 156(1), 157-168. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1354>
8. Grenier, J., Duval, H., Barou, F., Lv, P., David, B., & Letourneur, D. (2019). Mechanisms of pore formation in hydrogel scaffolds textured by freeze-drying. *Acta Biomaterialia*, 94, 195-203. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.070>
9. Hanif, M., Jabbar, F., Sharif, S., Abbas, G., Farooq, A., & Aziz, M. (2016). Halloysite nanotubes as a new drug-delivery system: a review. *Clay Minerals*, 51(3), 469-477. <https://doi.org/10.1180/claymin.2016.051.3.03>
10. Korkina, L., De Luca, C., & Pastore, S. (2012). Plant polyphenols and human skin: friends or foes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1259(1), 77-86. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06510.x>
11. Liang, Y., He, J., & Guo, B. (2021). Functional hydrogels as wound dressing to enhance wound healing. *ACS nano*, 15(8), 12687-12722. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04206>
12. Liu, J., Yong, H., Liu, Y., & Bai, R. (2020). Recent advances in the preparation, structural characteristics, biological properties and applications of gallic acid grafted polysaccharides. *International journal of biological macromolecules*, 156, 1539-1555. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.202>