

ساخت و بررسی خواص داربست (کیتوسان / پلی وینیل پیرولیدون) حاوی کتیرا به روش خشکاندن انجمادی

حامد قمی^{۱*}، آزاده سپیانی^۲، مرجان میرحاج^۳

۱- استادیار، مرکز تحقیقات مواد پیشرفته، دانشکده مهندسی مواد، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، اصفهان، ایران

۲- کارشناسی ارشد، مهندسی بافت، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، اصفهان، ایران

۳- کارشناسی ارشد، مهندسی پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

*مسئول مکاتبات: hamed.ghomi@ma.iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۰۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۱۹)

چکیده: کیتوسان به عنوان یک جزء ماتریس خارج سلولی جهت تهیه داربست متخلخل در مهندسی بافت مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق، داربست کیتوسان و داربست کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون به عنوان شاهد و داربست کامپوزیت (کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون)/ کتیرا با نسبت های ۲۵:۷۵، ۵۰:۵۰ و ۷۵:۲۵ توسط روش خشکاندن انجمادی ساخته شد. اثر کتیرا بر خواص ساختاری و خواص آنتی باکتریال در نمونه ها مورد بررسی قرار گرفت. مورفولوژی سطح، خواص مکانیکی، درصد تخلخل و گروه های عاملی بر روی سطح نمونه ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، آزمون استحکام فشاری و طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که درصد تخلخل در داربست حاوی کتیرا نسبت به داربست بدون کتیرا افزایش یافته است. با حفظ نمونه ها در محلول بافر فسفات (PBS) برای ۱۴ روز، زیست تخریب پذیری داربست ها مورد بررسی قرار گرفته شد و نتایج نشان داد میزان تخریب در داربست (کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون)/ کتیرا با نسبت ۷۵:۲۵ افزایش یافت. نتایج نشان داد در داربست کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون حاوی کتیرا با نسبت (۷۵:۲۵) رشد باکتری استافیلوکوک اورئوس و اشرشیاکلی کاهش یافته است. بنابراین بر اساس نتایج این تحقیق، داربست های حاوی کتیرا باعث بهبود خواص آنتی باکتریایی می گردد.

واژه های کلیدی:

مهندسی بافت پوست، کیتوسان، کتیرا، اشرشیاکلی، استافیلوکوک اورئوس.

۱- مقدمه

پیوندهای پوستی با مشکلات و محدودیت هایی مانند کمبود عضو، انتقال آلودگی، ایمنی زایی، پس زدگی بافت جایگزین شده توسط بدن دریافت کننده، به خوبی نمی تواند پاسخگوی نواقص پوستی ناشی از بیماری، سوختگی، تصادف و زخم های ناخوشایند باشد [۳-۴]. مهندسی بافت، با استفاده از اصول

پوست به عنوان یکی از وسیع ترین بافت های نرم می باشد و به طور متوسط ۱۵٪ از وزن کلی بدن انسان را تشکیل می دهد. پوست نقش محافظ در برابر عوامل خارجی از جمله میکروب ها به داخل بدن را دارد و در حفظ رطوبت و تنظیم دمای بدن و اجزای سیستم ایمنی بدن نقش اصلی را ایفا می کند [۱-۲].

زیست سازگاری، آب‌دوستی، سمی نبودن، فعالیت آنتی‌باکتریال اشاره کرد که این پلیمر را برای کاربردهای مختلف به ویژه حوزه زیست پزشکی مناسب ساخته است [۲۱-۲۲]. کتیرا (GT)^۴ از نوعی گون به دست می‌آید. این پلیمر ترکیبی پیچیده از پلی ساکاریدهای محلول و نامحلول در آب به همراه پروتئین، نشاسته و مواد سلولزی است [۲۳-۲۵] صمغ کتیرا از دو پلی ساکارید به نام باسورین^۵ و کتیراین^۶ و مواد معدنی قلیایی با نسبت کمی از پروتئین و مواد سلولزی تشکیل شده است [۲۶]. کتیرا پلیمری طبیعی و فراوان در طبیعت، زیست‌تخریب‌پذیر، زیست‌سازگار در دسترس و آنتی‌باکتریال است و این خواص منجر شده است که از کتیرا در کنار سایر پلیمرها جهت ساخت داربست در بهبود زخم و درمان زخم‌های سوختگی و در صنایع غذایی استفاده شود [۲۷-۲۸]. یکی از مهم‌ترین چالش‌ها در فرایند ترمیم زخم احتمال ایجاد عفونت‌های باکتریایی است به همین دلیل خواص آنتی‌باکتریالی در طراحی داربست مورد اهمیت می‌باشد. همچنین جذب ترشحات زخم منجر به رشد عفونت می‌شود که جهت جلوگیری از عفونت‌های باکتریایی باید خواص آنتی‌باکتریال مورد توجه قرارگیرد [۲۹]، که می‌توان با استفاده از پلیمرهای آنتی‌باکتریال (کتیرا و کیتوسان) به رفع مشکل پرداخت [۳۰-۳۱]. روش‌های مختلفی جهت تولید داربست‌های متخلخل جهت کاربردهای مهندسی بافت مورد بررسی قرار گرفته است که هر یک مزایا و معایبی دارند. روش خشکاندن انجمادی از روش‌های رایج بوده که پلیمرها در حلال خود حل شده و سپس محلول منجمد می‌گردد و با قرار دادن نمونه در دستگاه، حلال تصعید شده و فوم‌های متخلخل به وجود می‌آید. مزیت‌های روش خشکاندن انجمادی نسبت به دیگر روش‌ها شامل توانایی کنترل اندازه حفرات، اکسید نشدن مواد، کاهش چسبندگی و توده‌ای شدن مواد و افزایش مدت ماندگاری می‌باشد. خشک کردن مواد حساس به حرارت، موادی که دارای نقطه انجماد پایین و دارای حلال‌های آلی می‌باشند توسط این روش کاربردی می‌باشد. پس از ساخت داربست به روش خشکاندن انجمادی به دلیل ضعف خواص مکانیکی،

مهندسی و علوم زیستی در کنار هم جهت ترمیم نواقص به کار گرفته می‌شود. در مهندسی بافت مهم‌ترین اجزای مورد استفاده داربست، سلول و عوامل رشد می‌باشند [۵]. در هنگام نقص و تخریب بافت، قسمت‌های زیادی از سلول‌های آن بافت و ماتریس خارج سلولی^۱ از بین می‌رود. از آنجایی که سلول‌های بافت عملکردشان وابسته به ماتریس خارج سلولی می‌باشد، برای ماتریس خارج سلولی جایگزینی طراحی می‌شود که در مهندسی بافت به آن داربست می‌گویند. داربست‌ها به طور معمول ساختاری متخلخل شبیه به ماتریس خارج سلولی دارند [۶-۷]. استفاده از داربست‌ها هدف اصلی در بازسازی مجدد بافت‌های بدن می‌باشد [۸-۹]. ایده‌آل‌ترین داربست جهت کاربرد در مهندسی بافت پوست با ساختار اسفنجی پر منفذ با خواص زیست‌تخریب‌پذیر و زیست سازگاری می‌باشد که از این طریق مواد مغذی به سلول‌های موجود در داربست به راحتی قابل دسترسی باشد [۱۰]. پلیمرهای زیست‌سازگار به دلیل خواص زیستی مناسب جهت جایگزین‌های پوستی کاربرد وسیعی دارد [۱۱-۱۲]. پلیمرها به دودسته پلیمرهای طبیعی (زیستی) و پلیمرهای سنتزی (مصنوعی) تقسیم‌بندی می‌شوند [۱۳]. کیتوسان (Cs)^۲ پلیمری خطی با ساختاری ساکاریدی می‌باشد و از هیدرولیز پلیمر طبیعی کیتین در پوست خرچنگ و در دیواره قارچ‌ها یافت می‌شود [۱۴]. این پلیمر به دلیل ویژگی‌های زیست‌سازگاری با سلول‌ها و بافت‌ها انتخاب مناسبی جهت کاربرد در مهندسی بافت می‌باشد [۱۵]. خواص قابل توجه کیتوسان جهت کاربرد در ترمیم زخم، خاصیت آنتی‌باکتریال کیتوسان می‌باشد که دلیل آن نیرویی بین بار مثبت کیتوسان و بار منفی غشای سلول میکرووب و باکتری می‌باشد که منجر به نابودی و مرگ باکتری می‌گردد [۱۶]. خواص مکانیکی کیتوسان را می‌توان از طریق ترکیب آن با پلیمرهای مصنوعی و نانوذرات سرامیکی بهبود بخشید [۱۷-۱۸]. پلیمر مصنوعی پلی‌وینیل‌پیرولیدون (PVP)^۳ به‌طور گسترده در صنایع داروسازی استفاده می‌شود و در آب و الکل انحلال‌پذیر و پلیمر دوست دار محیط‌زیست است [۱۹-۲۰]. از مزایای این ماده می‌توان به

۱-۲- ساخت محلول جهت ساخت داربست به روش خشکاندن انجمادی

محلول ۲/۵٪ وزنی کیتوسان با حل کردن پودر کیتوسان در آب و اسید استیک ۱ درصد بر روی همزن مغناطیسی (Ik C-MAG HS7) تهیه گردید. سپس محلول ۵٪ وزنی پلی وینیل پیرولیدون، با حل کردن پودر پلی وینیل الکل در آب مقطر با دمای 80°C تهیه گردید. همچنین محلول ۲/۵٪ کتیرا با حل کردن پودر کتیرا در آب مقطر با دمای 70°C بر روی همزن مغناطیسی به مدت ۲ ساعت آماده گردید. برای ساخت محلول دوجزئی، محلول کیتوسان و محلول پلی وینیل پیرولیدون ساخته شده با نسبت ۲:۱ با هم ترکیب کرده و بر روی همزن قرار داده شد. همچنین جهت ساخت محلول سه جزئی محلول کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون و محلول کتیرا با نسبت‌های مختلف (۲۵:۷۵، ۵۰:۵۰ و ۷۵:۲۵) در بشر ریخته شد و بر روی همزن قرار گرفت. به منظور ایجاد اتصالات عرضی هر یک از محلول‌های ساخته شده تک جزئی، دوجزئی و سه جزئی با نسبت مختلف، محلول گلو تار آلدهید ۲/۵٪ به صورت قطره‌ای به محلول‌ها اضافه گردید و مدت نیم ساعت هم زده شد.

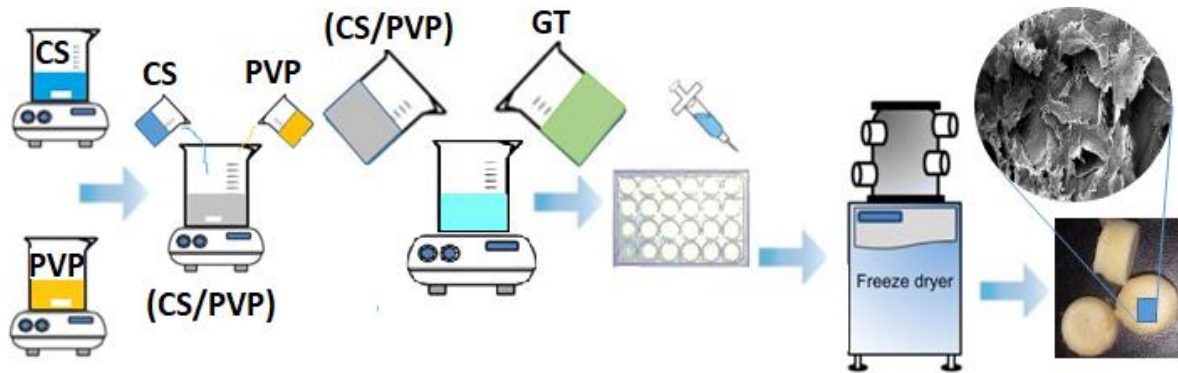
۲-۲- ساخت داربست به روش خشکاندن انجمادی

پس از اتمام محلول سازی، هر یک از محلول‌ها توسط سرنگ درون چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه ریخته شدند. روی پلیت‌ها به منظور جلوگیری از آلودگی و تبخیر سریع توسط فویل آلومینیومی پوشانیده شد و بر روی هر چاهک حدود ۱۰ سوراخ ایجاد شد. پلیت‌های آماده شده به منظور انجماد کامل در فریزر (فریزر پارس) 20°C به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت به فریزر (Ultra low temperature) در دمای 80°C منتقل شدند. جهت خارج کردن آب درون نمونه‌ها به وسیله خلأ، نمونه‌های منجمد شده به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه خشک کن انجمادی (cool safe scan Vac) قرار داده شدند. شماتیک مراحل آماده سازی و ساخت داربست در شکل (۱) مشاهده می‌گردد.

می‌توان از ترکیبات شیمیایی مانند گلو تار آلدهید^۷ و با ایجاد اتصالات عرضی، مقاومت مکانیکی داربست را تقویت نمود [۳۲-۳۳]. در تحقیقی داربست کامپوزیت کیتوسان/ ژلاتین/ نانوهیدروکسی آپاتیت ساخته شد و نتایج نشان داد ساخت داربست به روش خشکاندن انجمادی، داربست‌های متخلخل با درصد تخلخل بالا را ایجاد می‌نماید [۳۴]. در یک پژوهش پوشش چندلایه پوستی متشکل از سیلیکون، به عنوان لایه خارجی و از ژلاتین و کیتوسان به عنوان لایه داخلی، طراحی و ساخته شد. نتایج نشان داد جایگزین طراحی شده به دلیل زیست سازگاری بالا و خواص آنتی باکتریال جهت کاربرد ترمیم زخم و سوختگی بسیار مناسب می‌باشد [۳۵]. در مطالعه ای دیگر در سال ۲۰۱۶ داربستی به روش خشک کردن انجمادی از کیتوسان/ پلی وینیل الکل و مقادیر مختلف از متیل سلولز (۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵٪) تهیه گردید. اندازه گیری تخلخل نمونه‌های مختلف نشان می‌دهد که تخلخل داربست کیتوسان/ پلی وینیل الکل بدون متیل سلولز حدود ۸۱٪ و بعد از افزودن مقادیر مختلف متیل سلولز تخلخل به ۸۸٪ افزایش یافته است. داربست‌های ساخته شده در برابر باکتری استافیلوکوک اورئورس^۸ و باکتری اشیریشیا کلی^۹ فعالیت آنتی باکتریال خوبی از خود نشان دادند [۳۶]. در این تحقیق داربست کامپوزیتی حاوی کیتوسان، پلی وینیل پیرولیدون حاوی سه درصد مختلف کتیرا توسط روش خشکاندن انجمادی ساخته شد و سپس خواص ساختاری و آنتی باکتریال داربست‌های ساخته شده مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش انجام تحقیق

در این تحقیق کیتوسان و پلی وینیل پیرولیدون از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد. همچنین صمغ گیاه گون (کتیرا) خریداری شد و آسیاب گردید. از آب مقطر به عنوان حلال کتیرا و پلی وینیل پیرولیدون و از اسید استیک ۱ درصد به عنوان حلال کیتوسان استفاده شد. گلو تار آلدهید به عنوان عامل اتصال دهنده عرضی برای ساخت داربست‌ها استفاده شد.



شکل (۱): شماتیک مراحل آماده‌سازی و ساخت داربست به روش خشکاندن انجماد

درصد تخلخل یکی از پارامترهای مهم در مهندسی بافت می‌باشد. درصد تخلخل داربست‌های تولید شده با روش جابه‌جایی مایع محاسبه گردید. داربست‌ها در داخل یک استوانه مدرج حاوی اتانول ۹۶٪ با حجم V_1 به حالت غوطه‌ور نگه‌داشته شد. حجم داربست و حجم اتانول به‌عنوان V_2 (حجم کل) گزارش شد. با خارج نمودن داربست از استوانه مدرج، حجم اتانول باقیمانده در استوانه مدرج، V_3 گزارش شد. مقدار متوسط درصد تخلخل داربست (ε) طبق معادله (۱) محاسبه گردید [۳۷].

$$\varepsilon = (v_1 - v_3) / v_2 - v_3 \times 100 \quad (1)$$

۲-۶- بررسی تخریب‌پذیری داربست‌های ساخته‌شده

جهت بررسی زیست‌تخریب‌پذیری نمونه‌ها، ابتدا داربست‌ها توسط ترازوی دیجیتال (mettler toledo-Ag204) با دقت ۴ رقم اعشار اندازه‌گیری شد. سپس، نمونه‌ها درون انکوباتور (MEMMERT-INB400) با دمای 37°C درون محلول بافر فسفات (PBS) قرار داده شد. نمونه‌ها پس از گذشت ۱۴ روز از ظرف بیرون آورده شد و pH در ظروف اندازه‌گیری شدند. نمونه‌ها توسط آب دو بار تقطیر شسته شد و پس از خشک شدن داربست‌ها درون آون خلأ، وزن شدند. سپس نرخ تخریب نمونه‌ها (WL) طبق معادله (۲) محاسبه گردید [۳۸].

$$WL(\%) = \frac{(w_0 - w_t)}{w_0} \times 100 \quad (2)$$

۲-۳- بررسی اندازه قطر الیاف و مورفولوژی سطح نانوداربست‌ها

جهت بررسی ساختار و تخلخل‌های داربست‌های ساخته‌شده به روش خشکاندن انجمادی، نمونه‌ها توسط دستگاه لایه نشانی طلا ۳ دقیقه پوشش داده شدند و توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) Philips (x130ESEM) سطح داخلی داربست‌ها تصویربرداری شد. با استفاده از نرم‌افزار Image J و اندازه‌گیری قطر حداقل ۵۰ تخلخل توزیع اندازه تخلخل‌ها و میانگین قطر تخلخل‌های ایجاد شده به منظور بررسی مناسب بودن اندازه تخلخل‌ها برای کاربرد در مهندسی بافت اندازه‌گیری شد.

۲-۴- طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

جهت بررسی پیوندهای تشکیل‌شده، شناسایی گروه‌های عاملی و ساختار مولکولی نمونه‌ها با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا نمونه‌ها با پتاسیم برمید (KBr) خالص مخلوط و به‌صورت قرص نازک شکل‌دهی شدند. سپس توسط دستگاه FTIR (BRUKER-TENSOR27-۶۳۰۰) پیک جذب پرتو IR در طول‌موج‌های در محدوده $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ مشاهده و نوع پیوندها با بررسی طول‌موج قله‌ها مشخص گردید.

۲-۵- بررسی درصد تخلخل داربست‌های ساخته‌شده به روش خشکاندن انجمادی

دست آمد. ۴ ml از محیط مایع تهیه شده درون لوله آزمایش ریخته شد و چهار عدد لوله آزمایش حاوی محیط کشت تهیه گردید. لوله‌های در بسته به درون اتوکلاو با دمای °C ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. دو لوله به عنوان شاهد و دو لوله دیگر به منظور کشت شبانه باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوک ارئوس استفاده شد. زیر هود لمینار (۲۸۰۰) دور آلمانی - تجهیز کلاس II) استریل شده با اشعه UV، یک پتری دیش کشت جامد حاوی کلنی‌های باکتری استافیلوکوک ارئوس و پتری دیش دیگر حاوی کشت جامد کلنی‌های باکتری اشرشیاکلی به همراه دو لوله آزمایش محتوی محیط کشت مولر هینتون براث جهت کشت شبانه با چراغ‌الکلی و لوپ، قرار داده شد. در مجاورت شعله، لوله‌های حاوی محیط کشت استریل و اسلنت حاوی باکتری اشرشیاکلی و لوپ قرار داده شد. به وسیله دست راست لوپ نگه‌داشته شد. سپس بر روی شعله قرار داده شد تا تمام طول سیم لوپ سرخ گردد. پتری دیش حاوی باکتری اشرشیاکلی و لوله‌های محیط کشت استریل در دست چپ قرار داده شد به گونه‌ای که قابلیت باز و بسته کردن در آن توسط انگشت شست یا سبابه وجود داشته باشد. با استفاده از انگشتان دست راست در پنبه‌ای لوله‌ها را برداشته و جهت استریل کردن دهانه لوله‌ها از میان شعله عبور داده شد. بعد از آن لوپ را وارد پتری دیش حاوی باکتری اشرشیاکلی گردید و مقداری از آن به لوله محیط کشت استریل شده منتقل گردید. پس از تکان دادن لوپ درون لوله دوباره دهانه هر دو لوله از روی شعله رد شد و با استفاده از پنبه درب آن‌ها مسدود گردید. به دلیل رشد در رطوبت کم محیط کشت جامد، باکتری‌های موجود در یک کلنی ماده چسبناکی (موکوسی) را در اطراف خود تولید می‌کنند که باعث چسبیدن آن‌ها به یکدیگر می‌گردد. به منظور یکنواخت شدن محیط کشت مایع، لوله آزمایش حاوی محیط کشت مایع به شدت هم زده شد که در نهایت محیط کشت شبانه باکتری اشرشیاکلی آماده گردید. ساخت محیط کشت شبانه باکتری استافیلوکوک ارئوس دارای مراحل مشابهی است با این تفاوت که کلنی باکتری استافیلوکوک ارئوس درون لوله دوم

که در آن W_0 وزن اولیه و W_t وزن نمونه پس از بازه‌های زمانی مشخص می‌باشد.

۲-۲- اندازه‌گیری استحکام فشاری داربست‌ها

خواص مکانیکی فشاری داربست‌های تهیه شده با استفاده از دستگاه آزمون استحکام فشاری (KS25H)، طبق استاندارد D31411/DS410M، با لود سل ۱۰ نیوتن و با سرعت ۰/۵ میلی‌متر بر دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت. تنش اعمالی ایجاد شده در استحکام فشاری به صورت ترک نمایان شده بر روی سطح ظاهر می‌شود. داربست‌های ساخته شده به شکل استوانه دارای قطر ۱۰ mm و ارتفاع ۱۰ mm به روش خشکاندن انجمادی تهیه شدند [۳۹]. آزمون استحکام فشاری با استفاده از ۳ نمونه از هریک از انواع داربست‌ها انجام شد و نتایج به صورت میانگین همراه با انحراف معیار ارائه شد.

۲-۸- استریل کردن داربست‌ها

برای بررسی خاصیت آنتی‌باکتریال ابتدا داربست‌ها استریل شدند. برای این منظور داربست‌ها درون پتری دیش‌های استریل شده قرار داده شدند و به مدت ۱۵ دقیقه هر یک از سطوح داربست‌ها زیر هود لمینار به مدت ۲۰ دقیقه توسط اشعه UV استریل شدند و به محیط کشت مولر آگار منتقل شدند.

۲-۹- بررسی خواص آنتی‌باکتریال داربست‌های ساخته شده

۲-۹-۱- ساخت محیط کشت مولر هینتون آگار

برای تهیه محیط کشت مولر هینتون آگار، درون ارلن ۵۰۰ ml آب مقطر، ۱۸ g پودر مولر هینتون آگار اضافه شد و توسط حرارت محیطی شفاف حاصل شد. سپس درب ارلن با گاز استریل و پنبه مسدود شد و به مدت ۱۵ دقیقه درون اتوکلاو با دمای °C ۱۲۱ قرار گرفت. پس از کاهش دمای محیط کشت، به درون ۱۰ پتری دیش‌های استریل ریخته شد. برای ساخت محیط کشت شبانه ۲/۶۲۵ g پودر مولر هینتون در ۱۲۵ ml آب مقطر درون ارلن ریخته شد و توسط حرارت دهی، محلول شفاف به

مک فارلند (۰/۱۳-۰/۰۷) برسد. با سوآپ استریل محلول هموزن باکتری را هم زده و بعد از آبکشی کردن سوآپ به محیط کشت مولر هیتون آگار انتقال داده شد. درون ۴ پتری دیش کشت مولر هیتون آگار باکتری‌های اشرشیاکلی و باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس درون ۴ پتری دیش کشت مولر هیتون آگار دیگر، به روش کشت چمنی کشت داده شدند. جهت مشاهده لام رنگ آمیزی شده باکتری برای تأیید باکتری، از میکروسکوپ نوری (Olympus) استفاده شده است.

۳- نتایج و بحث

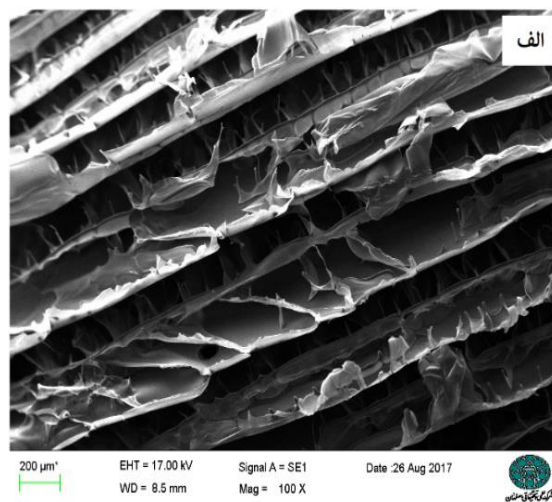
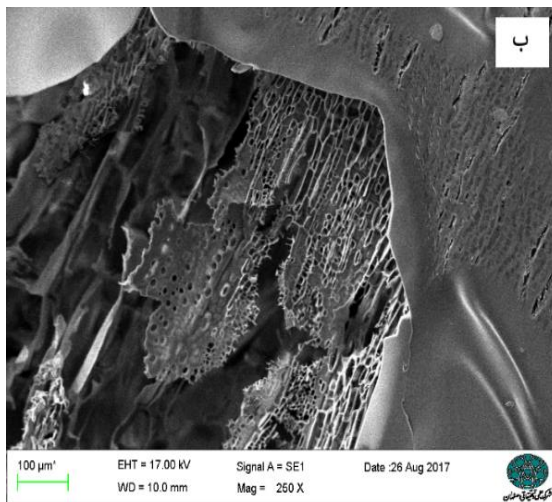
۳-۱- بررسی مورفولوژی و اندازه تخلخل

داربست‌های ساخته شده به روش خشکاندن انجمادی توسط دستگاه لایه نشانی طلا پوشش داده شد و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی تصویربرداری شد. همان‌طور که در شکل (۲) مشاهده می‌گردد، انجماد در داربست تک جزئی کیتوسان به صورت شیار مانند صورت گرفته شده است و ساختار لوله‌ای شکل ایجاد شده است.

حاوی محیط کشت مولر هیتون براث کشت داده شد. در آخرین مرحله دولوله شامل باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوک ارئوس کشت داده شده در محیط کشت مولر هیتون براث به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور در دمای 37°C قرار گرفته شد.

۲-۹-۲- ساخت محیط نیمه مک فارلند

قبل از کشت باکتری محیط نیمه مک فارلند بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار استفاده می‌شود و با کمک از آن می‌توان میزان باکتری‌ها را با دستگاه اسپکتروفوترمتر (POPOptizen) مشخص کرد. کدر بودن محیط نیمه مک فارلند یک مسئله مهم است. اگر کدورت محیط کشت شبانه باکتری‌ها کمتر از نیم مک فارلند بود، باید محیط را سانتریفیوژ کرد و سپس برای دست‌یابی به غلظت موردنظر از محلول رویی برداشته و باکتری‌های ته‌نشین شده را در مقدار کمتری از محیط کشت ریخت. اگر میزان کدورت محیط از نیمه مک فارلند بیشتر بود، مقدار کمی محیط کشت مولر هیتون اضافه می‌شود تا به محدود



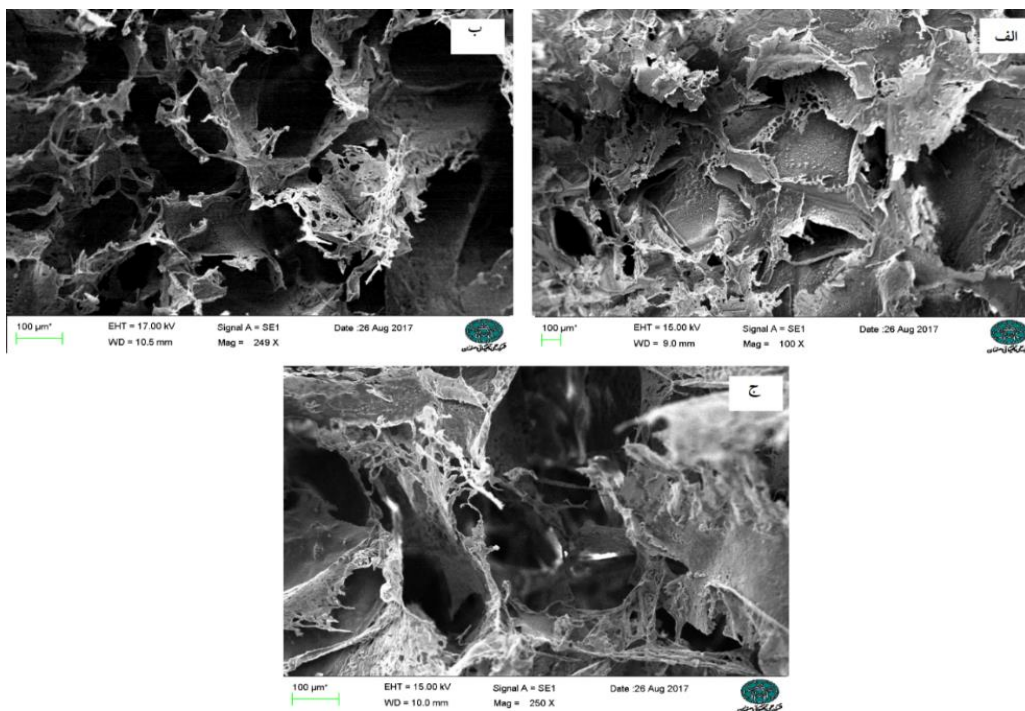
شکل (۲): تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی داربست الف) کیتوسان و ب) کیتوسان/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون

مورفولوژی حفرات تقریباً کروی شکل می‌شود و از حالت کشیده تغییر می‌کند. در داربست‌های (کیتوسان/پلی‌پیرولیدون) کتیرا با افزودن در نسبت‌های مختلف با افزودن

در شکل (۳) مشاهده می‌شود که مورفولوژی لوله‌ای شکل تا حدودی از بین رفته است و باعث تغییراتی در مورفولوژی داربست شده است. با افزودن پلی‌وینیل‌پیرولیدون به داربست

ایجاد ساختار متخلخل مطلوب در داربست های سه جزئی کتیرا با کیتوسان و پلی وینیل پیرولیدون می باشد.

درصدهای مختلف کتیرا، داربست های کامپوزیتی دارای ساختار منظم با منافذ متعدد تغییر شکل پیدا خواهند کرد که نشان دهنده



شکل (۳): تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی داربست کیتوسان / پلی وینیل پیرولیدون حاوی کتیرا (الف) ۲۵:۷۵ (ب) ۵۰:۵۰ و (ج) ۷۵:۲۵

جدول (۱): میانگین اندازه تخلخل و توزیع تخلخل ها در داربست ها

درصد تخلخل (%)	اندازه میانگین (میکرومتر)	داربست
۶۶	۳۳۴±۱۶۲	کیتوسان
۷۵	۲۴۱±۱۴۳	کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون
۶۲	۲۰۵±۱۱۱	(کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون) کتیرا (۲۵:۷۵)
۷۷	۱۹۱±۹۷	(کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون) کتیرا (۵۰:۵۰)
۸۲	۱۷۵±۸۸	(کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون) کتیرا (۷۵:۲۵)

در تمامی تصاویر SEM تهیه شده از داربست ها توزیع یکنواخت حفره ها و ارتباط بین حفره ها مشاهده می شود. توزیع اندازه حفرات و میانگین سایز تخلخل از تصاویر SEM توسط نرم افزار Image z، اندازه گیری شد. میانگین اندازه تخلخل داربست ها و توزیع آن ها در جدول (۱) نشان داده شده است. با اضافه نمودن پلی وینیل پیرولیدون به کیتوسان، پلی وینیل پیرولیدون در بین زنجیره های کیتوسان قرار گرفته است و باعث دفع بارهای هم نام شده است و زنجیره های کیتوسان از هم گسیخته می شود [۴۰]. این امر باعث ایجاد منافذ به هم مرتبط، منظم و مطلوب می شود. همچنین با افزودن کتیرا، میزان کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون در محلول کاهش یافته و نیروی دافعه بین گروه های کربوکسیل کتیرا افزایش یافته است و اندازه تخلخل ها کاهش می یابد.

برهمکنش الکترواستاتیکی بین گروه های کربوکسیل و امین کتیرا می تواند دلیل کاهش اندازه تخلخل باشد. در مطالعه ای

کیتوسان/پلی‌وینیل‌پیرولیدون و داربست سه جزئی (کیتوسان/پلی‌وینیل‌پیرولیدون) با نسبت های مختلف کتیرا (۲۵:۷۵)، (۵۰:۵۰) و (۷۵:۲۵) مشاهده می‌شود. در طیف مربوط به پودر کیتوسان، سه پیک مشخصه آن در $1747/19 \text{ cm}^{-1}$ ، $1669/09 \text{ cm}^{-1}$ و $1425/14 \text{ cm}^{-1}$ (مربوط به ارتعاش خمشی C-H) و $1287/25 \text{ cm}^{-1}$ (مربوط به کشش C-N) مشهود است. در طیف داربست دوجزئی کیتوسان /پلی‌وینیل‌پیرولیدون، پیوندهای بین‌مولکولی کیتوسان و پلی‌وینیل‌پیرولیدون با کمی تغییر و جابه‌جایی دیده می‌شوند و پیک‌های مربوط به هیدروکسیل در $3428/81 \text{ cm}^{-1}$ ، امید یک در $1747/19 \text{ cm}^{-1}$ ، کشش C=O در $1631/48 \text{ cm}^{-1}$ ، خمش C-H در $1444/42 \text{ cm}^{-1}$ و کشش C-N در $1244/83 \text{ cm}^{-1}$ مشاهده می‌شود. نوار جذبی $1747/19$ در طیف داربست دوجزئی به علت تعامل و پیوند هیدروژنی توسط OH و NH از کیتوسان و پلی‌وینیل‌پیرولیدون به سمت موج پایین‌تر حرکت کرده است [۲۷، ۴۱-۴۲]. در طیف مربوط به کتیرا، باند جذبی $1087/66 \text{ cm}^{-1}$ نشان‌دهنده گروه آمین در ساختار می‌باشد [۲۶]. به علت ارتعاش کششی گروه آروماتیک C-N از پروتئین، یک پیک در $1325/82 \text{ cm}^{-1}$ دیده می‌شود. نوار جذبی در $1655/59 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش پیوند N-H در امید دو متصل به پروتئین حاضر در کتیراست. پیک در $3450/99 \text{ cm}^{-1}$ نیز ارتعاش کششی OH است که نشان‌دهنده حضور گروه هیدروکسیل است. در طیف داربست سه‌جزئی با نسبت‌های مختلف کتیرا، تغییراتی در پیک‌های ظاهر شده از جمله شدت پیک، جابه‌جایی اندک، تغییر شکل و حتی حذف پیک مشاهده می‌گردد که دلیل این تغییرات مربوط به تشکیل پیوندهای مولکولی جدید میان این سه پلیمر می‌باشد. طیف FTIR داربست‌های سه‌جزئی با نسبت مختلف کتیرا، تقریباً شبیه می‌باشد درحالی‌که شدت پیک‌ها متفاوت می‌باشد. به عنوان

مشابه در بررسی تصاویر میکروسکوپی روبشی داربست ساخته‌شده از (کیتوسان / پلی‌وینیل‌الکل) / متیل سلولز با نسبت‌های مختلف (۲۵، ۵۰ و ۷۵٪) به روش خشک کردن انجمادی، ثابت شد داربست‌ها دارای منافذ بسیاری هستند و با تغییر نسبت متیل سلولز در ساختار داربست اندازه منافذ داربست را می‌توان تغییر داد به نحوی که با افزایش نسبت متیل سلولز در ساختار داربست می‌توان به داربست با منافذ کوچک‌تر دست یافت. توزیع اندازه تخلخل سه نمونه داربست با سه درصد مختلف از متیل سلولز بین ۲۰۰ الی ۵۰۰ میکرومتر بود [۴۰].

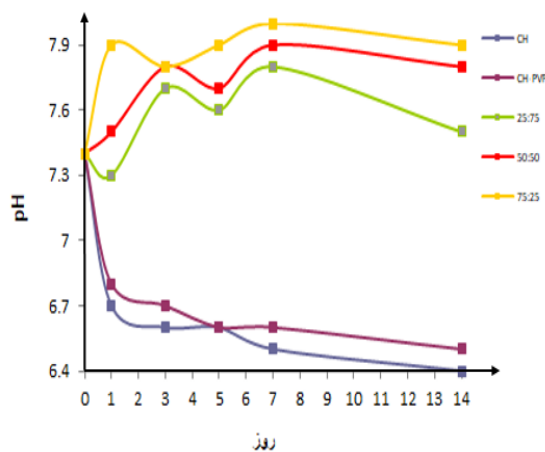
۳-۲- اندازه‌گیری درصد تخلخل

همان‌طور که در جدول (۱) مشاهده می‌شود میزان تخلخل ۵ نوع داربست ساخته‌شده بین ۶۶ تا ۸۲ درصد متغیر است. نتایج نشان می‌دهد، با افزودن پلی‌وینیل‌پیرولیدون به کیتوسان درصد تخلخل از ۶۶٪ به ۷۵٪ افزایش می‌یابند. با افزودن ۲۵٪ کتیرا به داربست شاهد کیتوسان/پلی‌وینیل‌پیرولیدون، درصد تخلخل داربست ابتدا کاهش یافته در صورتی که با افزودن ۵۰٪ و ۷۵٪ کتیرا تا حدود ۸۲٪ افزایش می‌یابد. افزایش درصد تخلخل‌های به هم پیوسته با میزان افزودن درصد کتیرا به دلیل خاصیت بالای هیدروفیلی پلی‌وینیل‌پیرولیدون و کتیرا است. هرچه میزان پلیمرهای پلی‌وینیل‌پیرولیدون و کتیرا در ساختار داربست بیشتر باشد، درصد تخلخل به علت آبدوست بودن این دو پلیمر افزایش می‌یابد. در مطالعه مشابهی داربست‌های به روش خشک کردن انجمادی از کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل و مقادیر مختلف از متیل سلولز مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری تخلخل نمونه‌های مختلف نشان می‌دهد که تخلخل داربست کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل حدود ۸۱٪ و بعد از افزودن مقادیر مختلف متیل سلولز تخلخل به ۸۸٪ افزایش یافته است [۴۰].

۳-۳- بررسی طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR)

در شکل (۴) نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز برای پودرهای کیتوسان، پلی‌وینیل‌پیرولیدون، کتیرا، داربست ترکیبی دوجزئی

تعداد گروه‌های هیدروفیل افزایش می‌یابد. داربست با بالاترین غلظت متیل سلولز (۰.۷۵٪) بالاترین تخریب را در محلول هانک از خود نشان داد و در مدت یک هفته تخریبی برابر با ۳۹٪ داشت [۴۰]. در پژوهش دیگری که مطالعه بر روی داربست‌های ترکیبی از دو پلیمر پلی لاکتیک اسید/کتیرا با مقادیر مختلف صورت گرفت ثابت شد با بالا بردن درصد کتیرا به دلیل افزایش ویژگی هیدروفیلی داربست، تخریب داربست افزایش می‌یابد. داربست‌هایی که خاصیت آب‌دوستی بالایی دارند آب به سرعت وارد شبکه پلیمری می‌شود و همین مسئله باعث تسریع تخریب داربست می‌شود [۴۳]. محققان نشان دادند تخریب نانو فیبرهای کتیرا/پلی‌وینیل‌الکل به نسبت نانو فیبرهای کتیرا/پلی‌وینیل‌الکل/پلی‌کاپرولاکتون به دلیل نفوذ راحت مولکول‌های آب به داربست بیشتر است و نانو فیبرهای کتیرا/پلی‌وینیل‌الکل/پلی‌کاپرولاکتون برای درمان زائده‌های پوستی که مدت طولانی برای بهبود نیاز دارند، انتخاب شدند [۲۶].

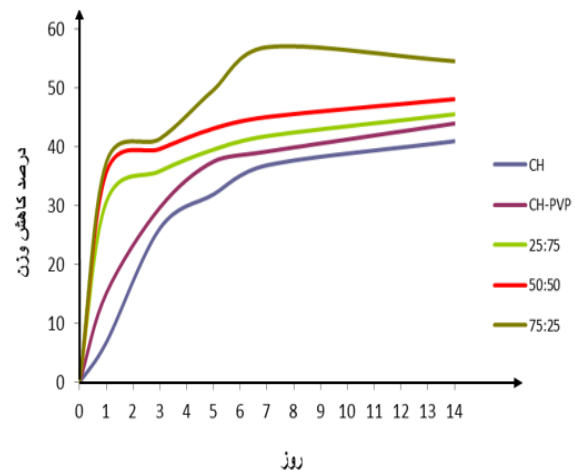


شکل (۶): نمودار تغییرات pH داربست‌ها در اثر تخریب تا روز ۱۴

۳-۵- نتایج آزمون مکانیکی

طراحی داربست با خواص مکانیکی مناسب به منظور پایداری داربست پس از کاشت، جلوگیری از تخریب زودرس و هماهنگی سرعت تجزیه داربست با سرعت تولید بافت جدید مورد اهمیت است. نتایج آزمون برای تمامی داربست‌ها در شکل

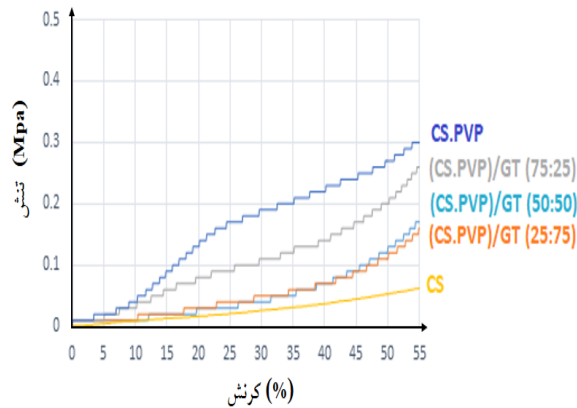
داربست کیتوسان خالص نسبت به دو پلیمر دیگر زیست‌تخریب‌پذیری کمتری دارد و نرخ تخریب‌پذیری کندتری نسبت به چهار داربست کامپوزیتی دیگر داشته است. بازه اصلی تغییرات در روزهای اوایل اتفاق افتاده و می‌توان گفت تقریباً بعد از روز ۷، کاهش وزن به یک حد ثابت رسیده است. برای بازسازی و رفع نواقص نرخ تخریب داربست در مهندسی بافت یک پارامتر بسیار مهمی می‌باشد.



شکل (۵): نمودار تغییرات وزن داربست‌ها در اثر تخریب تا روز ۱۴

در شکل (۶) تغییرات pH محلول PBS مشاهده می‌شود، در روز اول pH محیط کاهش یافته است و با گذشت زمان و تخریب داربست به علت گروه‌ها و یون‌های قلیایی حاصل از تخریب تغییرات pH روند صعودی خواهد داشت که محیط قلیایی نیز می‌تواند در روند افزایش تخریب تأثیرگذار باشد. کاهش PH و اسیدی شدن داربست تک جزئی کیتوسان به دلیل یونیزه شدن گروه‌های امین در محلول و محصولات ناشی از تخریب شدن کیتوسان می‌باشد. ولی با افزودن پلی‌وینیل‌پیرولیدون و همچنین کتیرا تغییرات PH افزایش یافته است. در سال ۲۰۱۶ داربست‌های ساخته شده از کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/متیل سلولز به روش خشک کردن انجمادی ثابت کردند با افزودن متیل سلولز به داربست کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل تخریب و تورم به دلیل افزایش

قابل توجه استحکام کششی نانو فیبر و نقطه شکست کاهش یافت [۴۵].



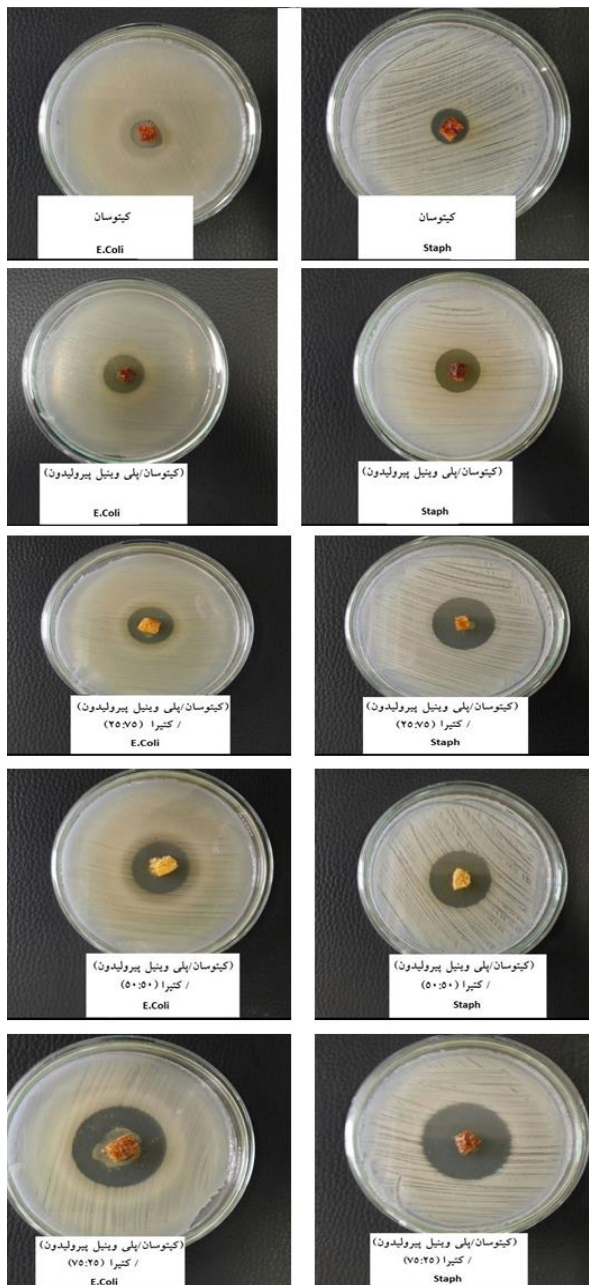
شکل (۷): نمودار تنش- کرنش داربست‌های ساخته شده

۳-۶- اثر آنتی باکتریال داربست‌های ساخته‌شده بر روی باکتری استافیلوکوک اورئوس و اشرشیاکلی

طی تحقیقات گذشته، کیتوسان با چسبیدن به دیواره سلول باکتری باعث تغییر نفوذپذیری غشا و بانفوذ به هسته باکتری باعث مهار سنتز RNA می‌شود که منجر به از بین رفتن باکتری می‌گردد [۴۶]. بار مثبت کیتوسان با DNA باکتری واکنش داده و از انتقال DNA و ترکیب پروتئین‌ها جلوگیری می‌کند پس در نتیجه گروه‌های آمین کیتوسان، رشد باکتری اشرشیاکلی را کاهش می‌دهد. گروه آمین کیتوسان با گروه‌های آنیونی سطح باکتری واکنش می‌دهد و نفوذپذیری سلول را تغییر می‌دهد [۴۷]. در شکل (۸) قطر هاله عدم رشد باکتری استافیلوکوک اورئوس و اشرشیاکلی در داربست‌های ساخته شده مشاهده می‌گردد. در داربست کیتوسان خالص، هاله عدم رشد در محیط کشت باکتری استافیلوکوک اورئوس ۱۷ میلی‌متر و در محیط کشت باکتری اشرشیاکلی ۱۵ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. قطر هاله عدم رشد در محیط کشت باکتری استافیلوکوک اورئوس برای داربست کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون ۲۴ میلی‌متر و در محیط کشت باکتری اشرشیاکلی ۲۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد و این افزایش قطر هاله عدم رشد به نسبت داربست کیتوسان خالص

(۷) مشاهده می‌گردد. نتایج نشان داد که تمامی نمونه‌ها به علت نرمی فاقد ناحیه شکست می‌باشد. در بین تمامی نمونه‌ها، داربست شاهد کیتوسان پایین‌ترین استحکام فشاری را داشت و با افزودن پلیمر پلی وینیل پیرولیدون به کیتوسان و تولید داربست-های کامپوزیتی (کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون)، استحکام فشاری افزایش می‌یابد. افزودن پلیمر پلی وینیل پیرولیدون به کیتوسان منجر به تقویت خواص مکانیکی کیتوسان شده که دلیل اصلی افزایش خواص مکانیکی را می‌توان به کاهش قابل توجه اندازه تخلخل‌ها نسبت داد [۴۰]. با افزودن کتیرا با نسبت‌های مختلف به داربست (کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون)، استحکام فشاری کاهش می‌یابد که با افزودن کتیرا، درصد تخلخل داربست سه‌جزئی افزایش می‌یابد و با افزایش درصد تخلخل استحکام فشاری کاهش می‌یابد. با افزودن کتیرا به داربست دوجزئی با نسبت (۲۵:۷۵) در مقایسه با دو نسبت دیگر (۵۰:۵۰) و (۷۵:۲۵)، درصد تخلخل کاهش می‌یابد که با کاهش درصد تخلخل، استحکام فشاری داربست افزایش می‌یابد و تنش آن حدود ۰/۲ مگا پاسکال می‌باشد که با داربست دوجزئی با تنش ۰/۲۷ مگا پاسکال تقریباً در حدود هم می‌باشد. با توجه به نمودار تنش‌های تمام داربست‌ها در کرنش ثابت ۵۵٪ ثبت شده است و مشاهده می‌گردد داربست دوجزئی (کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون) استحکام فشاری بیشتری را دارند و در داربست سه‌جزئی (کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون) با نسبت (۲۵:۷۵) تقریباً استحکام فشاری بالایی دارد. نتایج نشان می‌دهد که افزودن کتیرا منجر به کاهش استحکام فشاری شده است و همچنین با مقایسه تحقیقات مشابه این نتیجه‌گیری ثابت می‌گردد. تحقیقاتی که توسط محققین بر روی نانوالیاف کتیرا/ پلی کاپرولاکتون انجام گردیده نشان داد با افزودن کتیرا به پلی کاپرولاکتون سبب تضعیف خواص مکانیکی شده و این کاهش استحکام به دلیل خواص مکانیکی پایین پلیمر طبیعی کتیرا است [۴۴]. همچنین در مطالعه دیگری که بر روی نانوالیاف کتیرا و پلیمر PLGA به‌دست آمده است نشان داد که با افزودن کتیرا به نانو فیبرهای PLGA به‌طور

مانند استافیلوکوک ارئوس و سودوموناس آئروژینوزا ثابت کردند و نشان دادند با افزایش کتیرا در نانوالیاف فعالیت آنتی باکتریال افزایش می‌یابد [۲۷]. توسط محققان نانوالیاف پلی‌وینیل‌الکل/عسل/کتیوسان جهت ترمیم زخم ساخته شد و نتایج نشان داد با افزایش کتیوسان، خواص آنتی‌باکتریالی افزایش یافت [۴۹].



شکل (۸): تصویر عدم رشد باکتری بر روی داربست‌های ساخته شده

دلیل برافزایش فعالیت آنتی باکتریالی داربست است و نتایج نشان‌دهنده خاصیت آنتی باکتریال پلی‌وینیل‌پیرولیدون است. قطر هاله عدم رشد در محیط کشت استافیلوکوک اورئوس ایجاد شده در داربست (کتیوسان/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون) / کتیرا (۲۵:۷۵) حدود ۳۰ میلی‌متر و بر روی اشرشیاکلی ۲۴ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. با افزودن کتیرا با خاصیت آنتی باکتریال، فعالیت آنتی باکتریال بالاتری در مقایسه با داربست کتیوسان/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون از خود نشان داد. با توجه به مطالعات گذشته فعالیت آنتی باکتریالی کتیرا اثبات شده است [۴۸]. قطر هاله عدم رشد داربست (کتیوسان/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون) / کتیرا (۵۰:۵۰) در محیط کشت استافیلوکوک اورئوس ایجاد شده در حدود ۳۲ میلی‌متر و بر روی اشرشیاکلی ۲۶ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. همچنین نتایج نشان می‌دهد با افزایش نسبت کتیرا میزان قطر هاله افزایش می‌یابد. قطر هاله عدم رشد برای داربست (کتیوسان/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون) / کتیرا به نسبت ۷۵:۲۵ در محیط کشت استافیلوکوک اورئوس ایجاد شده در حدود ۳۹ میلی‌متر و بر روی اشرشیاکلی ۳۸ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. نتایج نشان می‌دهد با افزایش نسبت کتیرا به داربست کتیوسان/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون منجر به افزایش فعالیت آنتی باکتریال می‌شود. داربست (کتیوسان/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون) / کتیرا (۷۵:۲۵) در بین تمامی داربست‌های فوق با بالاترین قطر عدم هاله به‌عنوان بهترین داربست در بین داربست‌های فوق با خواص آنتی باکتریال مناسب انتخاب می‌باشد. داربست‌های کتیوسان/ پلی‌وینیل‌الکل/ متیل سلولوز ساخته شده در سال ۲۰۱۶ فعالیت آنتی باکتریال در برابر باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و اشرشیاکلی از خود نشان دادند. ثابت شد تمام داربست‌ها با مقادیر مختلف متیل سلولوز (۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵٪) فعالیت آنتی باکتریالی خوبی دارند و فعالیت به میزان باکتریواستاتیک برای *E. coli* و *S. aureus* به ترتیب بیش از ۸۰٪ و ۷۶٪ است و تفاوت معنی‌داری بین درصدهای مختلف وجود ندارد [۴۰]. همچنین در مطالعه نانوالیاف کامپوزیتی پلی‌وینیل‌الکل/ کتیرا با نسبت‌های مختلف، فعالیت آنتی باکتریالی خود را در برابر باکتری‌های گرم منفی

tissue engineering using 3D bioprinting: an evolving research field", *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, Vol. 71, pp. 615-23, 2018.

- [3] N. A. Ismail, K. A. Amin & M. H. Razali, "Novel gellan gum incorporated TiO₂ nanotubes film for skin tissue engineering", *Materials Letters*, Vol. 228, pp. 116-20, 2018.
- [4] Z. P. Rad, J. Mokhtari & M. Abbasi, "Fabrication and characterization of PCL/zein/gum arabic electrospun nanocomposite scaffold for skin tissue engineering", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 93, pp. 356-66, 2018.
- [5] A. L. Strong, M. W. Neumeister & B. Levi, "Stem cells and tissue engineering: regeneration of the skin and its contents", *Clinics in Plastic Surgery*, Vol. 44, pp. 635-50, 2017.

[۶] م. رفیعی نیا، ا. یزدانی چم زینی، ب. موحدی و ح. صالحی، " سنتز و ارزیابی سمیت سلولی نانوالیاف شیشه‌ی زیستی تهیه شده به روش الکترورسی جهت ساخت داربست مهندسی بافت"، فرآیندهای نوین در مهندسی مواد، دوره ۹، شماره ۳، صفحه ۱۴۵-۱۵۴، پاییز ۱۳۹۴.

- [7] W. Ji, Y. Sun, F. Yang, J. van den Beucken, M. Fan, Z. Chen & J. Jansen, "Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications", *Pharmaceutical Research*, Vol. 28, pp. 1259-72, 2011.
- [8] J. Tan, C. K. Chua, K. Leong, K. Chian, W. Leong & L. Tan, "Esophageal tissue engineering: An in-depth review on scaffold design", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 109, pp. 1-5, 2012.
- [9] Gharravi, M. Orazizadeh, M. Hashemitabar, K. Ansari-Asl, S. Banoni, A. Alifard & S. Izadi, "Status of tissue engineering and regenerative medicine in Iran and related advanced tools: Bioreactors and scaffolds", *Journal of Biomedical Science and Engineering*, Vol. 5, pp. 217, 2012.

[10] F. Mohebichamkhorami & A. Alizadeh, "Skin Substitutes; an Updated Review of Products from Year 1980 to 2017", *Journal of Applied Biotechnology Reports*, Vol. 4, pp. 615-23, 2017.

۴- نتیجه گیری

در این تحقیق، داربست کامپوزیتی (کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون)/کتیرا با نسبت‌های مختلف با روش خشک کردن انجمادی ساخته شد. نتایج بررسی میزان تخلخل نشان داد که درصد تخلخل با افزایش میزان پلیمرهای آبدوست پلی وینیل پیرولیدون و کتیرا در ساختار داربست افزایش می‌یابد. نتایج آزمون تخریب پذیری، تخریب کنترل شده داربست (کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون)/کتیرا را نشان داد و درصد کاهش وزن داربست‌های ساخته شده با افزایش میزان کتیرا و پلی وینیل پیرولیدون افزایش یافت. عمده تخریب داربست‌های ساخته شده در ۷ روز اول اتفاق افتاد و پس از آن سرعت کاهش وزن کاهش یافته و به یک حد ثابت رسیده است. فعالیت آنتی باکتریال سه پلیمر کیتوسان، پلی وینیل پیرولیدون و کتیرا در برابر برابر باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس ثابت شد. نتایج آزمون آنتی باکتریال افزایش قطر هاله عدم رشد در محیط کشت استافیلوکوک اورئوس و اشرشیاکلی را با افزودن کتیرا به داربست (کیتوسان/ پلی وینیل پیرولیدون) نشان داد. زخم پوش‌های ساخته شده در این مطالعه به دلیل ساختار متخلخل با تخلخل‌های به هم مرتبط، خواص مکانیکی مطلوب و خاصیت آنتی باکتریال و تخریب پذیری مناسب می‌تواند به عنوان کاندیدی برای کاربرد در زخم پوش‌ها و داربست‌های مهندسی بافت مطرح باشد.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه آزاد نجف آباد و دانشگاه صنعتی اصفهان تشکر و قدردانی می‌کنند.

۶- مراجع

- [1] M. Talikowska, X. Fu & G. Lisak, "Application of conducting polymers to wound care and skin tissue engineering: A review", *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 135, pp. 50-63, 2019.
- [2] S. P. Tarassoli, Z. M. Jessop, A. Al-Sabah, N. Gao, S. Whitaker, S. Doak & I. S. Whitaker, "Skin

- [20] N. Mahmoudi & A. Simchi, "On the biological performance of graphene oxide-modified chitosan/polyvinyl pyrrolidone nanocomposite membranes: In vitro and in vivo effects of graphene oxide", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 70, pp. 121-31, 2017.
- [21] R. Dastjerdi & M. Montazer, "A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on antimicrobial properties", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 79, pp. 5-18, 2010.
- [22] E. Tavakkol, H. Tavanai, A. Abdolmaleki & M. Morshed, "Production of conductive electrospun polypyrrole/poly (vinyl pyrrolidone) nanofibers", *Synthetic Metals*, Vol. 231, pp. 95-106, 2017.
- [23] S. Abbasi & S. Rahimi, "Influence of concentration, temperature, pH, and rotational speed on the flow behavior of Iranian gum tragacanth (katira) solution", *Iranian Journal of Food Science and Technology*, Vol. 2, pp. 28-42, 2005.
- [24] R. Khajavi, S. H. Pourgharbi, A. Kiumarsi & A. Rashidi, "Gum tragacanth fibers from *Astragalus gummifer* species: effects of influencing factors on mechanical properties of fibers", Vol. 7, pp. 2861-2865, 2007.
- [25] E. Zare, P. Makvandi & F. Tay, "Recent progress in the industrial and biomedical applications of tragacanth gum", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 212, pp. 450-467, 2019.
- [26] Z. Zarekhalili, S. Bahrami, M. Ranjbar-Mohammadi & P. B. Milan, "Fabrication and characterization of PVA/Gum tragacanth/PCL hybrid nanofibrous scaffolds for skin substitutes", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 94, pp. 679-90, 2017.
- [27] M. Ranjbar-Mohammadi, S. Bahrami & M. Joghataei, "Fabrication of novel nanofiber scaffolds from gum tragacanth/poly (vinyl alcohol) for wound dressing application: in vitro evaluation and antibacterial properties", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 33, pp. 4935-43, 2013.
- [28] J. Lett, M. Sundareswari, K. Ravichandran, B. Latha & S. Sagadevan, "Fabrication and
- [11] B. Bleasdale, S. Finnegan, K. Murray, S. Kelly & S. L. Percival, "The use of silicone adhesives for scar reduction", *Advances in Wound Care*, Vol. 4, pp. 422-30, 2015.
- [12] Chaudhari, K. Vig, D. Baganizi, R. Sahu, S. Dixit, V. Dennis, S. Singh & S. Pillai, "Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: a review", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 17, pp. 1974, 2016.
- [13] D. Liang, B. S. Hsiao & B. Chu, "Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 59, pp. 1392-412, 2007.
- [14] Kara, S. Tamburaci, F. Tihminlioglu & H. Havitcioglu, "Bioactive fish scale incorporated chitosan biocomposite scaffolds for bone tissue engineering", *International Journal Of Biological Macromolecules*, Vol. 130, pp. 266-79, 2019.
- [۱۵] ف. حیدری، ر. بازرگان لاری و م. بحر العلوم، "ساخت و بررسی خواص نانوکامپوزیت طبیعی و زیست سازگار کایتوسن/مگنتیت"، *فرآیندهای نوین در مهندسی مواد*، دوره ۱۰، شماره ۳، صفحه ۲۵۶-۲۴۷، پاییز، ۱۳۹۵.
- [16] V. Balan & L. Verestiuc, "Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review", *European Polymer Journal*, Vol. 53, pp. 171-88, 2014.
- [17] F. Ghorbani, B. Kaffashi, P. Shokrollahi, E. Seyedjafari & A. Ardeshtyrajimi, "PCL/chitosan/Zn-doped nHA electrospun nanocomposite scaffold promotes adipose derived stem cells adhesion and proliferation", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 118, pp. 133-42, 2015.
- [18] V. Reyna-Urrutia, V. Mata-Haro, J. Cauch-Rodriguez, W. Herrera-Kao & J. Cervantes-Uc, "Effect of two crosslinking methods on the physicochemical and biological properties of the collagen-chitosan scaffolds", *European Polymer Journal*, Vol. 117, pp. 424-433, 2019.
- [19] V. Bühler, "Polyvinylpyrrolidone excipients for pharmaceuticals: povidone, crospovidone and copovidone", *Springer Science & Business Media*, 2005.

- [36] K. Kanimozhi, S. Basha & V. Kumari, "Processing and characterization of chitosan/PVA and methylcellulose porous scaffolds for tissue engineering", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 61, pp. 484-91, 2016.
- [37] O. Gryshkov, N. Klyui, V. Temchenko, V. Kyselov, A. Chatterjee, A. Belyaev, L. Lauterboeck, D. Iarmolenko & B. Glasmacher, "Porous biomorphic silicon carbide ceramics coated with hydroxyapatite as prospective materials for bone implants", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 68, pp. 143-52, 2016.
- [38] F. Ghorbani, B. Kaffashi, P. Shokrollahi, E. Seyedjafari & A. Ardeshirylajimi, "PCL/chitosan/Zn-doped nHA electrospun nanocomposite scaffold promotes adipose derived stem cells adhesion and proliferation", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 118, pp. 133-42, 2015.
- [39] N. Johari, M. Fathi & M. Golozar, "Fabrication, characterization and evaluation of the mechanical properties of poly (ϵ -caprolactone)/nanofluorinated hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering", *Composites Part B: Engineering*, Vol. 43, pp. 1671-5, 2012.
- [40] K. Kanimozhi, S. Basha & V. Kumari, "Processing and characterization of chitosan/PVA and methylcellulose porous scaffolds for tissue engineering", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 61, pp. 484-91, 2016.
- [41] S. Talaei & A. Kiani, "Study on permeability of bionanocomposite film based on Tragacanth gum-Chitosan-Graphene oxide", *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, Vol. 5, pp. 25-31, 2015.
- [42] Q. Yao, W. Li, S. Yu, L. Ma & D. Jin, "Boccaccini AR, Liu Y. Multifunctional chitosan/polyvinyl pyrrolidone/45S5 Bioglass® scaffolds for MC3T3-E1 cell stimulation and drug release", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 56, pp. 473-80, 2015.
- [43] M. Ranjbar-Mohammadi, M. Prabhakaran, S. Bahrami & S. Ramakrishna, "Gum tragacanth/poly (l-lactic acid) nanofibrous scaffolds for application in regeneration of peripheral nerve damage", characterization of porous scaffolds for bone replacements using gum tragacanth", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 96, pp. 487-95, 2019.
- [29] K. Zheng, P. Balasubramanian, T. Paterson, R. Stein, S. MacNeil, S. Fiorilli, C. Vitale-Brovarene, J. Shepherd & A. Boccaccini, "Ag modified mesoporous bioactive glass nanoparticles for enhanced antibacterial activity in 3D infected skin model", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 103, pp. 109764, 2019.
- [30] Nada, A. E. L. Aref & S. Sharaf, "The synthesis and characterization of zinc-containing electrospun chitosan/gelatin derivatives with antibacterial properties", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 133, pp. 538-44, 2019.
- [31] M. Ranjbar-Mohammadi, S. Rabbani, S. Bahrami, M. Joghataei & F. Moayer, "Antibacterial performance and in vivo diabetic wound healing of curcumin loaded gum tragacanth/poly (ϵ -caprolactone) electrospun nanofibers", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 69, pp. 1183-91, 2016.
- [32] Grenha, "Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods", *Journal of Drug Targeting*, Vol. 20, pp. 291-300, 2012.
- [33] P. Sankar, G. Rajmohan & M. Rosemary, "Physico-chemical characterisation and biological evaluation of freeze dried chitosan sponge for wound care", *Materials Letters*, Vol. 208, pp. 130-2, 2017.
- [34] M. Peter, N. Ganesh, N. Selvamurugan, S. Nair, T. Furuike, H. Tamura & R. Jayakumar, "Preparation and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 80, pp. 687-94, 2010.
- [۳۵] ا. کدخدائیان حمید، ا. سلاطی و م. انصاری، "استفاده از مهندسی بافت پوست به منظور دستیابی به روشی نوین جهت ساخت یک جایگزین پوستی با استفاده از تثبیت کیتوسان و ژلاتین بر روی فیلم سیلیکونی"، *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان*، شماره ۶، صفحه ۸۸-۷۲، زمستان ۱۳۹۷.

- [11] Fourier transfer infrared
- [12] Potassium Bromide
- Carbohydrate Polymers, Vol. 140, pp. 104-12, 2016.
- [44] M. Ranjbar-Mohammadi & S. Bahrami, "Development of nanofibrous scaffolds containing gum tragacanth/poly (ϵ -caprolactone) for application as skin scaffolds", Materials Science and Engineering: Vol. 48, pp. 71-9, 2015.
- [45] M. Ranjbar-Mohammadi, M. Zamani, M. Prabhakaran, S. Bahrami & S. Ramakrishna, "Electrospinning of PLGA/gum tragacanth nanofibers containing tetracycline hydrochloride for periodontal regeneration", Materials Science and Engineering: C, Vol. 58, pp. 521-31, 2016.
- [46] R. Jayakumar, M. Prabakaran, S. Nair, S. Tokura, H. Tamura & N. Selvamurugan, "Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications", Progress in Materials Science, Vol. 55, pp. 675-709, 2010.
- [47] B. Bai, "Electrospun chitosan nanofibers for virus removal", 2012.
- [48] M. Ranjbar-Mohammadi, S. Rabbani, S. Bahrami, M. Joghataei & F. Moayer, "Antibacterial performance and in vivo diabetic wound healing of curcumin loaded gum tragacanth/poly (ϵ -caprolactone) electrospun nanofibers", Materials Science and Engineering: C, Vol. 69, pp. 1183-91, 2016.
- [49] W. Sarhan & H. Azzazy, "High concentration honey chitosan electrospun nanofibers: biocompatibility and antibacterial effects", Carbohydrate Polymers, Vol. 122, pp. 135-43, 2015.

۷- پی نوشت

- [1] Extra Cellular Matrix
- [2] Chitosan
- [3] Polyvinylpyrrolidone
- [4] Gum Tragacanth
- [5] Bassorin
- [6] Tragacanthin
- [7] Glutaraldehyde
- [8] Staphylococcus aureus
- [9] Escherichia coli
- [10] Scanning electron microscope

Fabrication and evaluation of (chitosan / poly-vinyl-pyrrolidone) scaffold properties containing gum tragacanth by freeze-drying method

Hamed Ghomi^{1,*}, Azadeh Sepyani², Marjan Mirhaj³

1- Assistant Professor, Advanced Materials Research Center, Department of Materials Engineering, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, Isfahan, Iran

2- MsC, Tissue Engineering, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, Isfahan, Iran

3- MsC, Medical Engineering, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran

*Corresponding Author: hamed.ghomi@ma.iut.ac.ir

Abstract

Chitosan as a component of the extracellular matrix is extensively investigated for preparation of porous scaffolds for tissue engineering. In this study, chitosan and (chitosan/polyvinylpyrrolidone) scaffolds as control and (chitosan/polyvinylpyrrolidone) / tragacanth composite scaffolds with 25:75, 50:50, and 75:25 ratios were fabricated by the freeze-drying method. The effect of tragacanth on the structural and antibacterial properties of the samples was evaluated. Surface morphology, mechanical properties, porosity and functional groups on the surface of the samples were evaluated by scanning electron microscopy (SEM), compressive strength test, and FTIR. The results showed the porosity of scaffolds with tragacanth increased in comparison to scaffolds without tragacanth. Biodegradable behavior of the scaffolds was examined by retaining the samples in phosphate buffer solution (PBS) for 14 days and the results showed an increase in the degradation of the (chitosan/polyvinylpyrrolidone) / tragacanth scaffold with the ratio of 75:25. The results showed decreased growth of E.coli and Staphylococcus aureus bacteria in the presence of three-component scaffold with tragacanth. Therefore, according to the results of this study, tragacanth containing scaffolds improve antibacterial properties.

Keywords: Skin Tissue Engineering, Chitosan, Gum Tragacanth, Escherichia Coli, Staphylococcus Aureus.

Journal homepage: ma.iaumajlesi.ac.ir

Please cite this article using:

Hamed Ghomi, Azadeh Sepyani, Marjan Mirhaj, Fabrication and evaluation of (chitosan / poly-vinyl-pyrrolidone) scaffold properties containing gum tragacanth by freeze-drying method, *New Process in Material Engineering*, 2020, 14(1), 27-43.