

## Fabrication and Evaluation of a Cobalt-Containing Three-Layer Nanofibrous Scaffold and Its Antibacterial Properties |

Zahra Hemmati Dezaki<sup>1</sup>, Kazem Parivar<sup>1</sup>, Vahabodin Goodarzi<sup>2</sup>, Mohammad Reza Nourani<sup>2\*</sup>

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Tissue Engineering and Regenerative Medicine Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\*Corresponding Author: Mohammad Reza Nourani, Tissue Engineering and Regenerative Medicine Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran; Email: r.nourani@yahoo.com

| Received | 21/04/2025

| Revised | 21/07/2025

| Accepted | 29/07/2025

### | Abstract |

**Background and Aim:** Bioactive glass has emerged as a novel innovation in materials science, offering extensive potential in biomedical applications. Due to its unique physicochemical and biological properties, it has become a prominent candidate in regenerative medicine. One of the remarkable features of bioactive glass is its intrinsic antimicrobial activity. In this study, cobalt ions were incorporated into a three-layer electrospun scaffold to enhance its antibacterial performance.

**Materials and Methods:** The scaffold was fabricated using a combination of polyurethane, polycaprolactone, and collagen, blended with cobalt-doped bioactive glass. The scaffold was produced in a three-layered structure through electrospinning. Its structural and biological properties were analyzed using scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and cell adhesion assays. Antibacterial assessments were conducted using four bacterial strains, including both Gram-positive and Gram-negative species.

**Results:** The antibacterial evaluation conducted 24 hours post-bacterial seeding revealed that the fabricated scaffold effectively inhibited bacterial growth around the scaffold area. The results confirmed the scaffold's favorable antibacterial performance.

**Conclusion:** The findings of this study demonstrated that the incorporation of cobalt-containing bioactive glass into the designed scaffold significantly enhanced fibroblast cell proliferation and viability, while also exerting strong antibacterial effects. Therefore, this scaffold holds great potential as a promising candidate for tissue engineering applications in the repair of damaged tissues.

### | Keywords |

Three-Layer Scaffold |  
Cobalt-Doped Bioactive  
Glass |  
Antibacterial |

| Iau Science |

## ساخت و بررسی نانوداربست سه‌لایه حاوی شیشه زیستی کبالت و بررسی خاصیت آنتی‌باکتریال آن

زهرا همتی دزکی<sup>۱</sup>، کاظم پریور<sup>۱</sup>، وهاب‌الدین گودرزی<sup>۲</sup>، محمدرضا نورانی<sup>۳\*</sup>

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات مهندسی بافت و پزشکی بازساختی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران

\*نویسنده مسئول: دکتر محمدرضا نورانی، مرکز تحقیقات مهندسی بافت و پزشکی بازساختی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران؛ پست الکترونیکی: r.nourani@yahoo.com

تاریخ دریافت | ۱۴۰۴/۰۲/۰۱ | تاریخ ویرایش | ۱۴۰۴/۰۴/۳۰ | تاریخ پذیرش | ۱۴۰۴/۰۵/۰۷

### چکیده

**زمینه و هدف:** شیشه زیستی به عنوان یکی از نوآوری‌های نوین در علم مواد، امکانات گسترده‌ای را در حوزه درمان‌های پزشکی فراهم کرده و به دلیل خواص منحصر به فردی که دارد، به گزینه‌ای محبوب در این زمینه تبدیل شده است. یکی از ویژگی‌های برجسته این مواد زیستی، خاصیت ضد میکروبی آنهاست. در این مطالعه به منظور تقویت این ویژگی، یون فلزی کبالت به داربست‌های الکتروریسی سه‌لایه افزوده و عملکرد آنتی‌باکتریال آن مورد ارزیابی قرار گرفته است.

**مواد و روش‌ها:** برای تهیه داربست، از ترکیب پلی‌اورتان، پلی‌کاپرولاکتون و کلاژن همراه با شیشه زیستی استفاده شد و داربست به صورت سه‌لایه با روش الکتروریسی ساخته شد. بررسی‌های انجام شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) و آزمون‌های چسبندگی سلولی، خواص ساختاری و زیستی داربست را تحلیل کردند. آزمون‌های آنتی‌باکتریال نیز با استفاده از چهار گونه باکتری گرم مثبت و گرم منفی انجام گرفت.

**نتایج:** ارزیابی خواص آنتی‌باکتریال داربست بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت باکتری‌ها بر روی آن، نشان‌دهنده اثر مثبت داربست‌ها در جلوگیری از رشد باکتری در اطراف داربست و خواص آنتی‌باکتریال مناسب داربست بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این پژوهش نشان دادند که به کار بردن نانوشیشه زیستی کبالت در داربست طراحی شده باعث افزایش توان تکثیر و زنده‌مانی سلول‌های فیروبیلاست و همین‌طور اثرهای مثبت در مقابله با رشد باکتری‌ها بوده است. از این رو این داربست می‌تواند کاندیدی مناسب برای مهندسی بافت در ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده باشد.

### واژگان کلیدی

داربست سه‌لایه

شیشه زیستی کبالت

آنتی‌باکتریال

علوم Iau

## ۱ | مقدمه

افزون بر آن، خاصیت ضدباکتریایی ذاتی شیشه‌های زیستی نیز اهمیت قابل توجهی در درمان زخم‌های مزمن و عفونی دارد. این خاصیت عمدتاً ناشی از افزایش pH محیط، آزادسازی یون‌های فعال و افزایش فشار اسمزی پیرامون داربست است که در نهایت موجب مهار رشد و تکثیر باکتری‌ها می‌شود. این ویژگی باعث شده است تا شیشه‌های زیستی به‌عنوان جایگزین‌های مناسبی برای داروهای آنتی‌بیوتیکی، به‌ویژه در شرایطی که مقاومت میکروبی ایجاد شده است، مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶).

به‌منظور افزایش عملکرد زیستی و ضدباکتریایی شیشه‌های زیستی، پژوهشگران در سال‌های اخیر تلاش کرده‌اند ترکیب آن‌ها را با یون‌های فلزی فعال مانند نقره ( $Ag^+$ )، روی ( $Zn^{2+}$ )، مس ( $Cu^{2+}$ )، بور ( $B^{3+}$ ) و کبالت ( $Co^{2+}$ ) اصلاح نمایند (۷). این یون‌ها علاوه بر خواص ضدعفونی‌کننده و ضدباکتری، می‌توانند با تحریک پاسخ‌های سلولی و مولکولی، فرایندهای ترمیمی را نیز تقویت کنند. در میان این موارد، یون کبالت جایگاه ویژه‌ای دارد؛ چرا که با تقلید شرایط هیپوکسی (کم‌اکسیژنی) موجب تثبیت پروتئین HIF-1 $\alpha$  و به‌دنبال آن، فعال‌سازی مسیرهای آنژیوژنز و ترمیم بافتی می‌شود (۸).

با توجه به ساختار چندلایه‌ای پوست انسان، طراحی داربست‌های چندلایه برای کاربرد در ترمیم زخم‌های پوستی به یکی از راهبردهای پیشرفته در مهندسی بافت تبدیل شده است. پوست به‌طور طبیعی از سه لایه مجزا شامل اپیدرم، درم و هیپودرم تشکیل شده که هر کدام عملکرد، ساختار و محیط سلولی منحصر به فردی دارند. تقلید از این ساختار لایه‌ای، نه تنها امکان بازسازی مؤثرتر بافت آسیب‌دیده را فراهم می‌کند، بلکه می‌تواند آزادسازی مرحله‌ای و کنترل‌شده ترکیب‌های زیست‌فعال را نیز امکان‌پذیر سازد (۹).

در طراحی داربست‌های چندلایه، استفاده از پلیمرهای زیست‌سازگار طبیعی و سنتزی مانند پلی‌کاپرولاکتون (PCL)، پلی‌اورتان (PU) و گلاژن مورد توجه ویژه قرار گرفته است. هر یک از این پلیمرها دارای ویژگی‌های فیزیکی و

شیشه‌های زیستی<sup>۱</sup> به‌عنوان یکی از نوآوری‌های مهم در علم مواد و مهندسی زیستی، از جایگاه ویژه‌ای در حوزه‌های پزشکی بازساختی و ترمیم بافت برخوردار هستند. این مواد برای نخستین بار در سال ۱۹۶۹ توسط لری هنچ<sup>۲</sup> معرفی شدند و از آن زمان تاکنون توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده‌اند (۱). دلیل اصلی این توجه، توانایی منحصر به فرد شیشه‌های زیستی در برقراری تعامل فعال با محیط زیستی بدن و القای پاسخ‌های زیستی نظیر اتصال سلولی، تکثیر، تمایز و رگ‌زایی است (۲).

از جمله انواع پرکاربرد شیشه‌های زیستی می‌توان به ترکیب کلاسیک 45S5 اشاره کرد که شامل ۴۵ درصد  $SiO_2$ ، ۲۴/۵ درصد  $CaO$ ، ۲۴/۵ درصد  $Na_2O$  و ۶ درصد  $P_2O_5$  است. این ترکیب، به‌دلیل پایداری، زیست‌سازگاری و قابلیت آزادسازی یون‌های فعال زیستی، به‌عنوان استاندارد در بسیاری از مطالعه‌های زیست‌پزشکی مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از ویژگی‌های کلیدی شیشه‌های زیستی، توانایی آن‌ها در ایجاد لایه‌ای از هیدروکسی‌آپاتیت (HCA) در تماس با مایعات بدن است. این لایه، ساختاری مشابه با استخوان طبیعی دارد و به اتصال مستقیم بین داربست و بافت زیستی کمک می‌کند (۳).

فرایند آزادسازی یون‌هایی مانند  $Ca^{2+}$ ،  $Si^{4+}$ ،  $Na^+$  و  $PO_4^{3-}$  از ساختار شیشه زیستی، به‌صورت تدریجی در محیط زیستی انجام می‌شود. این یون‌ها نقش فعالی در القای مسیرهای مولکولی مرتبط با ترمیم دارند؛ برای مثال، یون سیلیکات موجب تحریک تمایز سلول‌های بنیادی و افزایش بیان فاکتور رشد VEGF می‌شود، درحالی‌که یون کلسیم در افزایش چسبندگی و تکثیر سلول‌ها نقش دارد (۴). به‌طور خاص، فعال‌سازی فاکتورهای رشد رگ‌زا مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) توسط این یون‌ها در مطالعه‌های مختلف به اثبات رسیده و نقش مهمی در تسریع بازسازی بافت آسیب‌دیده ایفا می‌کند (۵).

<sup>2</sup> Larry L. Hench

<sup>1</sup> Bioactive Glasses

یکی از چالش‌های اصلی در ترکیب نانوذرات معدنی با ماتریس پلیمری، تثبیت ساختار نهایی و جلوگیری از تجمع ذرات در یک نقطه است. به همین دلیل، روش‌هایی همچون کراس‌لینک<sup>۳</sup> شیمیایی با عوامل فعال مانند EDC و NHS مورد استفاده قرار می‌گیرند تا انسجام ساختاری داربست حفظ شده و نانوذرات به صورت همگن در ماتریس پخش شوند (۱۳).

مطالعه‌ها نشان داده‌اند که داربست‌هایی که با این روش‌ها بهبود یافته‌اند، نه تنها چسبندگی سلولی و سازگاری بافتی بهتری دارند، بلکه پایداری مکانیکی و قابلیت عملکردی آن‌ها نیز به طور محسوسی افزایش می‌یابد (۱۴).

در این میان، کاربرد یون‌های کبالت به عنوان عامل دوپ‌کننده در ساختار نانوذرات شیشه زیستی، تأثیر بسزایی در خواص داربست نهایی دارد. حضور  $Co^{2+}$  نه تنها به صورت مستقیم باکتری‌ها را از بین می‌برد، بلکه به دلیل تأثیر بر مسیر هیپوکسی، فاکتورهای رشد رگ‌زا را فعال کرده و در نتیجه ترمیم سریع‌تر و بهینه‌تر زخم را موجب می‌شود. یون‌های کبالت همچنین می‌توانند بیان ژن‌هایی مانند *VEGF*، *HIF-1 $\alpha$*  و *eNOS* را افزایش دهند که همگی در فرایند نوسازی بافتی نقش کلیدی دارند (۱۵).

با وجود پیشرفت‌های چشمگیر در طراحی مواد زیست‌فعال، چالش‌های متعددی همچون کنترل دقیق خواص آنتی‌باکتریال، مدیریت پاسخ ایمنی، حفظ زیست‌سازگاری بلندمدت و کنترل آزادسازی ترکیب‌های درمانی هنوز پابرجاست. یکی از راهکارهای نوین برای مقابله با این چالش‌ها، بهره‌گیری از ترکیب‌های چندجزیی و ساختارهای چندلایه است که می‌توانند عملکرد سینرژیک اجزای فعال زیستی و ساختاری را در یک سامانه یکپارچه تلفیق نمایند. داربست‌های چندلایه پلیمری-معدنی این امکان را فراهم می‌آورند که هر لایه با هدف خاصی طراحی شود؛ برای مثال، لایه خارجی برای ممانعت از ورود آلودگی،

شیمیایی خاصی هستند که آن‌ها را برای استفاده در داربست‌های ترمیمی مناسب می‌سازد. PU به دلیل انعطاف‌پذیری، پایداری مکانیکی و زیست‌سازگاری، در لایه‌های محافظ و پشتیبان استفاده می‌شود.

در حالی که PCL با سرعت تجزیه آهسته و خواص مکانیکی مناسب، چارچوبی محکم برای پشتیبانی سلولی فراهم می‌کند؛ گلاژن نیز به عنوان یک پروتئین طبیعی ماتریکس خارج سلولی، محیطی بسیار زیست‌سازگار برای مهاجرت، چسبندگی و تکثیر سلول‌ها ایجاد می‌کند و حاوی توالی‌های RGD است که به تعاملات سلول-داربست کمک می‌کند (۱۰).

تلفیق این پلیمرها با نانوذرات شیشه زیستی، به ویژه نوع دوپ‌شده با کبالت، منجر به تولید داربست‌هایی با خواص ترکیبی فوق‌العاده می‌شود. از یک سو، پلیمرهای زیست‌سازگار زیربنای ساختاری مناسبی برای رشد سلول‌ها فراهم می‌کنند و از سوی دیگر، نانوذرات معدنی از طریق آزادسازی یون‌های فعال، عملکرد زیستی و ضدباکتریایی داربست را تقویت می‌کنند. چنین ترکیب‌هایی می‌توانند در ترمیم زخم‌های مزمن، زخم‌های دیابتی و سوختگی‌ها بسیار مؤثر واقع شوند؛ چراکه هم‌زمان پاسخ‌های سلولی، کنترل التهاب و مهار رشد باکتری‌ها را مدیریت می‌کنند (۱۱).

روش‌های ساخت داربست‌های چندلایه نیز نقش مهمی در خواص نهایی آن‌ها دارند. یکی از تکنیک‌های پیشرفته در این زمینه، الکتروسی<sup>۱</sup> است که امکان تولید الیاف نانومتری با سطح ویژه بالا، تخلخل مطلوب و ساختار سه‌بعدی فراهم می‌سازد. این روش به طور گسترده برای ساخت داربست‌های چندلایه پلیمری-معدنی مورد استفاده قرار می‌گیرد و قابلیت بارگذاری هم‌زمان فاکتورهای زیستی، داروها و نانوذرات را دارد (۱۲). به عنوان مثال، استفاده از تکنیک الکتروسی چندمرحله‌ای<sup>۲</sup> می‌تواند به ایجاد لایه‌های مجزا اما پیوسته با توزیع کنترل‌شده اجزای فعال منجر شود.

<sup>3</sup> Crosslinking

<sup>1</sup> Electrospinning

<sup>2</sup> Electrospinning Sequential

لایه میانی برای القای ترمیم بافت و لایه داخلی برای چسبندگی و تکثیر سلولی.

ترکیب شیشه زیستی 45S5 با یون کبالت ( $Co^{2+}$ ) موجب ارتقای چشمگیر در خواص ضدباکتریایی و زیستی این نانوذرات شده است.

مطالعه‌ها نشان داده‌اند که کبالت علاوه بر فعالیت مستقیم بر روی باکتری‌ها، با افزایش بیان ژن‌های مرتبط با فاکتورهای رگزا، می‌تواند ریزمحیط بهبودی را به نفع بازسازی تسهیل کند. همچنین، به دلیل ساختار مزوپور شیشه زیستی، امکان رهایش تدریجی یون  $Co^{2+}$  فراهم شده و اثرگذاری بلندمدت و کنترل شده حاصل می‌شود (۱۶). این ویژگی برای زخم‌های مزمن که در آن‌ها فعالیت باکتریایی پایدار و التهاب مزمن وجود دارد، بسیار حائز اهمیت است.

اگرچه تاکنون مطالعه‌های متعددی به بررسی شیشه‌های زیستی دوپ شده با یون‌های مختلف پرداخته‌اند، اما بیشتر این پژوهش‌ها محدود به کاربرد در استخوان و دندان بوده و کاربرد آن‌ها در بازسازی بافت‌های نرم مانند پوست کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. از سوی دیگر، بیشتر مطالعه‌های موجود به ارزیابی عملکرد ترکیب‌های دوپ‌دهی و تک‌لایه محدود شده‌اند و مدل‌های سه‌لایه با طراحی عملکردی هم‌افزا به ندرت بررسی شده‌اند (۱۹). همچنین، انتشار کنترل شده یون‌های فلزی فعال در داربست‌های چندلایه نانوالیافی هنوز به‌طور دقیق در مطالعه‌های پیشین مدل‌سازی نشده است.

به‌طور خاص، در زخم‌های دیابتی یا زخم‌های دارای عفونت ثانویه، استفاده از داربست‌های زیست‌فعال حاوی یون‌های کبالت می‌تواند هم‌زمان چند هدف را دنبال کند: کاهش بار باکتریایی، تحریک آنژیوژنز، تقویت فعالیت فیبروبلاست‌ها و بهبود ساختار ECM (۱۷). از سوی دیگر، ادغام یون‌های کبالت با داربست‌های الکتروزیستی شده پلی‌کاپرولاکتون/کلاژن موجب افزایش سطح تماس سلولی، بهبود چسبندگی و حفظ مورفولوژی نانوالیاف شده است. همچنین کراس‌لینک شدن ساختار کلاژن با عوامل شیمیایی مانند EDC/NHS موجب تثبیت ساختار و جلوگیری از تخریب زود هنگام داربست در محیط آبی بدن می‌شود (۱۸).

در پژوهش حاضر، با هدف پوشش خلاهای یادشده، یک نانوداربست سه‌لایه نوآورانه طراحی شد که متشکل از لایه‌های الکتروزیستی شده پلی‌اورتان، پلی‌کاپرولاکتون-کلاژن و نانوذرات شیشه زیستی دوپ شده با کبالت می‌باشد. ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی این داربست شامل مورفولوژی نانوالیاف، ترکیب شیمیایی، رفتار سلولی فیبروبلاست‌ها و خاصیت آنتی‌باکتریال در برابر باکتری‌های گرم مثبت و منفی مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه می‌کوشد تا با تحلیل جامع ساختار و عملکرد چنین داربستی، امکان به‌کارگیری آن را به‌عنوان بستر مؤثر برای ترمیم زخم‌های عفونی و مزمن تبیین کند.

## ۲ | مواد و روش‌ها

### ۲-۱ | روش تهیه داربست سه‌لایه

تمامی داربست‌ها شامل ساختار سه‌لایه‌ای بودند که در پژوهش پیشین طراحی و ساخته شده‌اند و روش ساخت آن‌ها مطابق مراحل زیر صورت گرفت (۲۰): در گام نخست، لایه خارجی از پلی‌یورتان (PU) با غلظت ۷ درصد تهیه شد. برای این منظور، پلی‌یورتان در مخلوطی از حلال‌های تتراهیدروفوران (THF) و دی‌متیل‌فرمامید (DMF) به نسبت حجمی ۷۵:۲۵ حل گردید. فرایند الکتروزیستی برای هر لایه به مدت ۲/۵ ساعت انجام شد و پارامترهای مربوطه به‌منظور دستیابی به الیاف یکنواخت و بدون گره بهینه‌سازی شدند.

در ادامه، لایه میانی با ترکیب پلی‌کاپرولاکتون (PCL) و کلاژن نوع I طراحی گردید. این لایه در دو گروه شامل داربست‌های حاوی نانوذرات شیشه زیستی 45S5 دوپ شده یا بدون دوپینگ کبالت و داربست‌های فاقد نانوذرات طبقه‌بندی شد. برای تهیه این لایه، محلول PCL با غلظت ۵ درصد در هگزافلورو-۲-پروپانول (HFIP) تهیه شد. سپس محلول کلاژن با غلظت ۲ درصد در HFIP به محلول PCL اضافه شد، مشروط بر آن که هر دو محلول به‌طور کامل همگن شده باشند. نسبت وزنی PCL به کلاژن ۲۰:۸۰ در نظر گرفته شد. به‌منظور ایجاد ساختار کامپوزیتی، نانوذرات مورد نظر به میزان ۱ درصد وزنی به مخلوط اضافه شدند. این لایه نیز مشابه لایه اول به مدت ۲/۵ ساعت تحت فرایند الکتروزیستی قرار گرفت.

به مدت دو ساعت در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی گراد و غلظت ۵ درصد CO<sub>2</sub> انکوبه گردیدند تا امکان اتصال سلول‌ها به سطح فراهم شود.

در ادامه، سلول‌های فیبروبلاستی ثابت شدند که این فرایند با استفاده از گلو تار آلدهید انجام شد. سپس آب‌گیری سلول‌ها با عبور از غلظت‌های متوالی الکل (۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد) به مدت ۱۵ دقیقه برای هر مرحله صورت گرفت. در نهایت، نمونه‌ها با پوشش طلا آماده‌سازی شدند و تصویربرداری از آن‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) انجام پذیرفت.

## ۲-۴ | آزمایش آنتی‌باکتریال

به منظور بررسی فعالیت ضدباکتریایی داربست‌های تهیه‌شده، از روش انتشار دیسکی<sup>۱</sup> که یکی از آزمون‌های معتبر در ارزیابی سمیت باکتری‌کش مواد زیستی است استفاده شد. این آزمون در مقابل چهارگونه باکتریایی انتخاب‌شده شامل *شرشیا کلی* (ATCC 25922)<sup>۲</sup>، *کلبسلا پنومونیا* (ATCC 700603)<sup>۳</sup>، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853)<sup>۴</sup> به عنوان باکتری‌های گرم منفی استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923)<sup>۵</sup> به عنوان نماینده باکتری‌های گرم مثبت انجام گرفت.

ابتدا، سوسپانسیون‌های باکتریایی در محیط نوترینت برات کشت داده‌شده و غلظت آن‌ها با استفاده از مک‌فارلند (معادل تقریباً ۰/۵ CFU/ml) استانداردسازی شد. در این کدورت تعداد باکتری برابر ۱۰<sup>۸</sup>×۱/۵ هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون می‌باشد. سپس این باکتری‌ها با استفاده از محیط کشت مولر هینتون برات ۱۰۰ برابر رقیق شدند که تعداد باکتری‌ها تقریباً ۱۰<sup>۶</sup> باکتری در هر میلی‌لیتر بود. دیسک‌های داربستی با قطر ۸ میلی‌متر که شامل گروه کنترل (فاقد نانوذره)، داربست حاوی شیشه‌زیستی 45S5 و داربست دوپ‌شده با یون کبالت بودند، به دقت در مرکز پلیت‌ها قرار گرفتند. نمونه‌ها به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

لایه داخلی به همان روش لایه میانی، اما بدون افزودن نانوذرات تهیه شد. تمامی محلول‌ها پیش از الکتروریسی به مدت ۸ ساعت در دمای اتاق (RT) هم‌زده شدند تا یکنواختی کامل حاصل شود.

برای اتصال عرضی، از N-Hydroxysuccinimide(NHS) و Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide-۱ (EDC) به ترتیب با غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در اتانول استفاده شد. نمونه‌های داربست شامل گروه کنترل (فاقد نانوذرات) و گروه آزمایش (حاوی نانوذرات) ابتدا به مدت ۳ ساعت در دمای کمتر از ۱۰ درجه سانتی گراد و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای محیط انکوبه شدند تا برای ارزیابی‌های بعدی آماده‌سازی گردند.

## ۲-۲ | ارزیابی FTIR

گروه‌های شیمیایی موجود در هر دو نوع داربست (داربست کنترل و داربست حاوی نانوذره) با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) مورد بررسی قرار گرفتند. طیف‌های حاصل در محدوده ۷۰۰ تا ۳۲۰۰ سانتی‌متر معکوس (cm<sup>-1</sup>) ثبت شدند. برای انجام این آزمون، یک میلی‌گرم از نمونه پودر شده با ۳۰۰ میلی‌گرم پتاسیم برمید (KBr) مخلوط و در شرایط خلأ نگهداری شدند. پس از آماده‌سازی، نمونه‌ها با سرعت اسکن ۱۲۰ اسکن در دقیقه و با وضوح ۴ سانتی‌متر معکوس آنالیز شدند. این آنالیز برای هر دو نوع داربست (با و بدون پیوند عرضی) انجام شد تا تأثیر حضور نانوذرات و پیوند عرضی بر ساختار شیمیایی داربست‌ها مشخص گردد.

## ۲-۳ | ارزیابی چسبندگی سلول‌ها روی داربست‌ها

برای بررسی چسبندگی سلول‌های فیبروبلاست L929 (خریداری شده از شرکت انستیتو پاستور، ایران) بر سطح داربست‌ها، نمونه‌ها ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت DMEM/F12 (USA, Gibco) حاوی FBS (Gibco) ۱۰ درصد انکوبه شدند. این مرحله پیش از کشت سلول‌ها جهت آماده‌سازی سطح داربست انجام گرفت. پس از آن، سوسپانسیون سلولی به داربست‌ها افزوده شد و نمونه‌ها

<sup>۴</sup> *Pseudomonas aeruginosa*

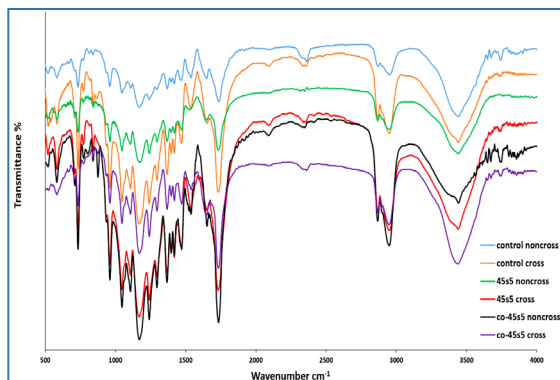
<sup>۵</sup> *Staphylococcus aureus*

<sup>۱</sup> Agar Disk Diffusion Method

<sup>۲</sup> *Escherichia coli*

<sup>۳</sup> *Klebsiella pneumoniae*

افزون بر این، کشش‌های N-H و C=O در ساختار شیمیایی PU منجر به تشکیل پیک‌هایی در نواحی  $1570\text{ cm}^{-1}$  و  $1608\text{ cm}^{-1}$  شدند. همچنین، اتصال عرضی کلاژن موجب محدودسازی حرکت زنجیره‌های پروتئینی آن شده و در نتیجه توانایی پیوند آن با سایر اجزا مانند PU کاهش می‌یابد. در نهایت، پیک‌های مشاهده‌شده در محدوده  $700\text{ cm}^{-1}$  -  $750\text{ cm}^{-1}$  نیز به ارتعاشات خمشی گروه‌های  $\text{CH}_2$  موجود در ساختار پلیمرهای PU و PCL نسبت داده می‌شوند (۲۰).



شکل ۱- مطالعه‌های FTIR روی داربست‌های دولایه بدون نانوذره و داربست‌های سه‌لایه 45S5 و Cobalt قبل و بعد از اتصال عرضی شیمیایی آن‌ها با EDC/NHS (۲۰).

به‌طور مشابه، داربست‌هایی که تحت فرایند اتصال عرضی قرار گرفته بودند، شدت بیشتری در قله‌های مربوطه نشان دادند. دو پیک مشخص که به کشش پیوندهای C-O-C در ساختار PCL نسبت داده می‌شوند، در طیف تمامی داربست‌ها ظاهر شدند (۲۴). در ساختار شیمیایی کلاژن، حضور آمید نوع I و II به ترتیب با پیک‌هایی در نواحی  $1657\text{ cm}^{-1}$  مرتبط با کشش (C=O) و  $1553\text{ cm}^{-1}$  مرتبط با کشش (N-H) قابل شناسایی بود؛ این پیک‌ها در پلی‌یورتان نیز دیده شده و در نتیجه در داربست‌های حاوی پلی‌یورتان-PU کلاژن مشترک هستند (۲۵). شدت این پیک‌ها پس از ایجاد پیوند عرضی در داربست‌ها افزایش یافت، به‌جز در نمونه‌هایی که حاوی نانوذرات دوطبقه بودند. این تغییر به حضور یون‌های کبالت نسبت داده می‌شود که با زنجیره‌های کلاژن و PU وارد برهم‌کنش شیمیایی شده‌اند.

آمید نوع III نیز در ناحیه  $1237\text{ cm}^{-1}$  که ناشی از کشش پیوندهای C-N است، پیک مشخصه‌ای ایجاد می‌کند (۲۶). حضور نانوذرات بیوگلاس 45S5 به دلیل ساختار نامتقارن خود،

پس از انکوباسیون، نواحی عدم‌رشد<sup>۱</sup> با خط کش دیجیتالی و به واحد میلی‌متر مربع اندازه‌گیری شدند. آزمون‌ها برای هر گروه در تکرارهای سه‌گانه انجام گرفت و داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) تحلیل شدند. مقادیر p-value کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شدند.

### ۳ نتایج

#### ۱۱-۳ شناسایی گروه‌های شیمیایی توسط طیف‌سنجی

##### FTIR

شناسایی گروه‌های عاملی شیمیایی در داربست‌ها، شامل نوع برهنه و نوع کامپوزیتی، با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) انجام شد (شکل ۱). نظر به اینکه فرایند اتصال عرضی شیمیایی می‌تواند ویژگی‌های شیمیایی ساختار داربست را تحت تأثیر قرار دهد، این تحلیل برای هر دو حالت دارای اتصال عرضی و بدون آن صورت پذیرفت.

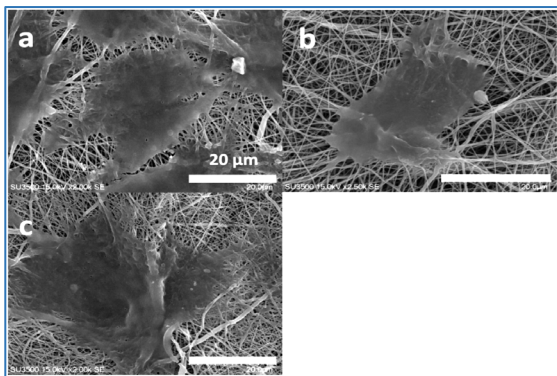
طیف‌های FTIR به‌وضوح حضور گروه‌های عاملی کربونیل (در  $1726\text{ cm}^{-1}$  و هیدروکسیل) در بازه  $3430\text{ cm}^{-1}$  تا  $3147\text{ cm}^{-1}$  را نشان دادند که این گروه‌ها متعلق به جزء پلی‌یورتان (PU) هستند و در تمامی داربست‌های حاوی این پلیمر مشاهده شدند (۲۱). بنابراین، پیک‌های مشخصه PU در طیف تمامی گروه‌های نمونه ثبت شد، چرا که PU یکی از اجزای اصلی داربست‌های طراحی شده بوده است.

پیک‌های مشاهده‌شده در نواحی  $2922\text{ cm}^{-1}$  و  $2845\text{ cm}^{-1}$  نیز مربوط به ارتعاش‌های کششی گروه‌های  $\text{CH}_2$  و CH در ساختار پلی‌یورتان هستند (۲۲). همچنین، گروه‌های عاملی ایزوسیانات در محدوده  $2312\text{ cm}^{-1}$  مشاهده شدند (۲۳)، باین‌حال، شدت این پیک‌ها تحت تأثیر حضور نانوذرات کاهش یافت. این کاهش به دلیل برهم‌کنش‌های نزدیک میان اتم‌های با بار منفی در سطح نانوذرات بیوگلاس و اتم‌های نیتروژن موجود در ساختار ایزوسیانات قابل توجیه است.

<sup>1</sup> Zones of Inhibition

به این موضوع، تأیید شده بود که این سلول‌ها هنگام کشت بر روی توپوگرافی‌ها، اندازه کوچک‌تری نشان می‌دهند. از این رو، بسته به خواص شیمیایی سطح، انبساط کمتر آن‌ها ممکن است رخ دهد. در حالی که باید اضافه نمود که بسترهای نانوالیافی به دلیل سطح بالاتر، چسبندگی و پخش بهتر سلولی را فراهم می‌کنند (۳۲). به نظر می‌رسد سلول‌های روی داربست با نانوذرات بیوگلاس 45S5 تا حدودی جمع شده و فیلوپودیای آن‌ها در مقابل حذف می‌شوند.

علاوه بر این، مشاهده‌های SEM تراکم سلولی بالاتری را در داربست کنترل و پیوند با کبات در مقایسه با داربست کامپوزیت با نانوذرات غیرجایگزین تأیید نمود. اگرچه گسترش سلولی بهتر بر روی داربست کامپوزیت در مقایسه با گروه کنترل مشهود است؛ این همبستگی بین یون کبات و گسترش سلولی توسط مطالعه‌های دیگر تأیید شده بود (۳۳). علاوه بر این، باید اضافه نمود که تمام گروه‌های داربست به دلیل وجود کلاژن در ساختار خود، باید از چسبندگی سلولی پشتیبانی کنند. کلاژن پیوند سلولی را به عنوان تابعی از توالی‌های RGD خود در آمینواسیدهای افزایش می‌دهد. با این وجود، بدیهی است که تفاوت قابل توجهی در مورد اتصال سلولی وجود دارد که می‌تواند مربوط به یون‌های کبات بارگذاری شده باشد (۲۰).



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از ریخت‌شناسی سلول‌ها روی داربست‌ها: (a) داربست دولایه بدون نانوذره، (b) داربست سه‌لایه حاوی شیشه زیستی 45S5 و (c) داربست سه‌لایه دوپ‌شده با یون کبات. تمامی نمونه‌ها با استفاده از عامل‌های اتصال متقاطع EDC/NHS به صورت شیمیایی اصلاح سطحی شدند (۲۰).

### ۳-۳ | مشاهده‌ها ضدباکتریایی

منجر به تولید پیک‌های ارتعاشی در بازه  $1024 \text{ cm}^{-1}$  تا  $500 \text{ cm}^{-1}$  شد که نمایانگر گروه‌های Si-O-Si و ارتعاشات نامتقارن آن‌هاست (۲۷). قله‌های متعدد مشاهده شده در این ناحیه همچنین می‌توانند به حضور فاز کلسیتی در ترکیب بیوگلاس نسبت داده شوند (۲۸).

گروه‌های کربنات موجود در ساختار شیشه زیستی در حدود  $1450 \text{ cm}^{-1}$  پیک مشخصی از خود نشان دادند که پس از اتصال عرضی با شدت بیشتری مشاهده شد. با این حال، در داربست‌هایی که در آن‌ها شیشه زیستی با کبات جایگزین شده بود، این قله حضور نداشت (۲۹). شدت پیک مشاهده شده در ناحیه  $721 \text{ cm}^{-1}$  که مربوط به اکسیژن‌های غیر پل‌زننده<sup>۱</sup> است، در داربست‌های حاوی بیوگلاس/PU-PCL/کلاژن/نانوذرات افزایش یافت؛ این افزایش به واسطه حضور یون‌های کبات در ساختار داربست قابل توجیه است.

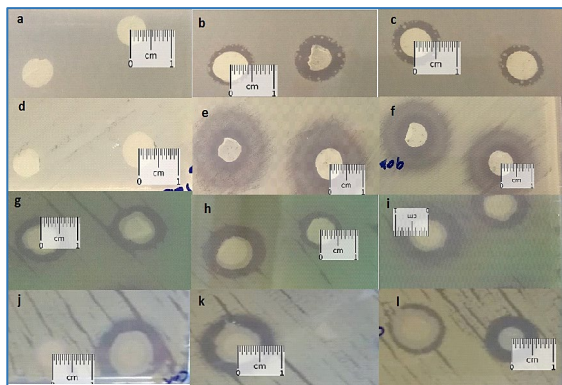
افزون بر آن، شدت تمامی پیک‌های مربوط به گروه‌های Si-O-Si در نانوذرات شیشه زیستی تحت تأثیر شکستن پیوندهای بیان شده توسط یون‌های کبات افزایش یافت و بازتاب‌دهنده تغییرهای ساختاری در سطح نانوذرات بود (۳۰).

### ۲-۳ | چسبندگی سلولی بر روی داربست‌های آماده شده توسط SEM

تکثیر سلول‌ها و گسترش آن‌ها بر روی بسترها برای اهداف مهندسی بافت حیاتی است. در ادامه شکل ۲ مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست L-929 را بر روی داربست‌های غیرکامپوزیت و کامپوزیت نشان می‌دهند. گروه‌های کامپوزیت دارای سه‌لایه، که حاوی نانوذرات در لایه میانی آن، بودند. با این حال، یک نوع کامپوزیت توسط نانوذرات بیوگلاس بدون دوپ و دیگری با نوع جایگزین شده با کبات بارگذاری شد. سلول‌های فیبروبلاست L-929 شکل دوکی با اندازه حدود ۴۵ میکرومتر دارند (۳۱). قطر آن‌ها پس از کشت روی داربست کامپوزیتی با شکل جفت‌شده نانوذرات بیوگلاس 45S5، بزرگتر بودند. با این حال، سلول‌ها قابلیت پخش کمتر بر روی داربست کنترل و کامپوزیت با نوع غیردوپینگ نانوذرات را داشتند. حتی مورفولوژی در داربست دوم در مقایسه با گروه برهنه بیش تر بود. با توجه

<sup>1</sup> Non-Bridging Oxygens

متفاوت است. میانگین و انحراف معیار نتایج در جدول ۱ (به صورت تکمیلی) ارائه شده‌اند و نمودارهای مربوط به نواحی مهار رشد در شکل ۳ نمایش داده شده است.



شکل ۳- روش انتشار دیسک آنتی‌باکتریال. (a): داربست سه‌لایه بدون نانوذره و کراس لینک شده، *E. coli*; (b): داربست کامپوزیت با نانوذره شیشه‌زیستی 45S5 و کراس لینک شده، (c): *E. coli* داربست کامپوزیت با نانوذره شیشه‌زیستی Cobalt و کراس لینک شده، کلبسیلا (d): داربست سه‌لایه بدون نانوذره و کراس لینک شده، کلبسیلا (e): داربست کامپوزیتی با نانوذره شیشه‌زیستی 45S5 و کراس لینک شده و کلبسیلا (f): داربست کامپوزیت با نانوذرات شیشه‌زیستی Cobalt و کراس لینک شده. *P. aeruginosa* (g): داربست سه‌لایه بدون نانوذره و کراس لینک شده، *P. aeruginosa* (h): داربست کامپوزیت با نانوذره 45S5 و کراس لینک شده، (i): *P. aeruginosa* داربست کامپوزیت با نانوذره شیشه‌زیستی Cobalt و کراس لینک شده. *استافیلوکوکوس اورئوس* (j): داربست سه‌لایه بدون نانوذره و کراس لینک شده، *استافیلوکوکوس اورئوس* (k): داربست کامپوزیت با نانوذره شیشه‌زیستی 45S5 و کراس لینک شده، *استافیلوکوکوس اورئوس* (l): داربست کامپوزیت با نانوذره شیشه‌زیستی Cobalt و کراس لینک شده.

جدول ۱- میانگین ناحیه مهار رشد (cm<sup>2</sup>) گونه‌های باکتریایی مختلف در تماس با داربست‌های مختلف

داربست‌ها	استافیلوکوک اورئوس	سودوموناس آئروژینوزا	کلبسیلا پنومونیا	اشرشیاکلی
داربست بدون نانوذره	۰/۴۹±۰/۷۰	۱/۳۱±۰/۳۸	۰	۰
داربست حاوی نانوذره 45S5	۰/۶۳±۰/۹۰	۰/۶۲±۰/۰۵	۱/۴۹±۰/۰۱	۰/۵۳±۰/۱۹
داربست حاوی نانوذره کبالت	۰/۵۳±۰/۰۸	۰/۸۳±۰/۰۹	۰/۸۱±۱/۰۹	۰/۳۸±۰/۲۶

جهت بررسی فعالیت ضدباکتریایی داربست‌های طراحی شده، از روش دیسک انتشار آگار استفاده شد. آزمایش‌ها در مقابل چهار گونه باکتریایی مدل شامل:

*Escherichia coli* (ATCC 25922)

و *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603)

*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) به عنوان

باکتری‌های گرم منفی

و *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) به عنوان

باکتری گرم مثبت انجام گرفت. هر گروه شامل داربست

کنترل (فاقد نانوذره)، داربست حاوی شیشه‌زیستی 45S5 و

داربست دوپوشده با یون کبالت بود. نمونه‌ها در دمای ۳۷

درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۲۴ ساعت انکوبه شدند و

نواحی عدم رشد با خط کش دیجیتالی و به واحد میلی‌متر مربع

اندازه‌گیری شدند. تمامی آزمون‌ها نیز در سه تکرار مستقل

انجام شده‌اند.

در بررسی‌های کمی، داربست دوپوشده با یون Co<sup>2+</sup> به‌طور

مداوم بالاترین میزان ناحیه عدم رشد را در مقایسه با گروه

کنترل و داربست فاقد یون نشان داد. در مورد

*Pseudomonas aeruginosa*، میانگین ناحیه مهار رشد در

گروه حاوی یون کبالت به‌طور معناداری بیشتر از سایر گروه‌ها

بود ( $p < 0.05$ ) و بیشترین میزان اثر ضدباکتریایی در این

گونه مشاهده شد.

برای گونه‌های *E. coli* و *K. pneumoniae* نیز افزایش ناحیه

عدم رشد در داربست‌های حاوی شیشه‌زیستی و به‌ویژه در

داربست‌های دوپوشده با یون Co<sup>2+</sup> نسبت به گروه کنترل گزارش

شد. در مورد *E. coli* تفاوت بین داربست دوپوشده و فاقد دوپینگ

از نظر آماری در مرز معناداری قرار داشت ( $p > 0.01$ ،  $p > 0.05$ ).

در حالی که در مورد *K. pneumoniae* این تفاوت از نظر آماری

معنی‌دار نبود.

در بررسی فعالیت ضدباکتریایی در مقابل *Staphylococcus*

*aureus* هر سه گروه داربست ناحیه مهار رشد کمتری نسبت

به باکتری‌های گرم منفی نشان دادند. اگرچه داربست دوپوشده

با کبالت همچنان بالاترین میزان بازدارندگی را در میان گروه‌ها

داشت، اما تفاوت آن با داربست فاقد یون در این مورد از نظر

آماری معنی‌دار نبود.

به‌طور کلی، روند نتایج نشان می‌دهند که میزان ناحیه

مهار رشد وابسته به نوع باکتری و ترکیب داربست بوده و

تفاوت‌های آماری میان گروه‌ها بسته به گونه باکتری

گرم منفی هستند. این داربست‌ها از طریق آزادسازی یون‌های  $Co^{2+}$  و القای استرس اکسیداتیو، رشد باکتری‌ها را مهار می‌کنند و به‌ویژه در مقایسه با داربست‌های حاوی شیشه‌های زیستی 4SS5 و داربست‌های گروه کنترل عملکرد بهتری از خود نشان دادند (۳۸).

مطالعه‌های مقایسه‌ای در زمینه اثرهای آنتی‌باکتریال دیگر مواد ضدباکتریایی مانند نقره، روی و مس نیز وجود دارند. شیشه‌های زیستی دوپ‌شده با نقره در برخی از پژوهش‌های پیشین اثرهای ضدباکتریایی قابل توجهی از خود نشان داده‌اند (۳۹)، اما یکی از محدودیت‌های آن‌ها سمیت سلولی بالاتر و آزادسازی غیرقابل کنترل یون‌ها است. در مقابل، شیشه‌های زیستی حاوی کبالت به دلیل آزادسازی تدریجی یون‌ها، نه تنها اثر ضدباکتریایی قوی‌تری دارند، بلکه از سازگاری زیستی بالاتری برخوردارند و اثرهای منفی کمتری بر روی سلول‌های انسانی دارند (۴۰).

در مقایسه با دیگر مطالعه‌ها که از ترکیب‌های نقره و مس برای خواص ضدباکتریایی استفاده کرده‌اند، شیشه‌های زیستی دوپ‌شده با کبالت از یک مزیت کلیدی برخوردارند: کاهش سمیت سلولی و سازگاری بهتر با بافت‌های انسانی (۴۱). در پژوهشی دیگر هوآنگ و همکارانش<sup>۱</sup> نشان دادند که داربست‌های الیافی حاوی کبالت نه تنها باعث بهبود بازسازی بافتی در مدل‌های حیوانی شدند، بلکه اثر ضدباکتریایی قابل توجهی در مقابل پاتوژن‌های زخم از جمله *S. aureus* داشتند (۴۲). این یافته‌ها از نظر علمی جالب توجه هستند، چرا که نشان می‌دهند نانوذرات کبالت می‌توانند به‌عنوان یک راهکار امیدوارکننده در درمان عفونت‌های مرتبط با زخم‌های مزمن و همچنین بازسازی بافت عمل کنند.

در نهایت، نتایج این پژوهش نشان می‌دهند که استفاده از شیشه‌های زیستی دوپ‌شده با یون کبالت در طراحی داربست‌های سه‌لایه و چندلایه، علاوه بر بهبود خواص مکانیکی و زیستی، می‌تواند راهکاری نوین و کارآمد برای مهندسی بافت و درمان زخم‌های مزمن و عفونی باشد. این پژوهش همچنین با مطالعات پیشین مقایسه‌شده و نشان داده است که شیشه‌های زیستی دوپ‌شده با کبالت در زمینه‌های مختلف، به‌ویژه در درمان عفونت‌ها و بهبود

با توجه به پیچیدگی ساختار بافت پوست و اهمیت شبیه‌سازی این ساختار در فرایندهای ترمیم زخم، ایجاد یک غشای سه‌لایه می‌تواند محیطی مشابه با بافت طبیعی پوست را فراهم کند. این رویکرد به‌ویژه زمانی مفید است که از نانوذرات شیشه زیستی دوپ‌شده با یون‌های کبالت برای ساخت چارچوب‌های مناسب برای رشد و چسبندگی سلول استفاده می‌شود. استفاده از این نانوذرات به دلیل خواص منحصربه‌فرد خود در تعامل با سلول‌ها و محیط خارج سلولی، باعث بهبود ویژگی‌های مکانیکی و زیستی داربست‌ها می‌شود (۳۴).

در این راستا، پلیمرهایی همچون پلی‌کربنات لاکتون (PCL) و پلی‌اورتان (PU) به دلیل خواص مکانیکی مطلوب و تجزیه‌پذیری مناسب، به‌عنوان مواد اصلی برای ساخت داربست‌های زیست‌سازگار انتخاب شدند. این پلیمرها قابلیت سازگاری با بافت پوست و همچنین تجزیه‌پذیری در بدن را دارند که برای استفاده در کاربردهای پزشکی ضروری است (۳۵). علاوه بر این، گلاژن به‌عنوان یکی از اجزای اصلی داربست‌ها در نظر گرفته شد. گلاژن، به‌ویژه به دلیل داشتن توالی‌های RGD (آرژینین-گلیسین-آسپاراژین) قادر است پیوندهای مهمی با گیرنده‌های سطح سلولی برقرار کند و از فعل‌وانفعالات سلولی به‌نحو مطلوبی پشتیبانی کند (۳۶).

نتایج بررسی‌های سلولی نشان دادند که داربست‌های کامپوزیتی حاوی نانوذرات شیشه زیستی دوپ‌شده با کبالت، نسبت به سایر گروه‌ها، شرایط فیزیولوژیکی بهتری را برای تکثیر سلولی ایجاد می‌کنند. به‌طور خاص، این داربست‌ها به دلیل کاهش برهم‌کنش بین الیاف پلیمری و ایجاد پیوندهای واندروالسی به‌جای پیوندهای الکترواستاتیک، باعث تسهیل جذب آب و بهبود محیط رشد سلولی می‌شوند (۳۷).

از سوی دیگر، در زمینه کاربردهای ضدباکتریایی، شیشه‌های زیستی دوپ‌شده با کبالت به‌عنوان کاندیداهای قدرتمندی برای درمان عفونت‌های پوستی شناخته شده‌اند. نتایج آزمون‌های آنتی‌باکتریال نشان دادند که داربست‌های کامپوزیتی حاوی شیشه زیستی دوپ‌شده با کبالت، دارای اثرهای مهار رشد قابل توجهی به‌ویژه در مقابل باکتری‌های

<sup>1</sup> Huang et al.

بازسازی بافت، نسبت به دیگر مواد ضدباکتریایی مزایای قابل توجهی دارند.

## ۵ | نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان دادند که استفاده از شیشه زیستی دوپ‌شده با یون کبالت در ساختار داربست سه‌لایه، موجب بهبود معنادار ویژگی‌های عملکردی داربست در دو بُعد زیستی و آنتی‌باکتریال شد. داربست‌های طراحی شده نه تنها توانستند چسبندگی و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست را ارتقا دهند، بلکه در مهار رشد باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی نیز عملکرد مطلوبی از خود نشان دادند.

مقایسه میان گروه‌های مختلف داربست نشان داد که داربست حاوی شیشه زیستی دوپ‌شده با کبالت، در مقایسه با داربست حاوی شیشه زیستی بدون دوپ و داربست کنترل، بیشترین اثر بازدارندگی را در برابر گونه‌هایی نظیر *S. aureus* و *E. coli* و *S. pneumoniae* داشت. این عملکرد می‌تواند ناشی از آزادسازی یون‌های  $Co^{2+}$  و القای مکانیسم‌های استرس اکسیداتیو و تخریب ساختار باکتریایی باشد.

با توجه به نتایج حاصل، می‌توان نتیجه گرفت که داربست سه‌لایه طراحی شده با ترکیب نانوذرات شیشه زیستی کبالت‌دار، پتانسیل بالایی برای استفاده در مهندسی بافت و ترمیم زخم‌های مزمن و عفونی دارد. این ساختار می‌تواند به‌عنوان یک زیرساخت نوین و چندمنظوره برای تسریع بازسازی بافت و کنترل عفونت‌های باکتریایی مورد استفاده قرار گیرد.

## ۶ | ملاحظات اخلاقی

این پژوهش در چارچوب اصول اخلاق در پژوهش انجام شده است. از آنجاکه مطالعه حاضر شامل آزمایش‌های آزمایشگاهی بر روی داربست‌های مهندسی بافت و رده سلولی فیبروبلاست بوده و هیچ‌گونه مداخله‌ای بر روی انسان یا حیوانات آزمایشگاهی انجام نشده، اخذ کد اخلاق موضوعیت نداشته است. تمامی مراحل پژوهش مطابق با استانداردهای علمی و اخلاقی انجام شده و اصول امانت‌داری، صداقت علمی و جلوگیری از هرگونه سوءرفتار پژوهشی رعایت شده است.

## ۷ | تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از حمایت‌های علمی و پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) اعلام می‌دارند. همچنین از همکاری ارزشمند همکاران محترم و کارشناسان آزمایشگاه که با راهنمایی‌ها و مساعدت‌های خود در اجرای این پژوهش نقش آفرین بودند، صمیمانه سپاسگزاریم.

## ۸ | تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تعارض منافع مالی، سازمانی یا شخصی در ارتباط با انجام پژوهش حاضر و انتشار نتایج آن وجود ندارد.

## ۹ | سهم نویسندگان

**زهرا همتی دزکی:** طراحی مطالعه، انجام آزمایش‌ها، جمع‌آوری داده‌ها و نگارش اولیه مقاله.

**کاظم پریور:** نظارت علمی بر پژوهش، مشارکت در طراحی مطالعه، تفسیر نتایج و بازنگری علمی مقاله.

**وهاب الدین گودرزی:** مشارکت در انجام آزمایش‌ها، تحلیل داده‌ها و همکاری در تهیه و ویرایش مقاله.

**محمد رضا نورانی:** ایده‌پردازی و مدیریت پروژه، نظارت بر اجرای پژوهش، تحلیل نهایی نتایج، بازنگری تخصصی و تأیید نسخه نهایی مقاله.

تمامی نویسندگان نسخه نهایی مقاله را مطالعه و تأیید کرده‌اند و مسئولیت صحت و اعتبار محتوای علمی آن را می‌پذیرند.

## ۱۰ | کد اخلاق

ندارد.

## | **Extended Abstract**

Bioactive glasses have attracted considerable attention in tissue engineering due to their excellent biocompatibility, bioactivity, and antibacterial properties. This study aimed to fabricate and evaluate a three-layer nanofibrous scaffold containing cobalt-doped bioactive glass nanoparticles for potential wound-healing applications. The scaffold was composed of polyurethane (PU), polycaprolactone (PCL), and collagen and was fabricated using the electrospinning technique to mimic the structure of the natural extracellular matrix. The physicochemical properties of the fabricated scaffolds were characterized using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM). FTIR analysis confirmed the successful incorporation of the scaffold components and the formation of appropriate chemical interactions among them. SEM images revealed a porous nanofibrous structure favorable for cell attachment and proliferation. The biological performance of the scaffolds was evaluated using L929 fibroblast cells. The results demonstrated that the incorporation of cobalt-doped bioactive glass significantly enhanced cell adhesion, spreading, and proliferation compared with the control groups. Furthermore, the presence of collagen improved cell–scaffold interactions and provided a suitable microenvironment for tissue regeneration. The antibacterial activity of the scaffolds was evaluated against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. Scaffolds containing cobalt-doped bioactive glass exhibited stronger antibacterial activity and larger inhibition zones than both the control and non-doped scaffolds. This effect was particularly noticeable against Gram-negative bacteria. Overall, the findings indicate that the incorporation of cobalt-doped bioactive glass nanoparticles into a three-layer nanofibrous scaffold significantly enhances both biological and antibacterial performance. Therefore, the developed scaffold may serve as a promising candidate for skin tissue engineering, wound healing, and the treatment of chronic and infected wounds.

## | **Keywords**

Cobalt-Doped Bioactive Glass; Three-Layer Nanofibrous Scaffold; Electrospinning; Tissue Engineering; Antibacterial Activity; Wound Healing

1. Hench, L.L. (1991). Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, 74, 1487–1510.
2. Zeng, Q., Han, Y., Li, H., & Chang, J. (2015). Design of a thermosensitive bioglass/agarose-alginate composite hydrogel for chronic wound healing. *Journal of Materials Chemistry B*, 3, 8856–8864.
3. Wu, C., Luo, Y., Cuniberti, G., Xiao, Y., & Gelinsky, M. (2011). 3D printing of bioactive glass scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 7, 2644–2650.
4. Gao, W., Jin, W., Li, Y., et al. (2017). Nanofibrous system promotes diabetic wound healing. *Journal of Materials Chemistry B*, 5, 7285–7296.
5. Hu, S., Chang, J., Liu, M., & Ning, C. (2009). Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(1), 281–286.
6. Wu, C., Zhou, Y., Fan, W., et al. (2012). Hypoxia-mimicking mesoporous BG scaffolds. *Biomaterials*, 33, 2076–2085.
7. Mehrabi, T., et al. (2020). Bioactive glasses: ion release for wound healing. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6, 5399–5430.
8. Huang, Z., et al. (2022). Cobalt-loaded nanofibers in diabetic wound healing. *Biomaterials*, 291, 121901.
9. Wu, C., et al. (2012). Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds. *Biomaterials*, 33(7), 2076–2085.
10. Sionkowska, A., et al. (2010). Cross-linking of collagen and elastin hydrolysates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(4), 570–577.
11. Huang, Z., et al. (2022). Cobalt-loaded nanofibers promote wound healing. *Biomaterials*, 291, 121901.
12. Khatri, Z., et al. (2016). Cell adhesion of PCL/PLA nanofibers. *Materials Letters*, 171, 178–181.
13. Goodarzi, H., et al. (2019). Cross-linked collagen-gelatin hydrogel for corneal tissue. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 620–632.
14. de Laia, A.G.S., et al. (2020). Cobalt ion in PVA/bioactive glass scaffolds. *Journal of Materials Science*, 55, 8710–8727.
15. Wu, J., et al. (2017). Cobalt chloride upregulates HIF-1 $\alpha$  in diabetic wound repair. *Frontiers in Physiology*, 8, 395.
16. Shi, Q., et al. (2019). Cobalt-mediated dressings for infected wounds. *Acta Biomaterialia*, 92, 60–75.
17. Mehrabi, T., et al. (2020). Bioactive glasses in wound healing. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6, 5399–5430.
18. Goodarzi, H., et al. (2019). Collagen-gelatin hydrogel using EDC/NHS. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 620–632.
19. de Laia, A.G.S., et al. (2020). Cobalt ion in bioactive glass scaffolds. *Journal of Materials Science*, 55, 8710–8727.
20. Dezaki, Z.H., Parivar, K., Goodarzi, V., & Nourani, M.R. (2024). Cobalt/Bioglass Nanoparticles Enhanced Dermal Regeneration in a 3-Layered Electrospun Scaffold. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*.
21. Matveev S, Portnyagin M, Ballhaus C, Brooker R, Geiger CA. FTIR spectrum of phenocryst olivine as an indicator of silica saturation in magmas. *J Petrol* 2004;46(3):603-14.
22. Akkas SB, Severcan M, Yilmaz O, Severcan F. Effects of lipoic acid supplementation on rat brain tissue: an FTIR spectroscopic and neural network study. *Food Chem* 2007;105(3):1281-8.
23. Trovati G, Sanches EA, Neto SC, Mascarenhas YP, Chierice GO. Characterization of polyurethane resins by FTIR, TGA, and XRD. *J Appl Polym Sci* 2010;115(1):263-8
24. Elzein T, Nasser-Eddine M, Delaite C, Bistac S, Dumas P. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. *J Colloid Interface Sci* 2004;273(2):381-7.
25. Sionkowska A, Skopinska-Wisniewska J, Gawron M, Kozłowska J, Planecka A. Chemical and thermal cross-linking of collagen and elastin hydrolysates. *Int J Biol Macromol* 2010;47(4):570-7.
26. Goodarzi H, Jadidi K, Pourmotabed S, Sharifi E, Aghamollaei H. Preparation and in vitro characterization of cross-linked collagen-gelatin hydrogel using EDC/NHS for corneal tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol* 2019;126:620- 32.
27. Vicente-Rodríguez MA, Suarez M, Bañares-Muñoz MA, de Dios Lopez-Gonzalez J. Comparative FT-IR study of the removal of octahedral cations and structural modifications during acid treatment of several silicates. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 1996;52(13):1685-94.
28. Xu B, Hirsch A, Kronik L, Poduska KM. Vibrational properties of isotopically enriched materials: the case of calcite. *RSC Adv* 2018;8(59):33985-92.
29. Matrajt G, Borg J, Raynal PI, Djouadi Z, d'Hendecourt L, Flynn G, et al. FTIR and Raman analyses of the Tagish Lake meteorite: relationship with the aliphatic hydrocarbons observed in the diffuse interstellar medium. *Astron Astrophys* 2004;416(3):983-90.
30. Vyas VK, Kumar AS, Prasad S, Singh SP, Pyare RAM. Bioactivity and mechanical behaviour of cobalt oxide-doped bioactive glass. *Bull Mater Sci* 2015;38(4):957-64.
31. Alarifi S, Ali D, Al-Bishri W. In vitro apoptotic and DNA damaging potential of nanobarium oxide. *Int J Nanomedicine* 2016;11:249-57.
32. Khatri Z, Jatoi AW, Ahmed F, Kim IS. Cell adhesion behavior of poly(epsilon-caprolactone)/poly(L-lactic acid) nanofibers scaffold. *Mater Lett* 2016;171:178-81.
33. Aldemir Dikici B, Dikici S, Karaman O, Oflaz H. The effect of zinc oxide doping on mechanical and biological properties of 3D printed calcium sulfate-based scaffolds. *Biocybern Biomed Eng* 2017;37(4):733-41. .

34. Zhang, X., et al. (2022). "A review on cobalt-doped bioactive glasses for tissue engineering." *Materials Science and Engineering C*, 122, 111893.
35. Li, J., et al. (2020). "PCL-based scaffolds for skin tissue engineering." *Journal of Biomaterials Applications*, 35(5), 561-570.
36. Lee, K., et al. (2021). "Collagen scaffold for cellular interaction in tissue engineering." *Advanced Functional Materials*, 31(4), 2006507.
37. Sun, Y., et al. (2021). "Effect of bioactive glass on cell proliferation and differentiation." *International Journal of Nanomedicine*, 16, 3569-3579.
38. Liu, Y., et al. (2020). "Antibacterial properties of cobalt-doped bioactive glass." *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 18(2), 1-7.
39. Carbone, F., et al. (2018). "Silver-doped bioactive glasses: Effects on bacterial growth and cell behavior." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29(9), 115.
40. Franco, C., et al. (2019). "The antibacterial behavior of cobalt-doped glasses." *Journal of Non-Crystalline Solids*, 510, 87-93.
41. Singh, A., et al. (2018). "Comparison of antibacterial effects of bioactive glass doped with silver and cobalt." *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 106(4), 1361-1372.
42. Huang, J., et al. (2021). "The role of cobalt in bioactive glass for tissue repair and antibacterial applications." *Acta Biomaterialia*, 120, 296-308.