



Research Article

Formulation and Evaluation of Clove Extract-Loaded Chitosan Hydrogel on the Mouse Fibroblast Cell Line

Sevda Shemshad¹, Fereshteh Sharifi^{1,2*}

1- Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Soft Tissue Engineering Research Center, Tissue Engineering and Regenerative Medicine Institute, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author: Fer.sharifi.368@iau.ac.ir

Received: 24 September 2024

Accepted: 27 January 2025

DOI:

Abstract

Severe skin damage or defects can cause various problems in living animates, which could affect a patient's life. Developing wound dressings with acceptable antibacterial activity, besides biocompatibility and biodegradability, is essential in developing wound healing applications for decreasing or limiting synthetic antibiotic abuse. The present study aimed to design, prepare, and develop a functional hydrogel structure based on chitosan (CS) containing clove extract (CEO) with enhanced antibacterial activity, non-toxicity, and wound-healing potential. The hydrogel structure was studied using a scanning electron microscope (SEM) and Fourier transform infrared (FTIR). In addition, the cytotoxicity of the designed hydrogel was assayed by the MTT test. Based on the SEM, adding clove extract increased the pore size of the CS hydrogel. FTIR analysis confirmed the presence and mixture of clove extract with CS in the hydrogel structure. Our investigations displayed that the clove extract-loaded CS hydrogel did not have cytotoxic effects on the mouse fibroblast (L929) cells. In addition, the designed hydrogel showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. According to the results, CS/CEO hydrogel is a great potential candidate for antibiotic-free wound healing applications.

Keywords: Clove extract, Hydrogel, Chitosan, Wound dressing, Antibacterial.



مقاله پژوهشی

فرمولاسیون و ارزیابی عصاره میخک بارگذاری شده در هیدروژل کیتوسان بر روی رده سلولی فیبروبلاست موشی

سئودا شمشاد^۱، فرشته شریفی^{۱،*}

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات مهندسی بافت نرم، پژوهشکده مهندسی بافت و طب بازسازی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: Fer.sharifi.368@iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۳

DOI:

چکیده

آسیب‌ها یا نواقص شدید پوستی می‌تواند عامل بسیاری از مشکلات موجود زنده باشد، که می‌تواند زندگی فرد را تحت تاثیر قرار دهد. وجود فعالیت قابل قبول ضدباکتریایی همراه با زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر بودن نیاز اساس در توسعه کاربردی زخم‌پوش جهت کاهش یا محدود نمودن سوء مصرف آنتی‌بیوتیک سنتزی است. هدف از مطالعه حاضر طراحی، تهیه و توسعه ساختار هیدروژلی کارآمد بر پایه کیتوسان (CS) حاوی عصاره میخک (CEO) با فعالیت تشدید شده ضد باکتریایی، غیر سمی، و ظرفیت التیام زخم بوده است. ساختار هیدروژل با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و آنالیز طیف جذبی (FTIR) مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین، سمیت هیدروژل طراحی شده با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس تصاویر SEM افزوده شدن عصاره میخک موجب افزایش اندازه منافذ هیدروژل CS شده است. نتیجه آزمون FTIR تأیید کننده حضور و تلفیق عصاره میخک با CS در ساختار هیدروژل بود. تحقیقات ما نشان‌دهنده عدم اثر سمی عصاره میخک بارگذاری شده در هیدروژل CS بر روی سلول‌های فیبروبلاست موشی (L929) بود. بعلاوه، هیدروژل طراحی شده فعالیت ضد باکتریایی علیه *استافیلوکوکوس ارئوس* و *شریشیاکلی* بوده است. براساس نتایج بدست آمده، هیدروژل CS/CEO دارای ظرفیت بزرگ کاندید شدن برای کاربرد زخم‌پوش بدون آنتی‌بیوتیک است.

کلمات کلیدی: عصاره میخک، هیدروژل، کیتوسان، زخم‌پوش، ضدباکتریایی.

مقدمه

دیگر با توجه به محدودیت‌های عملکردی فرد بیمار هزینه‌های روانی، خانوادگی و اجتماعی بسیاری بر جامعه تحمیل می‌کند. از این رو، طراحی و تهیه زخم-پوش‌هایی که توانایی تسریع بهبود زخم را داشته باشند یکی از اولویت‌های درمانی کشور می‌باشد. روش‌های متنوعی برای درمان زخم مطرح بوده، که از این جمله می‌توان به پیوندهایی همانند آلوگرفت،

یکی از چالش‌های مهم حوزه درمان و پزشکی مدیریت صحیح و به موقع زخم‌های پوستی می‌باشد (۱). بر اساس آمارهای ارائه شده توسط دانشگاه علوم پزشکی تهران هزینه درمان زخم بطور متوسط بیش از ۲۰۰۰ دلار در مراحل اولیه درمان می‌باشد، که در صورت عدم رسیدگی به موقع و انجام درمان کارآمد این هزینه به بیش از ۱۵۰۰۰ دلار می‌رسد. از سوی

اتوگرفت و زئوگرفت، استفاده از پانسمان‌های زخم که موجود در شبکه داروخانه‌ای و پانسمان‌های مدرن تحت عنوان زخم‌پوش اشاره نمود (۲). زخم‌پوش‌ها یا جانشین‌های مهندسی زیستی شده پوست همانند هیدروژل، اسپانچ و پدهای الکتروریسی شده عموماً از پلیمرها تهیه می‌شوند (۳). زخم‌پوش‌ها باید ویژگی‌های منحصر به فردی از جمله حفظ رطوبت محل زخم و جلوگیری از خشک شدن محل زخم، محافظت از زخم در برابر عفونت، محافظت فیزیکی از زخم و تسریع روند بهبودی را ارائه دهند. برای تامین مشخصات مطرح شده برای زخم‌پوش دو جنبه مهم که شامل نوع پلیمر سازنده و دیگری روش تهیه زخم‌پوش می‌باشد، مورد توجه است (۴، ۵). پلیمرهای مورد استفاده در ساخت زخم‌پوش از دو منبع طبیعی (کلاژن، الژینات، ژلاتین، هیالورونیک اسید، کیتوسان و ...) و سنتزی (پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌لاکتیک اسید، پلی‌وینیل الکل و...) قابل تهیه می‌باشد (۶). یکی از پلیمرهای طبیعی که بطور وسیعی در تهیه زخم‌پوش‌ها مورد استفاده می‌باشد، کیتوسان است (۷، ۸). کیتوسان طی فرآیند داستیلاسیون از پلیمر طبیعی کیتین بدست می‌آید. کیتوسان ویژگی‌های متمایزکننده‌ای نظیر زیست‌سازگاری، غیرسمی بودن، زیست تخریب پذیر بودن، ضدالتهاب، تسریع روند انعقاد خون و ضد میکروبی می‌باشد (۹-۱۱). ساختارهای متنوعی از زخم‌پوش‌ها در سالهای اخیر مورد توجه بوده است، که از این جمله می‌توان به پدهای الکتروریسی شده، اسپانچ‌ها، ساختارهای پاششی بصورت اسپری، هیدروژل‌ها و غیره می‌توان اشاره نمود (۱۲-۱۵). مشخصه‌هایی همانند قابلیت جذب آب، متورم شدن، قابلیت بارگذاری ترکیبات زیست فعال، وجود ماهیت ساختاری مشابه ماتریکس خارج سلولی طبیعی، روش‌های متنوع در تهیه، قابلیت استفاده از طیف وسیعی از پلیمرها و ترکیبات طبیعی در ساخت

موجب مقبولیت و توجه گسترده به هیدروژل‌ها در سال‌های اخیر شده است (۱۲، ۱۶، ۱۷). یکی از معضلات مهم در درمان زخم، جلوگیری از بروز عفونت باکتریایی می‌باشد. بطور رایج، آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی یکی از گزینه‌های مورد توجه برای پیشگیری و در صورت نیاز کنترل عفونت باکتریایی است. اما نکته قابل تامل که در سال‌های اخیر بسیار مدنظر پژوهشگران بوده است، احتمال بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی و یا سوء مصرف آنتی‌بیوتیک در بیماران دریافت کننده دارو می‌باشد (۱۸، ۱۹). از این رو، استفاده از ترکیباتی که قابلیت ارائه خاصیت ضد میکروبی بویژه ضد باکتریایی را داشته باشند جز اولویت‌های کاربردی در تهیه زخم‌پوش‌ها قرار گرفت. براساس مطالعات انجام شده، استفاده از عصاره میخک موجب ایجاد خاصیت ضد میکروبی و باکتریایی به همراه مشخصه ضدالتهابی که بطور موثر در تسریع روند بهبود زخم نقش ایفا میکند (۲۰، ۲۱). تحقیقات بیانگر اثر ضد باکتریایی عصاره میخک بر روی باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) و گرم منفی (*شریشیا کلی*) می‌باشد (۲۰). از این رو، استفاده از عصاره میخک نه تنها می‌تواند راه حلی برای کاهش سوء مصرف آنتی‌بیوتیک باشد، بلکه تامین کننده خاصیت ضدالتهابی به‌همراه جلوگیری از رشد باکتری‌های شاخص عفونت زخم پوستی می‌باشد خواهد بود. تهیه هیدروژل به روشی که قابلیت حمل و انتقال ماده زیست فعال در ترمیم زخم را داشته باشد، یکی از نکات قابل توجه می‌باشد. بر این اساس، ماهیت ساختاری مورد استفاده در این مطالعه هیدروژل تنظیم شده با استفاده از تغییر pH بر پایه پلیمر کیتوسان که عصاره میخک درون محلول پلیمری بارگذاری شده است، انتخاب شد.

مواد و روش‌ها

قرار گرفت. نمونه فریز شده هیدروژل‌ها با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی (FD-5010-BT، ایران) خشک و با استفاده از پوشش‌دهی لایه طلا برای مشاهده توسط میکروسکوپ الکترونی آماده شد.

آزمون طیف‌سنجی **Fourier Transform Infrared**

FTIR Spectroscopy: برای آزمون گروه‌های عاملی و پیوندهای شیمیایی ساختارهای هیدروژل CS بطور پایه و تلفیق شده با عصاره میخک CS/CEO از طیف‌سنجی FTIR استفاده شد. طیف‌سنجی FTIR با دستگاه اسپکترومتر **Burker Equinox 55**، آلمان) با وضوح 4 cm^{-1} و محدوده‌ی $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ انجام شد.

ویژگی‌های ضد میکروبی هیدروژل‌های CS/CEO:

جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی هیدروژل‌های تهیه شده از دو سویه باکتری استفاده گردید. مشخصه‌های باکتری‌ها در جدول شماره ۱ ارائه شده است. برای انجام تست ضد میکروبی ابتدا باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* بروی محیط کشت نوترون آگار با استفاده از سوآپ استریل بصورت یکدست کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. سپس، در مرکز پلیت‌ها میزان $300\text{ }\mu\text{l}$ از نمونه‌های عصاره میخک (CEO extract)، هیدروژل کیتوسان (CS) و هیدروژل کیتوسان حاوی عصاره میخک (CS/CEO) افزوده شد. با گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون نمونه‌های تیمار شده در انکوباتور، قطره‌ها به عدم رشد اندازگیری و بصورت نمودار گزارش شد.

ارزیابی زیست‌سازگاری هیدروژل CS/CEO: به

منظور ارزیابی زیست‌سازگاری هیدروژل CS/CEO از کشت سلول فیروبلست موشی (L929) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا سلول‌های L929 به تعداد 10^4 درون چاهک‌های پلیت کشت سلول ۲۴ خانه به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس، نمونه هیدروژل

کیتوسان با میزان ۷۹ درصد داستیل‌سیون از Bio Basic (کانادا) خریداری شد. ۳- (۴،۵-دی میتیل تیزول-۲) ۲، ۵ دی‌پنیل تترازولیوم بروماید (MTT)، دی‌میتیل سولفوکساید (DMSO) از شرکت سیگا-آلدريج (آلمان) تهیه شد. استیک‌اسید، هیدروکسید سدیم (NaOH)، پارافرمالدئید، و اتانول از شرکت مرک (آلمان) خریداری گردید. سلول فیروبلست موشی (L929) و نمونه‌های باکتری *E. coli* و *S. aureus* از مرکز ملی ذخایر ژنتیک (ایران) تهیه شد. محیط کشت سلول (DMEM)، سرم جنین گاوی (FBS)، تریپسین/EDTA از شرکت گیبکو (کانادا) خریداری شد. عصاره میخک بصورت هدیه دریافت شد.

تهیه هیدروژل: برای آماده‌سازی هیدروژل کیتوسان ۱/۵ درصد (w/v) (CS) از پودر توزین شده و در حلال اسید استیک (۱٪) در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت تحت استیرر قرار گرفت. همزمان با هم خوردن محلول تهیه شده، با استفاده از محلول NaOH (۱۰N) میزان pH تا محدوده خنثی افزایش داده می‌شود. برای تهیه هیدروژل کیتوسان حاوی عصاره میخک (CS/CEO) ابتدا محلول کیتوسان ۱/۵ درصد در حلال اسید استیک تهیه می‌شود. سپس عصاره میخک به میزان ۰/۶۲۵ درصد به محلول افزوده می‌شود و در نهایت با استفاده از محلول NaOH (۱۰N) میزان pH تا محدوده خنثی تنظیم می‌شود.

بررسی ساختار هیدروژل با میکروسکوپ الکترونی

(SEM): ارزیابی ساختار و منافذ هیدروژل‌های تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM (MIRA III، چک) تحت ولتاژ ۵KV انجام شد. برای این منظور نمونه هیدروژل‌های CS و CS/CEO در محلول ترکیبی گلو تار آلدئید و پارافرمالدئید (۲ درصد) به مدت یک ساعت فرو برده شد. سپس با PBS شستشو داده و در فریزر -80°C درجه به مدت ۴ ساعت

CS/CEO در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به محیط اضافه و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفتن. با گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها با هیدروژل CS/CEO مورفولوژی سلول‌ها در مجاورت هیدروژل با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس (Bell, INV-100FL) مشاهده شد. از کشت سلول در پلیت کشت سلول بعنوان نمونه کنترل استفاده شد. ارزیابی زنده‌مانی سلول L929 در مجاورت هیدروژل CS/CEO: نمونه هیدروژل CS/CEO با pH حدود ۶/۸ به حجم ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به تعداد ۱۰^۴ سلول L929 با آن مخلوط گردید. سپس با استفاده از محلول NaOH میزان pH به حدود خنثی (۷/۲ تا ۷/۴) تنظیم شد. نمونه‌های سلول-هیدروژل با استفاده از PBS و محیط کشت شست و شو داده شدند. در ادامه، نمونه‌های سلول-هیدروژل آماده

سازی شده به پلیت کشت سلول ۹۶ خانه منتقل می‌شود. نمونه‌ها با استفاده از محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد برای بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت درون انکوباتور CO₂ ۵ درصد با رطوبت ۹۵ درصد قرار داده شد. برای هر بازه زمانی تعداد ۳ بار تکرار از نمونه (n = ۳) و کشت در پلیت کشت سلول بعنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد. پس از گذشت بازه‌های زمانی تعریف شده، محلول MTT (۱۰ درصد) از حجم کل محیط کشت تهیه و به هر چاهک افزوده و به مدت ۳ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. بلورهای فرومازون تشکیل شده بعد از ۳ ساعت انکوباسیون، با استفاده از DMSO حل و با استفاده از دستگاه خوانش میکروپلیت (Bio-Tek) در محدوده طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

جدول ۱- مشخصه‌ی باکتری‌های مورد استفاده در تست ضد میکروبی

Table 1. Characteristics of the bacteria used in antibacterial testing

Bacterium name	Standard Number	Gram Reaction
<i>Staphylococcus aureus</i> (S. aureus)	ATTC 25923	Positive
<i>Escherichia coli</i> (E. coli)	ATTC 1330	Negative

نتایج

ساختار هیدروژل با میکروسکوپ الکترونی (SEM): بر اساس تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی (SEM)، ساختار هیدروژل CS دارای منافذ با ابعاد کوچک‌تر و سازمان‌یافته‌تری هستند، درحالی‌که با افزوده شدن عصاره میخک (CS/CEO) اندازه منافذ بزرگتر شده است. همچنین در تصاویر ۱a، هیدروژل CS/CEO دارای سطوح غیر یکدست و خشن می‌باشد. اما نمونه هیدروژل CS دارای سطوحی یکدست و صاف است.

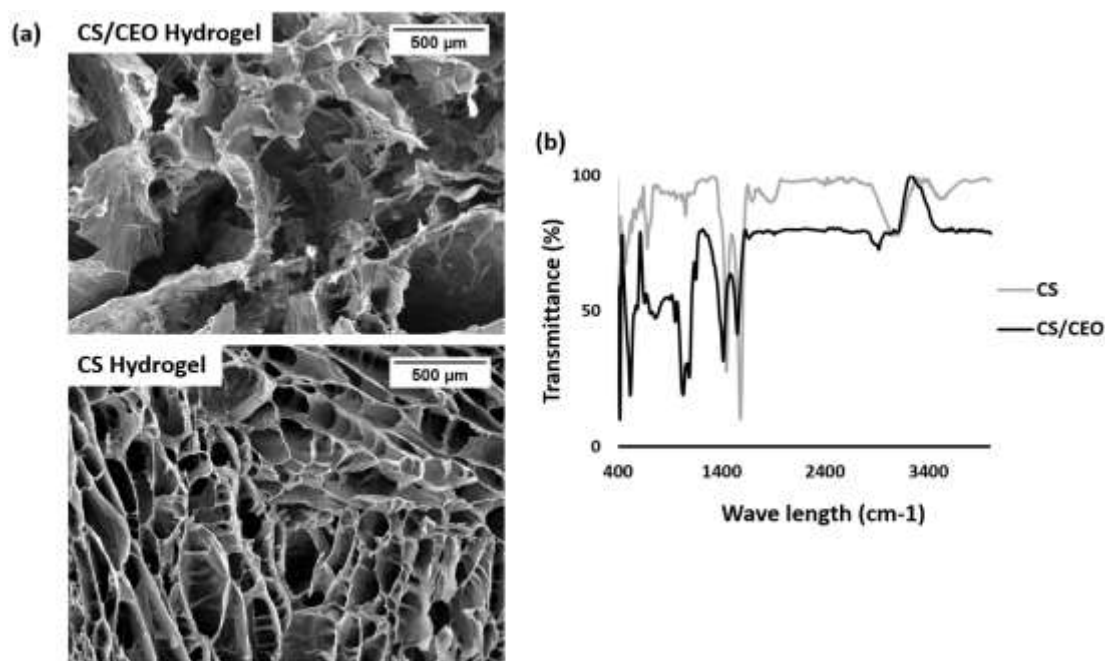
طیف‌سنجی Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy: در تصویر ۱b، طیف جذب

بدست آمده در دو نمونه هیدروژل CS و CS/CEO ارائه شده است. در نمودار پیک جذبی ناحیه cm^{-1} ۳۴۴۴ مربوط به کشش ارتعاشی پیوندهای N-H و O-H برای گروه‌های آمین و هیدروکسیل می‌باشد (۲۲، ۲۳). پیک‌های ناحیه cm^{-1} ۱۲۴۵ و ۱۱۶۳ به ترتیب مربوط به کشش ارتعاشی گروه‌های آمین پیوندهای C-N و کشش ارتعاشی نامتقارن پل‌های استری پیوندهای C-O قابل مشاهده است (۲۴). در محدوده cm^{-1} ۳۵۹۱ و ۱۶۰۹ مربوط به گروه اتوزنول در عصاره میخک می‌باشد (۲۵). براساس پیک‌های قابل مشاهده در نمودار شکل ۱b، وجود پلیمر کیتوسان همراه با عصاره میخک (CS/CEO) قابل تأیید است.

سلول‌های L929 بوده یا به عبارتی زیست سازگار می‌باشد. در مقایسه نمونه تیمار شده با هیدروژل CS/CEO با نمونه کنترل تفاوتی در روند رشد و مورفولوژی سلول‌ها دیده نمی‌شود. میزان زنده‌مانی سلول‌های L929 با استفاده از تست MTT در مقایسه هیدروژل CS/CEO با نمونه کنترل در شکل ۳b ارائه شده است. هر دو نمونه مورد مطالعه روند رشد و تکثیر سلول‌های L929 در بازه زمانی ۷۲ ساعت دارای نرخ فزاینده است. سلول‌های L929 تیمار شده با هیدروژل CS/CEO روند رشد افزایشی را در ۳ بازه زمانی نشان می‌دهند، بطوریکه در مقایسه ۲۴ با ۷۲ ساعت دارای سطح معنی‌داری $p < 0.001$ می‌باشد. این درحالی است که رشد سلولی نمونه‌های کنترل درمقایسه با تیمار شده با هیدروژل CS/CEO بیشتر است. این نکته می‌تواند بدلیل حضور عصاره میخک در نمونه هیدروژل CS باشد.

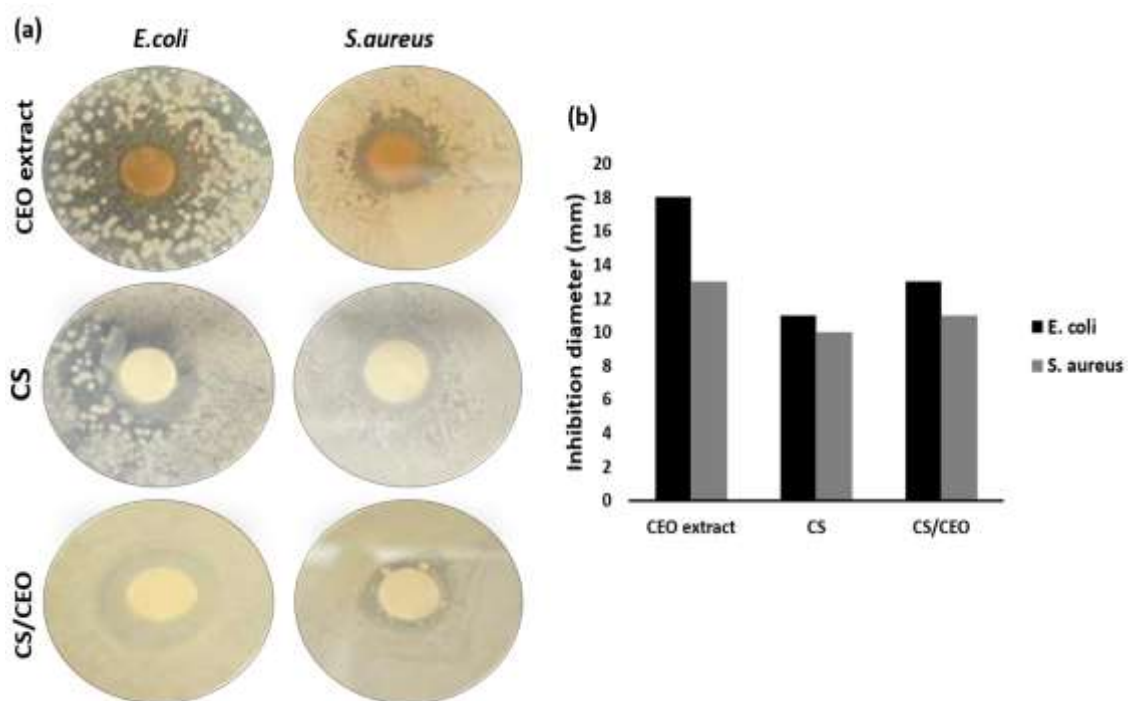
ارزیابی فعالیت ضد میکروبی هیدروژل‌های CS/CEO: بمنظور ارزیابی و مقایسه فعالیت ضد میکروبی هیدروژل تهیه شده CS/CEO، دو نمونه هیدروژل کیتوسان (CS) و عصاره میخک (CEO extract) نیز مورد مطالعه قرار گرفت. براساس تصاویر و نمودار ارائه شده در شکل b و ۲a، بیشترین فعالیت ضد میکروبی علیه دو باکتری *E. coli* و *S. aureus* مربوط به عصاره استخراج شده از گیاه میخک می‌باشد. نکته قابل توجه وجود فعالیت ضدباکتریایی هیدروژل CS فاقد بارگذاری عصاره میخک است، که تأییدکننده خاصیت ضدباکتریایی کیتوسان می‌باشد. فعالیت ضدباکتریایی هیدروژل‌ها (CS و CS/CEO) و عصاره میخک علیه باکتری *E. coli* بیشتر از باکتری *S. aureus* است.

بررسی زیست سازگاری و زنده‌مانی سلول L929 در مجاورت هیدروژل: همانطور که تصاویر ۳a قابل مشاهده است، هیدروژل CS/CEO فاقد سمیت برای



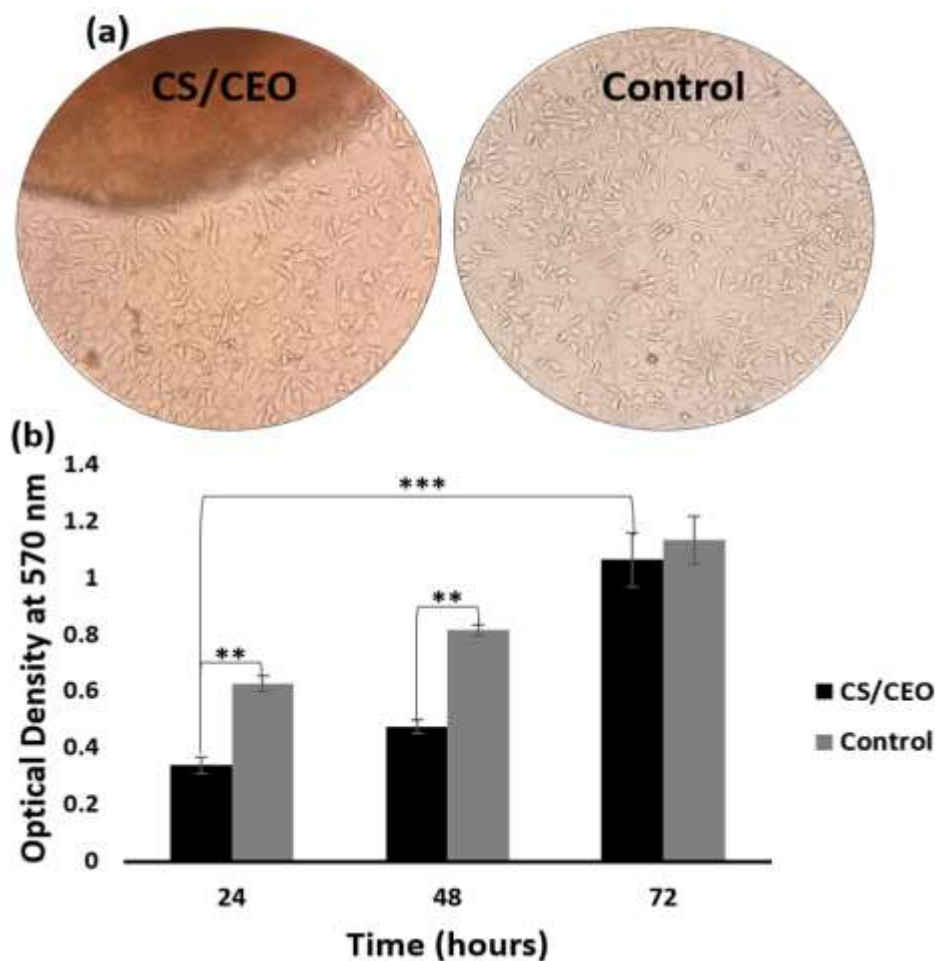
شکل ۱- مشخصه‌یابی هیدروژل‌های سنتز شده. (a) تصاویر SEM از هیدروژل‌های CS و CS/CEO، بزرگنمایی تصاویر: ۵۰۰ میکرون. (b) طیف FTIR هیدروژل‌های CS و CS/CEO.

Fig. 1. The synthesized hydrogels characterization. (a) SEM images of CS and CS/CEO hydrogels Magnification: 500 μm. (b) FTIR spectra of CS and CS/CEO hydrogels.



شکل ۲- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی هیدروژل‌های سنتز شده. (a) تصاویر فعالیت ضد میکروبی هیدروژل‌های CS و CS/CEO در مقابل سویه‌های باکتری *E. coli* و *S. aureus*. (b) نمودار میانگین ناحیه بازدارنده بر روی محیط آگار برای *E. coli* و *S. aureus* بعد از انکوباسیون با هیدروژل‌های CS و CS/CEO.

Fig. 2. The antimicrobial activity assay of synthesized hydrogels. (a) Antimicrobial activity of images of CS and CS/CEO hydrogels against *E. coli* and *S. aureus*. strains (b) Average diameter of inhibition zone area on agar for *E. coli* and *S. aureus* after incubation of CS and CS/CEO hydrogels.



شکل ۳- ارزیابی‌های برون تنی. (a) تصاویر میکروسکوپ نوری سلول‌های L929 بر روی هیدروژل CS/CEO بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون. کشت در پلیت کشت سلول بدون هیدروژل بعنوان کنترل در نظر گرفته شد. بزرگنمایی تصاویر ۱۰۰x می‌باشد. (b) زنده‌مانی سلول فیبروبلاستی موشی (L929) کشت شده بر روی هیدروژل CS/CEO و کنترل در بازه زمانی ۲۴-۷۲ ساعت بعد از انکوباسیون.

Fig. 3. In-vitro assay. (a) Inverted microscopy images of L929 cells on CS/CEO hydrogel after 24h incubation. A plate well without hydrogel was used as a control. The magnification of images is 100x. (b) The cell viability of mouse fibroblast cells (L929) was seeded on CS/CEO hydrogel and controlled after 24-72h incubation.

بحث

باشند. از این رو، مدیریت به موقع و صحیح زخم‌های پوستی یکی از چالش‌های مهم حوزه بهداشت و درمان است. بر این اساس، طراحی و تهیه پانسمان‌های مدرن زخم یا زخم‌پوش جزو حوزه‌های مطالعاتی و تحقیقاتی قابل توجه در زیست پزشکی می‌باشد (۸، ۲۶). زخم‌پوش باید قابلیت محافظت از محل آسیب‌دیده به همراه تامین شرایطی از جمله

پوست بعنوان بزرگترین بافت بدن دارای عملکردهای زیستی متنوعی در بدن جانداران از جمله محافظت فیزیکی، ساخت ویتامین D، امکان تعریق و تنظیم دمای بدن می‌باشد. بروز آسیب یا نقصی در ساختار پوست تحت عنوان زخم تعریف می‌شود. زخم‌های پوستی درمان نشده موجب محدودیت عملکرد فرد شده و حتی می‌تواند تهدید کننده حیات موجود زنده

حفظ رطوبت محیط، قابلیت تبادل هوا، امکان تعویض بدون آسیب مجدد به بافت در حال ترمیم، تسریع روند بهبود، التیام بخش و... را داشته باشد (۲۷، ۲۸). جهت تامین مشخصه‌های ذکر شده توجه به دو نکته نوع ماده سازنده و روش ساخت زخم‌پوش حائز اهمیت است. تنوع گسترده‌ای از مواد طبیعی و سنتزی در ساخت زخم‌پوش مورد استفاده قرار می‌گیرند. از جمله مواد طبیعی که در سال‌های اخیر مورد توجه محققین این حوزه قرار گرفته است، پلیمر کیتوسان می‌باشد. کیتوسان محصول داستیلاسیون کیتین منشأ گرفته از سخت‌پوستان است. این بیوپلیمر زیست-سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر بوده که ویژگی‌های اولیه مورد نیاز یک زخم‌پوش می‌باشد. همچنین، خاصیت ضد میکروبی بویژه ضد باکتریایی و ضد قارچی، تسریع روند انعقاد خون، خاصیت آنتی‌اکسیدان، ضد توموری و ماهیت کاتیونیک موجب تمایز غیرقابل اغماض این پلیمر شده است (۱۵، ۲۹، ۳۰). تهیه ساختاری با ماهیت کارآمد بر پایه کیتوسان به عنوان زخم‌پوش یکی از نکات کلیدی می‌باشد. با توجه به ویژگی‌هایی ذکر شده برای زخم‌پوش، هیدروژل‌های تنظیم شونده بواسطه‌ی pH یکی از گزینه‌های مورد توجه محققین می‌باشد (۳۱، ۳۲). هیدروژل ساختاری زیست‌سازگار، منعطف، جاذب رطوبت می‌باشند (۳۱). در میان ساختارهای هیدروژل مطرح شده، هیدروژل‌های تنظیم‌شونده به pH قابلیت بارگذاری ترکیبات زیست‌فعال را دارا می‌باشند (۳۲). یکی از ترکیبات زیست‌فعال مورد توجه در تهیه زخم‌پوش عصاره بدست آمده از گیاه میخک (CEO) است. ساختار هیدروژل CS تهیه شده با استفاده از تنظیم pH و تلفیق شده با CEO بواسطه‌ی تصویر SEM (شکل ۱a) مورد مطالعه قرار گرفت. براساس تصویر شکل ۱a، افزوده شدن CEO موجب افزایش اندازه منافذ نسبت به نمونه فاقد CEO شده است. همچنین بر

اساس نمودار طیف جذبی FTIR و وجود تغییر در پیک‌های جذبی در نمونه حاوی CEO در طول موج-های 1609 cm^{-1} و 3591 که مربوط به گروه عاملی اورتونول است، نسبت به هیدروژل CS تأیید کننده تلفیق و حضور CEO در هیدروژل تهیه شده است (شکل ۱b). وجود عفونت‌های مقاوم به درمان آنتی‌بیوتیکی در مراکز درمانی نیاز به وجود خاصیت ضد باکتریایی قوی در زخم‌پوش بدون بکارگیری آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی برای درمان بیماران با آسیبات پوستی مورد توجه است (۲۰). استفاده از ماده‌ای بجز داروهای آنتی‌بیوتیک رایج جز اولویت‌های تحقیقاتی می‌باشد. ترکیبات موثر بدست آمده از CEO علاوه بر تامین خاصیت ضد میکروبی چشم‌گیر تامین‌کننده ویژگی ضد التهابی نیز می‌باشند. دو مشخصه ضد میکروبی و ضد التهابی در CEO موجب استفاده گسترده از این ترکیب در حوزه‌های مختلف زیست پزشکی شده است (۲۶، ۳۳، ۳۴). در مطالعه در سال ۲۰۱۹، از نانوفیبرهای الکترورسی شده‌ی پلی-کاپرولاکتون/ ژلاتین حاوی روغن میخک به عنوان زخم‌پوش استفاده شد. در این مطالعه روغن میخک جهت ایجاد ویژگی ضد باکتریایی استفاده شد. در این مطالعه افزایش غلظت روغن میخک موجب افزایش مهار رشد باکتری *E. coli* با افزایش زمان تیمار شده است. این در حالی است که در مورد باکتری *S. aureus* تا ۶ ساعت نخست روند کاهش رشد باکتری را مشاهده می‌کنیم ولی پس ۲۴ ساعت از گذشت تیمار میزان مهار رشد نسبت به ۶ ساعت کمتر شده است (۳۳). در مطالعه حاضر استفاده هم‌زمان دو ترکیب با پتانسیل ضد میکروبی پلیمر کیتوسان (CS) و عصاره میخک (CEO) موجب اثر هم‌افزایی در تامین ویژگی ضد باکتریایی می‌گردد. در نتایج تست ضد باکتریایی نیز (شکل ۲)، اثر مهار رشد و تکثیر باکتری در هر یک از ترکیبات به تنهایی و هیدروژل

شده فاقد سمیت برای سلول L929 بوده و بطور فعال از رشد باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* جلوگیری کرده است. براساس نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر هیدروژل CS/CEO حساس به pH علاوه بر زیست‌سازگاری دارای ظرفیت آنتی‌باکتریایی می‌باشد. وجود مشخصه ضدباکتریایی با بهره‌گیری از ترکیبات طبیعی می‌تواند راه‌حلی امیدبخش برای کاهش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی در حوزه زیست پزشکی باشد. ساختار هیدروژل CS/CEO دارای قابلیت استفاده بعنوان زخم‌پوش در مطالعات تکمیلی در محیط درون تنی (in vivo) می‌باشد.

منابع

1. Anjum S, Arora A, Alam MS, Gupta B. Development of antimicrobial and scar preventive chitosan hydrogel wound dressings. *Int J Pharm.* 2016;508(1-2):92-101.
2. Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, Han C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials.* 2003; 24(26):4833-4841.
3. Akbari A, Rabbani S, Irani S, Zandi M, Sharifi F, Ameli F, Mohamadali M. In vitro and in vivo study of carboxymethyl chitosan/polyvinyl alcohol for wound dressing application. *J Appl Polym Sci.* 2022; 139(10):51764.
4. Khorasani MT, Joorabloo A, Adeli H, Milan PB, Amoupour M. Enhanced antimicrobial and full-thickness wound healing efficiency of hydrogels loaded with heparinized ZnO nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *Int J Biol Macromol.* 2021;166:200-212..
5. Adeli H, Khorasani MT, Parvazinia M. Wound dressing based on electrospun PVA/chitosan/starch nanofibrous mats: Fabrication, antibacterial and cytocompatibility evaluation and in vitro

تلفیقی (CS/CEO) به وضوح قابل‌مشاهده است. تمامی ساختارهای تهیه شده در زمینه زخم‌پوش نیاز به تأیید زیست‌سازگاری در شرایط برون تنی (in vitro) دارند. در این مطالعه از رده سلول فیروبلاست موشی (L929) استفاده گردید. بر اساس تصاویر میکروسکوپی بدست آمده از تیمار سلول‌های L929 با هیدروژل CS/CEO هیچگونه سمیت سلولی مشاهده نشد (شکل ۳a). در ادامه بررسی از آزمون MTT برای تعیین میزان زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده با هیدروژل CS/CEO در بازه زمانی ۲۴ تا ۷۲ ساعت در برابر نمونه سلول L929 کشت شده در کف پلیت مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نمودار ارائه شده در تصویر ۳b، سلول‌های تیمار شده با هیدروژل CS/CEO دارای روند رشد فزاینده بوده است. بطوریکه در بازه زمانی ۲۴ تا ۷۲ ساعت دارای سطح معنی‌داری ($p > 0/001$) می‌باشد. در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۲۱، سلول فیروبلاستی بر روی نانوالیاف کیتوسان/پلی‌اتیلن‌اکساید حاوی عصاره میخک برای مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. در نمونه حاوی عصاره میخک فاقد تفاوت معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل است (۳۴). در مطالعه حاضر سه بازه زمانی بویژه ۲۴ ساعت نخست برای بررسی دقیق ویژگی‌های هیدروژل تهیه شده در برابر سلول‌های فیروبلاست بعنوان مطالعات پایه جهت تعمیم به مطالعات درون تنی (in vivo) در نظر گرفته شد (شکل ۳b).

نتیجه‌گیری

عصاره میخک (CEO) بارگذاری شده درون هیدروژل بمنظور ارتقا ویژگی‌های هیدروژل تهیه شده از پلیمر کیتوسان با موفقیت انجام شد. ویژگی‌های ساختاری و شیمیایی هیدروژل CS/CEO بواسطه‌ی آزمون‌های SEM و FTIR بررسی شد. ساختار هیدروژل تهیه

- Hassan MA. Development of Polyvinyl Alcohol/Kaolin Sponges Stimulated by Marjoram as Hemostatic, Antibacterial, and Antioxidant Dressings for Wound Healing Promotion. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23):13050.
- 15.Moeini A, Pedram P, Makvandi P, Malinconico M, Gomez d'Ayala G. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. *Carbohydr Polym.* 2020; 233:115839..
16. Sharifi F, Hasani M, Atyabi SM, Yu B, Ghalandari B, Li D, et al. Mesenchymal stem cells encapsulation in chitosan and carboxymethyl chitosan hydrogels to enhance osteo-differentiation. *Mol Biol Rep.* 2022; 49(12):12063-12075..
17. Zhang M, Yang M, Woo MW, Li Y, Han W, Dang X. High-mechanical strength carboxymethyl chitosan-based hydrogel film for antibacterial wound dressing. *Carbohydr Polym.* 2021;256:117590.
18. Caldwell MD. Bacteria and Antibiotics in Wound Healing. *Surg Clin North Am.* 2020; 100(4):757-776.
19. Zhang J, Ge J, Xu Y, Chen J, Zhou A, Sun L, Gao Y, Zhang Y, Gu T, Ning X. Bioactive multi-engineered hydrogel offers simultaneous promise against antibiotic resistance and wound damage. *Int J Biol Macromol.* 2020; 164:4466-4474..
20. Banerjee K, Madhyastha H, Sandur VR, Manikandanath NT, Thiagarajan N, Padma T. Anti-inflammatory and wound healing potential of a clove oil emulsion. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2020; 193:111102.
21. Ali R, Khamis T, Enan G, El-Didamony G, Sitohy B, Abdel-Fattah G. The healing capability of clove flower extract (CFE) in streptozotocin-induced (STZ-induced) diabetic rat wounds infected with multidrug resistant bacteria. *Molecules.* 2022;27(7):2270.
22. Mohammadnezhad J, Khodabakhshi-Soreshjani F, Bakhshi H. Preparation and healing assay. *Int J Biol Macromol.* 2019; 122:238-254.
6. Kabirkoochian A, Bakhshi H, Irani S, Sharifi F. Chemical Immobilization of Carboxymethyl Chitosan on Polycaprolactone Nanofibers as Osteochondral Scaffolds. *Appl Biochem Biotechnol.* 2023;195(6):3888-3899.
7. El-Samad LM, Hassan MA, Basha AA, El-Ashram S, Radwan EH, Abdul Aziz KK, Tamer TM, Augustyniak M, El Wakil A. Carboxymethyl cellulose/sericin-based hydrogels with intrinsic antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory properties promote re-epithelization of diabetic wounds in rats. *Int J Pharm.* 2022; 629:122328.
8. Feng W, Wang Z. Biomedical applications of chitosan-graphene oxide nanocomposites. *iScience.* 2021; 25(1):103629.
9. Mourya VK, Inamdar NN, Tiwari A. Carboxymethyl chitosan and its applications. *Advanced Materials Letters, Review Article Adv. Mat. Lett.* 2010; 1(1):11-33.
- 10.Fei Liu X, Lin Guan Y, Yang DZ, Li, Z. Yao KD. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J Appl Polym Sci.* 2001;79(7):1324-1335.
- 11.Li B, Cui J, Xu T, Xu Y, Long M, Li J, Liu M, Yang T, Du Y, Xu Q. Advances in the preparation, characterization, and biological functions of chitosan oligosaccharide derivatives: A review. *Carbohydr Polym.* 2024;332:121914.
12. Dreiss CA. Hydrogel design strategies for drug delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2020;48:1-17.
- 13.Zhou Y, Yang H, Liu X, Mao J, Gu S, Xu W. Electrospinning of carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol)/silk fibroin nanoparticles for wound dressings. *Int J Biol Macromol.* 2013;53:88-92..
- 14.Tamer TM, Alsehli MH, Omer AM, Afifi TH, Sabet MM, Mohy-Eldin MS,

30. Shah A, Ashames AA, Buabeid M A, Murtaza G. Synthesis, in vitro characterization and antibacterial efficacy of moxifloxacin-loaded chitosan-pullulan-silver-nanocomposite films. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2020;55:101366.
31. Omid M, Yadegari A, Tayebi L. Wound dressing application of pH-sensitive carbon dots/chitosan hydrogel. *RSC Adv*. 2017;7(18):10638-49.
32. Arafa AA, Nada AA, Ibrahim AY, Sajkiewicz P, Zahran MK, Hakeim OA. Preparation and characterization of smart therapeutic pH-sensitive wound dressing from red cabbage extract and chitosan hydrogel. *Int J Biol Macromol*. 2021;182:1820-1831.
33. Unalan I, Endlein SJ, Slavik B, Buettner A, Goldmann WH, Detsch R, Boccaccini AR. Evaluation of Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone)/Gelatin Nanofiber Mats Containing Clove Essential Oil for Antibacterial Wound Dressing. *Pharmaceutics*. 2019;11(11):570.
34. Hameed M, Rasul A, Waqas MK, Saadullah M, Aslam N, Abbas G, Latif S, Afzal H, Inam S, Akhtar Shah P. Formulation and evaluation of a clove oil-encapsulated nanofiber formulation for effective wound-healing. *Molecules*, 2021; 26(9):2491.
- evaluation of chitosan-coated eggshell particles as copper (II) biosorbent. *Desalin. Water Treat*. 2016; 57(4):1693-1704.
23. Ray M, Pal K, Anis A, Banthia AK. Development and characterization of chitosan based polymeric hydrogel membranes. *Des. Monomers Polym*. 2010; 13(3):193-206.
24. Sharifi F, Atyabi SM, Norouzzian D, Zandi M, Irani S, Bakhshi H. Polycaprolactone/carboxymethyl chitosan nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering application. *Int J Biol Macromol*. 2018;115:243-248.
25. González-Rivera J, Duce C., Falconieri D, Ferrari C, Ghezzi L, Piras A, et al. Coaxial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove buds): Chemical composition and thermal analysis. *Innovative Innov Food Sci Emerg Technol*, 2016;33:308-318.
26. Parham S, Zargar Kharazi A. Cellulosic textile/clove nanocomposite as an antimicrobial wound dressing: In vitro and in vivo study. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2022;217:112659.
27. Liang H, Mirinejad MS, Asefnejad A, Baharifar H, Li X, Saber-Samandari S, et al. Fabrication of tragacanthin gum-carboxymethyl chitosan bio-nanocomposite wound dressing with silver-titanium nanoparticles using freeze-drying method. *Mater Chem Phys*. 2022;279(10):125770
28. Guo W, Ding X, Zhang H, Liu Z, Han Y, Wei Q, Okoro OV, Shavandi A, Nie L. Recent Advances of Chitosan-Based Hydrogels for Skin-Wound Dressings. *Gels*. 2024;10(3):175.
29. Sivanesan I, Hasan N, Muthu M, Blessing G, Gopal J, Chun S, Shin J, Oh JW. Exploring the impact of chitosan composites as artificial organs. *Polymers*. 2022;14(8):1587.