



Chitosan–Keratin Hydrogel Scaffolds Enriched with Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Extract: Physicochemical Properties and Antibacterial Effect

Safoora Mohammadpour¹, Zahra Rutivand Ghiyasvand², Maryam Besharati^{2*}

¹ Parshan Tos Azma Company, Mashhad health science and Technology Park-Bu Ali Research -Institute, Mashhad, Iran.

² Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Science, Kosar University of Bojnord, Bojnord, Iran.

Received: 2025/10/09

Accepted: 2025/12/10

Online Published: 2025/12/10

Abstract

In recent years, natural biopolymers have attracted growing attention for developing smart wound dressings to enhance tissue regeneration and prevent bacterial infections. In this study, hydrogel scaffolds based on chitosan and keratin were fabricated and reinforced with *Rosmarinus officinalis* (rosemary) extract at concentrations of 2.5% and 5%. The chemical and morphological properties were characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM). Physical tests including swelling ratio, water vapor transmission rate (WVTR), and biodegradation were performed, while antibacterial activity was evaluated to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. The results showed that rosemary incorporation improved hydrogen bonding, structural uniformity, and water vapor permeability (~2979 g/m²/24 h), while reducing degradation rate. Moreover, the extract exhibited the strongest antibacterial effect against *S. aureus* with an MIC value of 50 mg/mL. Overall, the chitosan–keratin–rosemary (5%) hydrogel demonstrated promising physicochemical stability and bioactivity, making it a potential bioactive wound dressing for infected wounds.

Keywords: Chitosan-keratin hydrogel, Rosemary extract, Bio-scaffold, Antibacterial activity, Wound healing

Cite this article: Mohammadpour S., Rotivan Ghiyasvand Z., Besharati M. Chitosan–Keratin Hydrogel Scaffolds Enriched with Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Extract: Physicochemical Properties and Antibacterial Effect. *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2025;2(2):47-57.

Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education

Corresponding author: Maryam Besharati



i@kub.ac.ir

داربست‌های هیدروژلی کیتوزان-کراتین غنی شده با عصاره رزماری (*Rosmarinus officinalis*): بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و اثر ضد باکتریایی

صفورا محمدپور^۱، زهرا روتیوند غیاثوند^۲، مریم بشارتی^{۲*}

^۱ شرکت پرشان توس آزما، پارک علم و فناوری سلامت مشهد، پژوهشکده بوعلی، مشهد، ایران.

^۲ گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه کوثر بجنورد، بجنورد، ایران.

دریافت: ۱۴۰۴/۸/۱۷ پذیرش: ۱۴۰۴/۹/۱۹ انتشار آنلاین: ۱۴۰۴/۹/۱۹

چکیده

در سال‌های اخیر، استفاده از زیست‌پلیمرهای طبیعی برای توسعه پانسمان‌های هوشمند زخم به منظور بهبود ترمیم بافت و جلوگیری از عفونت‌های باکتریایی مورد توجه گسترده‌ای قرار گرفته است. در این پژوهش، داربست‌های هیدروژلی بر پایه کیتوزان و کراتین حاوی عصاره گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ درصد تهیه شدند. سپس نمونه‌ها برای بررسی ساختار شیمیایی و مورفولوژی توسط طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمون‌های فیزیکی شامل اندازه‌گیری میزان تورم، عبور بخار آب (WVTR) و زیست‌تخریب‌پذیری، و آزمون ضد باکتریایی برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) در برابر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروجینوزا* انجام شد. نتایج نشان داد افزودن عصاره رزماری موجب تشکیل پیوندهای هیدروژنی، بهبود یکنواختی ساختار، افزایش عبور بخار آب (حدود ۲۴h، ۲۹۷۹g/mm²) و کاهش سرعت تخریب زیستی گردید. همچنین عصاره بیشترین اثر ضد باکتریایی را با مقدار MIC ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد. در مجموع، داربست کیتوزان-کراتین حاوی ۵ درصد عصاره رزماری با ویژگی‌های فیزیکی و زیستی مطلوب می‌تواند به عنوان پانسمانی زیست‌فعال و موثر برای ترمیم زخم‌های عفونی پیشنهاد شود.

کلمات کلیدی: هیدروژل کیتوزان-کراتین، عصاره رزماری، داربست زیستی، خاصیت ضد باکتریایی، ترمیم زخم

Cite this article: Mohammadpour S., Rotivan Ghiasvand Z., Besharati M. Chitosan-Keratin Hydrogel Scaffolds Enriched with Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Extract: Physicochemical Properties and Antibacterial Effect. *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2025;2(2):47-57.

Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education

Corresponding author: Maryam Besharati

Email: m.besharati@kub.ac.ir



مقدمه

درمان موثر زخم‌های پوستی همچنان یکی از چالش‌های اساسی در پزشکی ترمیمی محسوب می‌شود، زیرا عفونت‌های میکروبی، از دست رفتن رطوبت و التهاب مزمن می‌توانند روند بهبودی را به طور قابل توجهی به تاخیر بیاورند. پانسمان‌های سنتی نظیر گاز و باند خشک اگرچه نقش محافظ فیزیکی دارند، اما به دلیل ناتوانی در حفظ رطوبت مناسب، تبادل گاز و مهار رشد باکتری‌ها، کارایی محدودی در بهبود زخم دارند (۱). در سال‌های اخیر، طراحی داربست‌ها و هیدروژل‌های زیستی به‌عنوان نسل جدید پانسمان‌های فعال مورد توجه گسترده‌ای قرار گرفته است. این داربست‌ها با دارا بودن ویژگی‌هایی چون جذب رطوبت بالا، قابلیت عبور بخار آب، زیست سازگاری و خاصیت ضد باکتریایی، محیطی بهینه برای ترمیم زخم و جلوگیری از عفونت ایجاد می‌کنند (۲). در این میان، استفاده از بیوپلیمرهای طبیعی مانند کیتوزان و کراتین، به سبب زیست سازگاری بالا، زیست تخریب‌پذیری و خواص ضد باکتریایی ذاتی، جایگاه ویژه‌ای در تولید مواد ترمیمی یافته است (۱، ۳). کیتوزان، که از داستیلاسیون کیتین به دست می‌آید، به دلیل دارا بودن گروه‌های آمینی آزاد، توانایی تعامل با غشاهای سلولی و مولکول‌های زیستی را دارد و به‌عنوان داربستی برای ترمیم بافت‌های آسیب دیده استفاده شده است (۴). ویژگی ضد باکتریایی ذاتی کیتوزان نیز در مهار رشد میکروارگانیسم‌ها و کاهش التهاب در زخم‌ها به خوبی گزارش شده است (۲). در کنار آن، کراتین، به‌عنوان یک پروتئین فیبری طبیعی، نقش ساختاری مهمی در بافت‌های انسانی از جمله مو، ناخن و لایه شاخی پوست دارد. این پروتئین با دارا بودن اسیدهای آمینه حاوی گوگرد - به‌ویژه سیستئین - می‌تواند پیوندهای دی‌سولفیدی مستحکمی ایجاد کند که موجب افزایش مقاومت مکانیکی و پایداری داربست می‌شود (۵). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ترکیب کیتوزان و کراتین موجب بهبود انعطاف‌پذیری، افزایش تخلخل و ارتقای چسبندگی سلولی در داربست‌های زیستی می‌گردد (۶، ۷).

با توجه به افزایش مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی، استفاده از ترکیبات گیاهی با خواص ضد باکتریایی طبیعی به‌عنوان جایگزینی ایمن و مؤثر مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است (۸). در این راستا، گیاه *Rosmarinus officinalis* (رزماری) از خانواده نعناعیان به دلیل غنای ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و ترپنوئیدی خود، دارای اثرات

ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی قوی است (۹). ترکیبات فعال موجود در رزماری مانند اسید کارنوزیک، کارنوزول و اسید روزمارینیک، با ایجاد اختلال در غشای سلولی باکتری‌ها، موجب مهار رشد و از بین رفتن آن‌ها می‌شوند. علاوه بر این، خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه، از تخریب سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو جلوگیری کرده و فرآیند بازسازی بافتی را تسریع می‌نماید (۱۰). از این‌رو، افزودن عصاره رزماری به داربست‌های پلیمری می‌تواند ضمن افزایش پایداری شیمیایی و مکانیکی، خواص زیستی و ضد باکتریایی آن‌ها را ارتقاء دهد. داربست‌های زیستی غنی‌شده با ترکیبات گیاهی، نه تنها به عنوان بستر ترمیمی، بلکه به عنوان سیستم‌های رهایش کنترل‌شده ترکیبات فعال نیز ایفای نقش می‌کنند؛ این ویژگی‌ها سبب می‌شود که چنین داربست‌هایی در درمان زخم‌های عفونی و مزمن، از جمله زخم‌های دیابتی، کاربرد موثری داشته باشند (۱۱-۱۳).

اگرچه مطالعات متعددی در زمینه استفاده از پلیمرهای طبیعی در داربست‌های ترمیم زخم انجام شده است، اما بررسی هم‌زمان اثرات ترکیبی کیتوزان، کراتین و عصاره رزماری بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی داربست تاکنون کمتر مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف تهیه داربست‌های هیدروژلی بر پایه کیتوزان-کراتین و بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه رزماری بر ویژگی‌های ساختاری، فیزیکی و ضد باکتریایی آن‌ها طراحی شده است. اهمیت این پژوهش در آن است که با بهره‌گیری از مواد طبیعی و زیست‌سازگار، می‌توان داربستی تولید کرد که نه تنها به تسریع روند ترمیم بافت کمک می‌کند، بلکه با خاصیت ضد باکتریایی موثر خود از بروز عفونت در محل زخم نیز جلوگیری می‌کند. نتایج این تحقیق می‌تواند زمینه‌ساز توسعه پانسمان‌های هوشمند با ترکیب چندگانه زیست‌فعال باشد و گامی مؤثر در جهت ارتقای کیفیت زندگی بیماران مبتلا به زخم‌های مزمن و عفونی بردارد.

مواد و روش‌ها

مواد و سویه‌های باکتریایی مورد استفاده

کیتوزان با وزن مولکولی متوسط ۳۱۰-۱۹۰ کیلو دالتون و درجه داستیلاسیون < ۸۵ درصد از شرکت سیگما-آلدریج (سنت لوئیس، میزوری، ایالات متحده) تهیه شد. کراتین استخراج از پر مرغ از

سانتی‌گراد، فشار نیم (Torr) خشک و ساختار متخلخل نهایی به دست آمد. بازده سنتز $\approx 85\%$ درصد محاسبه گردید.

مشخصه یابی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)

طیف‌های FTIR (Nicolet iS50، ایالات متحده) در محدوده $4000-400$ بر سانتی‌متر، زاویه تابش 45° درجه ثبت شد. نمونه‌های خشک (5×5 میلی‌متر) مستقیماً بر کریستال سلنید روی قرار گرفتند. پس‌زمینه (هوا) قبل از هر نمونه ثبت و داده‌ها با نرم‌افزار OMNIC ۸.۳ (نسبت سیگنال به نویز > 100) پردازش گردید. پیک‌های کلیدی شامل ارتعاشات کششی O-H/N- ($3550-3000$ بر سانتی‌متر)، باندهای C-H آلیفاتیک/ معطر ($3000-2800$ بر سانتی‌متر)، گروه کربونیل آمیدی C=O ($1750-1630$ بر سانتی‌متر)، باندهای C=C آروماتیک ($1600-1500$ بر سانتی‌متر) و پیوندهای C-N ($1300-1200$ بر سانتی‌متر) بودند. جابه‌جایی (< 5 بر سانتی‌متر) و تغییرات شدت (< 20 درصد) به عنوان شاخص تعاملات هیدروژنی و تغییرات ساختار شیمیایی در نظر گرفته شد.

مشخصه یابی میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

نمونه‌ها ابتدا به مدت ۳ دقیقه با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شده، سپس در دمای محیط خشک گردیدند. پوشش دهی فلزی سطح نمونه‌ها با طلا، جریان ۳۰ میلی‌آمپر، ضخامت تقریبی ۱۵ نانومتر انجام شد. تصویربرداری با SEM (بزرگنمایی‌های ۵۰۰ تا $\times 5000$) انجام و تصاویر توسط نرم‌افزار Vega TC ثبت گردید. تحلیل مورفولوژی سطح و اندازه منافذ با استفاده از نرم‌افزار ImageJ صورت گرفت. درصد تخلخل از رابطه زیر محاسبه شد:

$$P (\%) = (\rho_{\text{bulk}} / \rho_{\text{true}} - 1)$$

که در آن ρ_{bulk} چگالی ظاهری و ρ_{true} چگالی واقعی ($1/3$ گرم بر سانتی‌متر مکعب برای کیتوزان) است.

آزمون تورم

دیسک‌های خشک (وزن اولیه W_0 ، ۱۰ میلی‌گرم) در ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل (pH ۷، ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرمخانه شیکردار، ۵۰ دور بر دقیقه) غوطه‌ور و وزن (Wt) در فواصل ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ ساعت پس از خشک‌کردن سطحی (کاغذ فیلتر واتمن شماره ۱) اندازه‌گیری شد. آزمون در سه تکرار و تحلیل واریانس یک طرفه برای مقایسه ($p < 0.05$) انجام شد.

Greentech Biochemicals Co., Limited خریداری شد. گیاه رزماری از دامنه‌های البرز شمالی (ایران) جمع‌آوری و توسط گیاه‌شناسان دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی شد. عصاره آن از برگ‌های خشک شده با روش ماکراسیون اتانولی (اتانول ۷۰ درصد نسبت ۱:۱۰ وزنی به حجمی، هم‌زدن ۱۰۰ دور در دقیقه، ۷۲ ساعت، ۲۵ درجه سانتی‌گراد)، فیلتراسیون واتمن شماره ۱، تبخیر روتاری (40° درجه سانتی‌گراد، ۱۰۰ میلی‌بار) و خشک‌سازی خلا انجام گرفت.

سایر معرف‌ها شامل اسید استیک گلیسال (مرک، آلمان)، سدیم هیدروکسید، کلرید سدیم (مرک)، بافر فسفات (pH ۷/۴، سیگما)، آنزیم لیپاز (نوع II پانکراس خوک)، دی‌متیل سولفوکسید (۹۹/۹ درصد، سیگما) و آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۲۵ میلی‌گرم بر دیسک) و جنتامایسین (۱۰ میلی‌گرم بر دیسک) (Mast Group، بریتانیا) بودند. سویه‌های باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923، *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli* ATCC 25922) و *سودوموناس آئروجینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 27853 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد.

سنتز داربست هیدروژلی

محلول ۲ درصد وزنی کیتوزان در اسید استیک ۱ درصد تهیه و به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق با همزن مغناطیسی مخلوط شد تا محلول شفاف حاصل شود. سپس محلول کراتین با نسبت وزنی ۲:۱ (کیتوزان: کراتین) به آن افزوده و مجدداً ۴ ساعت هم‌زده شد. برای حذف حباب و ذرات نامحلول، محلول به مدت ۲ دقیقه در 1500° دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید. عصاره رزماری با غلظت‌های ۲.۵ و ۵ درصد وزنی به محلول پایه افزوده و ۳ ساعت در دمای محیط هم زده شد. سپس مخلوط‌ها در پتری‌دیش‌های به قطر ۱.۵ سانتی‌متر ریخته و به مدت ۷۲ ساعت در دمای منفی 20° درجه سانتی‌گراد منجمد شدند.

جهت ایجاد اتصالات عرضی، نمونه‌ها در محلول ۴ درصد سدیم هیدروکسید در دمای 4° درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفتند و دو بار با آب مقطر شسته شدند. در این فرآیند، گروه‌های آمینی پروتون زدایی شده کیتوزان با گروه‌های کربوکسیل کراتین و گروه‌های هیدروکسیل وارد واکنش خنثی‌سازی و پیوند یونی ($-NH_3^+/-COO^-$) می‌شوند و موجب تشکیل شبکه سه‌بعدی پایدار می‌گردند. د در نهایت، داربست‌ها در فریزدرایر (منفی 60° درجه

برای ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی داربست‌های کیتوزان-کراتین حاوی عصاره رزماری، آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) در برابر سه گونه باکتری بیماری‌زا شامل برای *استافیلوکوکوس اورئوس* (گرم مثبت)، *شریشیا کلی* و *سودوموناس آئروجینوزا* (گرم منفی) انجام شد. برای انجام آزمون، در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه، ۹۰ میکرولیتر از محیط مولر هینتون براث (MHB)، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (حدود 10^6 CFU/mL) و ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (۱۰۰-۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) افزوده شد. پس از گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، رشد باکتری‌ها از طریق بررسی کدورت و جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر ارزیابی شد. حداقل غلظتی که مانع از رشد قابل مشاهده باکتری شد، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. کنترل مثبت (باکتری+ محیط) و منفی (عصاره+ محیط) استفاده شد. تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام گردید. برای تعیین MBC، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک‌های فاقد رشد بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، غلظتی که در آن هیچ کلونی مشاهده نشد به عنوان MBC گزارش گردید.

تحلیل آماری

آزمون‌ها در سه تکرار مستقل ($n=3$) انجام و داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد. نرمال بودن با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف ($\alpha=0.05$) بررسی و ANOVA یک طرفه با آزمون توکی (نرم‌افزار SAS ۹.۴) برای مقایسه گروه‌ها استفاده گردید. در صورت غیر نرمال بودن، آزمون کروسکال-والیس استفاده شد. سطح معنی‌داری ($p<0.05$) در نظر گرفته شد.

نتایج

مشخصه‌یابی FTIR و SEM

طیف‌های FTIR (شکل ۱) حضور باندهای مشخصه کیتوزان و کراتین را تایید کردند؛ به طوری که پیک گسترده O-H/N-H در ناحیه ۳۱۵۰-۳۵۴۲ بر سانتی‌متر، باندهای C-H الیفاتیک در ۲۹۲۶ و ۲۸۶۲ بر سانتی‌متر و پیک کربونیل C=O در ۱۶۳۲ بر سانتی‌متر مشاهده شد. باندهای آروماتیک C=C در ۱۵۸۴ و ۱۴۸۳ بر سانتی‌متر و باند C=N در ۱۲۴۵ بر سانتی‌متر نیز مشخص شدند که به ساختار پروتئینی کراتین و گروه‌های آمینی کیتوزان نسبت داده می‌شوند.

میزان جذب آب یا نرخ تورم (SW) نمونه‌ها از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$SW = (WS - W_0) / W_0$$

در این فرمول W_0 وزن نمونه‌ها در حالت خشک و W_s وزن نمونه‌ها پس از جذب آب می‌باشد.

آزمون عبور بخار آب (WVTR)

طبق استاندارد ASTM E96 فیلم‌های هیدروژل (قطر ۲/۵ سانتی‌متر) بر دهانه لوله شیشه‌ای (قطر ۲ سانتی‌متر، حاوی ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر) قرار گرفته، سپس مهر و موم شده و در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت نسبی ۴۰ درصد گذاشته شدند. کاهش وزن (ΔW)، گرم (در ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت با ترازوی تحلیلی اندازه‌گیری و طبق فرمول زیر محاسبه شد (A) سطح دهانه لوله، و t زمان می‌باشد). از کنترل بدون فیلم برای مقایسه و تعیین شاخص نهایی میزان عبور بخار آب از نمونه استفاده شد.

$$WVTR (g/m^2 \cdot h) = (\Delta W / A \times t) \times 106$$

بررسی زیست تخریب پذیری

به منظور تعیین نرخ تخریب وزنی (WL%)، قطعاتی از هیدروژل-های کیتوزان-کراتین با ابعاد تقریبی 1×1 سانتی‌متر مربع تهیه شدند. نمونه‌ها پس از توزین اولیه (W_i) در لوله فالکون حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات سالین (PBS)، pH ۷/۴ قرار داده شدند و در گرمخانه CO_2 با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا شرایط فیزیولوژیک شبیه‌سازی شود. در فواصل زمانی مشخص (تا ۷ روز)، نمونه‌ها از محلول خارج، با آب مقطر شسته و به مدت ۲ ساعت در آون با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. پس از خشک شدن کامل، وزن نهایی نمونه‌ها (W_f) ثبت گردید. میزان کاهش وزن نمونه‌ها به عنوان شاخصی از تخریب زیستی، با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

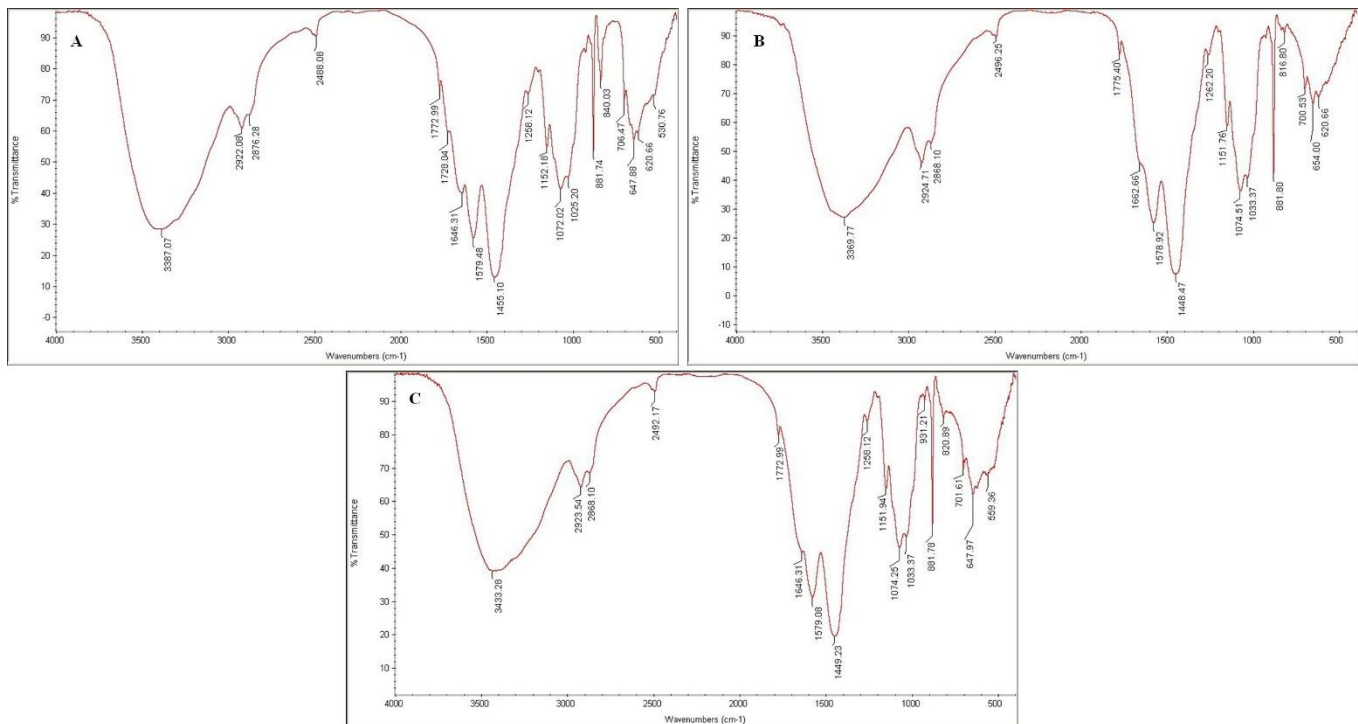
$$WL(\%) = ((W_i - W_f) / W_i) \times 100$$

در این رابطه، W_i وزن خشک اولیه و W_f وزن خشک نهایی نمونه پس از دوره تخریب است. افزایش درصد WL بیانگر نرخ بالاتر تخریب زیستی در نمونه می‌باشد.

آزمون‌های ضد میکروبی

درصد عصاره بیانگر ادغام موفق ترکیبات فنلی در ماتریس هیدروژل بود. این تغییرات طیفی به‌طور کلی تاییدکننده تعامل شیمیایی و پراکندگی یکنواخت عصاره در ساختار کیتوزان-کراتین است.

با افزودن عصاره رزماری، جابه‌جایی باند O-H به ۳۳۹۸ بر سانتی‌متر و کاهش شدت جذب N-H از ۰/۸ به ۰/۶ مشاهده شد که نشانگر تشکیل پیوندهای هیدروژنی میان ترکیبات فنلی رزماری و گروه‌های آمینی کیتوزان است. همچنین، ظهور باند جدید C=C آروماتیک در ۱۵۸۴ بر سانتی‌متر در نمونه حاوی ۵



شکل ۱. طیف‌های FTIR نمونه‌های مختلف هیدروژل کیتوزان-کراتین: (A) نمونه حاوی ۵ درصد عصاره رزماری، (B) نمونه حاوی ۲/۵ درصد عصاره رزماری، و (C) نمونه شاهد بدون عصاره.

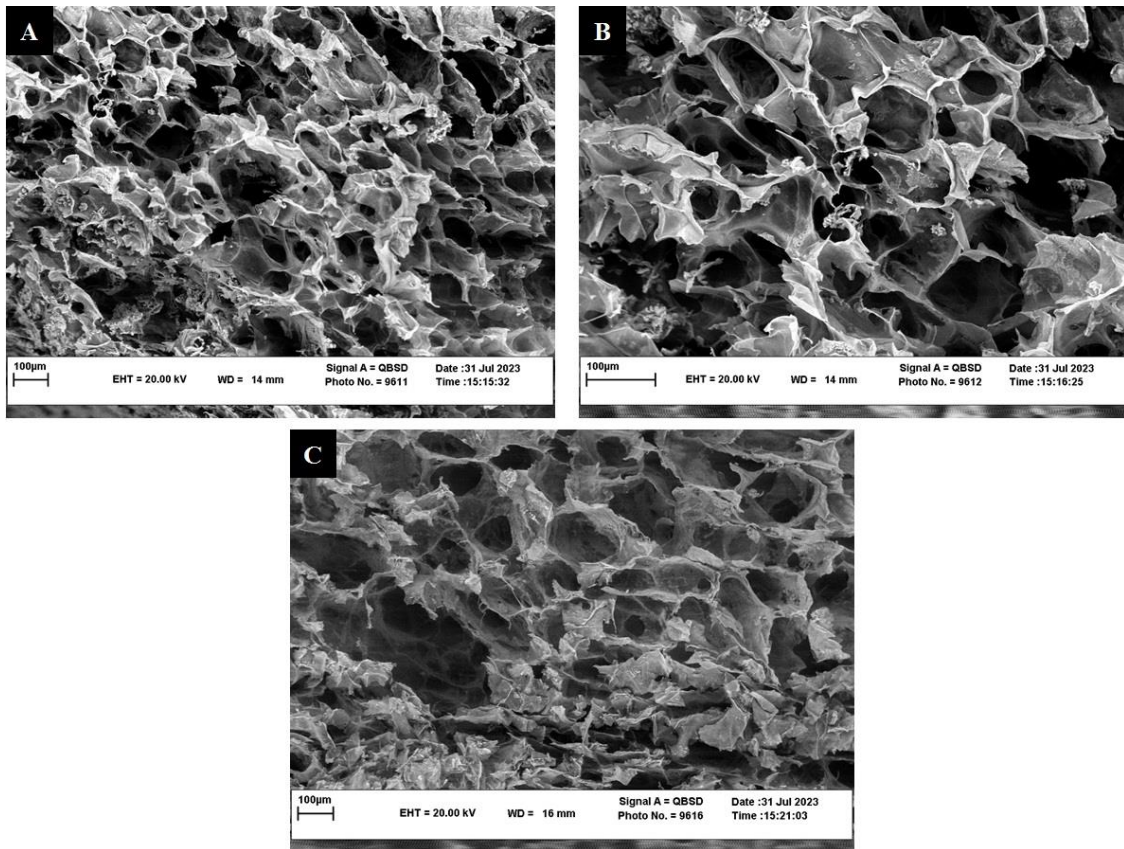
Figure 1. FTIR spectra of chitosan-keratin hydrogel scaffolds: (A) sample with 5% rosemary extract, (B) sample with 2.5% rosemary extract, and (C) control sample without extract.

رزماری (A) بود، در حالی که سایر نمونه‌ها جذب تقریباً مشابهی نشان دادند. کاهش تورم در نمونه‌های حاوی عصاره رزماری می‌تواند ناشی از حضور ترکیبات فنولی با خاصیت نسبتاً آب‌گریز باشد که با گروه‌های آمینی کیتوزان پیوندهای هیدروژنی قوی‌تری ایجاد کرده و از نفوذ آب به شبکه جلوگیری می‌کنند. در مجموع، افزایش درصد عصاره رزماری موجب کاهش سرعت و میزان تورم شد. این رفتار نشان‌دهنده پایداری بالاتر و کاهش جذب آب در نمونه‌های حاوی عصاره است که می‌تواند برای کاربردهای زخم‌های ترش‌خونی مفید باشد.

تصاویر SEM (شکل ۲) ساختار متخلخل همگن را آشکار کرد. گروه C حفرات نامنظم (۲۰۰-۴۰۰ نانومتر، تخلخل 75 ± 3 درصد) با سطح ناهموار ۵۰ نانومتری داشت. گروه B تخلخل را به 2 ± 80 درصد افزایش داد، حفرات ۲۵۰ نانومتری، توزیع گاوسی برابر با ۳۰ نانومتر و گروه A بهینه‌ترین میزان تخلخل (85 ± 2 درصد)، همگنی (۳۰۰ نانومتر) و با توزیع گاوسی برابر با ۲۰ نانومتر بود، که برای نفوذ سلولی کراتینوسیت‌ها، با قطر ۱۰-۲۰ میکرومتر مناسب است.

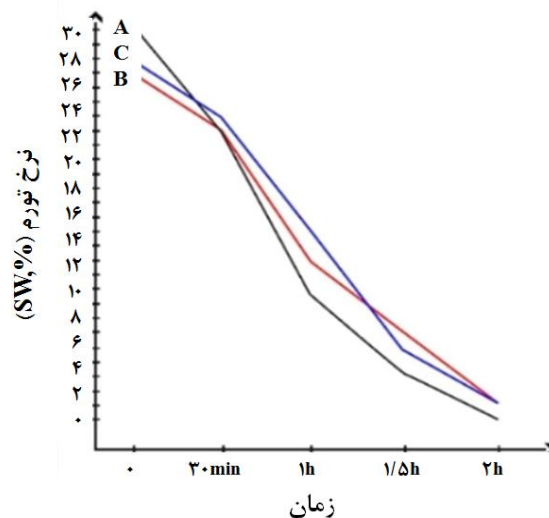
رفتار تورم هیدروژل

نتایج آزمون تورم (شکل ۳) نشان داد که تمام نمونه‌های هیدروژل در دقایق ابتدایی پس از قرارگیری در بافر فسفات (۳۷ درجه سانتی‌گراد) افزایش وزن سریعی داشتند. در یک ساعت نخست، میزان جذب کاهش یافت و در پایان مدت آزمون (۲ ساعت)، کمترین میزان جذب مربوط به نمونه حاوی ۵ درصد عصاره



شکل ۲. تصاویر SEM از سطح داربست‌های هیدروژلی کیتوزان-کراتین: (A) نمونه حاوی ۵ درصد عصاره رزماری، (B) نمونه حاوی ۲/۵ درصد عصاره رزماری، و (C) نمونه شاهد بدون عصاره.

Figure 2. SEM images of the surface of chitosan-keratin hydrogel scaffolds: (A) sample with 5% rosemary extract, (B) sample with 2.5% rosemary extract, and (C) control sample without extract.



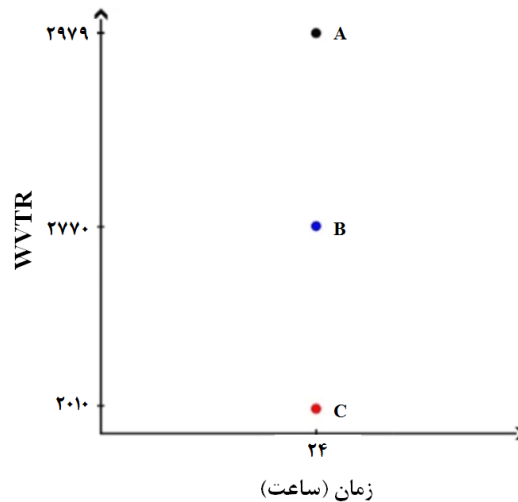
شکل ۳. منحنی‌های رفتار تورم داربست‌های هیدروژلی در بافر فسفات (۳۷ درجه سانتی‌گراد) طی ۲ ساعت: (A) نمونه حاوی ۵ درصد عصاره رزماری، (B) نمونه حاوی ۲/۵ درصد عصاره رزماری، و (C) نمونه شاهد بدون عصاره.

Figure 3. Swelling behavior of chitosan-keratin hydrogels in PBS buffer (37°C) over 2 hours: (A) sample with 5% rosemary extract, (B) sample with 2.5% rosemary extract, and (C) control sample without extract.

نرخ انتقال بخار آب (WVTR)

هیدروژل با ۲/۵ درصد عصاره رزماری (۲۴h، ۲۷۷۰g/m²) در حد متوسط قرار داشت. این مقادیر نشان‌دهنده نفوذپذیری مناسب بخار آب و توانایی حفظ تعادل رطوبتی هیدروژل است و برای کاربردهایی که نیاز به تبادل رطوبت کنترل‌شده دارند، مطلوب می‌باشد.

بررسی عبور بخار آب نشان داد که WVTR با افزایش درصد عصاره رزماری در هیدروژل افزایش می‌یابد (شکل ۴). بیشترین میزان عبور بخار آب مربوط به هیدروژل کیتوزان-کراتین با ۵ درصد عصاره رزماری (۲۴h، ۲۹۷۹g/m²) و کمترین آن مربوط به هیدروژل بدون عصاره (۲۴h، ۲۰۱۰g/m²) بود، در حالی که



شکل ۴. نرخ عبور بخار آب (WVTR) داربست‌های هیدروژلی طی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (میانگین \pm SD، n=۳): (A) نمونه حاوی ۵ درصد عصاره رزماری، (B) نمونه حاوی ۲/۵ درصد عصاره رزماری، و (C) نمونه شاهد بدون عصاره.

Figure 4. Water vapor transmission rate (WVTR) of chitosan-keratin hydrogels after 24 h at 37°C: (A) sample with 5% rosemary extract, (B) sample with 2.5% rosemary extract, and (C) control sample without extract.

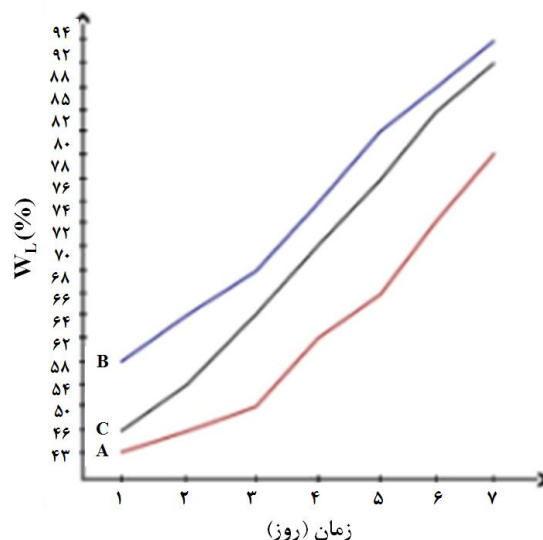
در کوتاه مدت می‌شود. در نتیجه، استفاده از عصاره گیاهی به‌عنوان عامل تقویت‌کننده می‌تواند راهکاری موثر برای افزایش دوام هیدروژل‌های زیستی در کاربردهای مهندسی بافت باشد.

آزمون ضد میکروبی

نتایج حاصل از آزمون MIC و MBC نشان داد که عصاره رزماری دارای اثر مهارتی قابل ملاحظه‌ای در برابر باکتری‌های هدف داشت. مقادیر MIC و MBC برای *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب برابر با ۵۰ و ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. برای *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروجینوزا*، غلظت مهارکنندگی در ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و غلظت باکتری‌کشی در ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

تجزیه زیستی

نتایج آزمون زیست تخریب‌پذیری (شکل ۵) نشان داد که کاهش جرم هیدروژل‌ها در سه روز نخست کمتر از ۵ درصد بوده و بیانگر مرحله اولیه کند (lag phase) است. پس از روز سوم، روند کاهش جرم به صورت نسبتاً خطی ادامه یافت. بیشترین میزان تخریب مربوط به نمونه بدون عصاره رزماری (C) و کمترین میزان مربوط به نمونه حاوی ۵ درصد عصاره رزماری (A) بود. کاهش سرعت تخریب در حضور عصاره رزماری به احتمال زیاد ناشی از وجود ترکیبات فنولی پایدارکننده است که با گروه‌های آمینی کیتوزان پیوند هیدروژنی ایجاد کرده و نفوذ آنزیم‌های تجزیه‌کننده را محدود می‌کنند. این نتایج نشان می‌دهد که افزودن عصاره رزماری موجب بهبود پایداری شبکه و کاهش زیست‌تخریب‌پذیری



شکل ۵. تجزیه زیستی (%) داربست‌های هیدروژلی در مدت زمان ۷ روز (میانگین \pm SD, n=3): (A) نمونه حاوی ۵٪ عصاره رزماری، (B) نمونه حاوی ۲٫۵٪ عصاره رزماری، و (C) نمونه شاهد بدون عصاره.

Figure 5. Biodegradation (%) of hydrogel scaffolds over a 7-day period: (A) sample with 5% rosemary extract, (B) sample with 2.5% rosemary extract, and (C) control sample without extract.

ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵). در مطالعه‌ای نانوفیبرهای مبتنی بر کیتوزان- پلی‌آمید حاوی عصاره رزماری فعالیت ضد باکتریایی علیه *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داده است (۱۷).

در زمینه زیست تخریب پذیری، یافته حاضر نشان داد افزایش درصد عصاره رزماری نرخ تخریب را کاهش می‌دهد که با نتایج مشاهده شده در داربست‌های کیتوزان-کراتین/نانوذرات ZnO مطابقت دارد؛ همچنین افزودن عامل ضد میکروبی باعث کاهش سرعت تخریب و حفظ ساختار داربست شد (۷). افزایش عبور بخار آب (WVTR) نیز با افزودن عصاره مشاهده شد و مقدار آن در محدوده بهینه گزارش شده برای پانسمان‌های ترمیم زخم (حدود ۳۰۰۰-۱۵۰۰ g/m²/day) قرار گرفت (۱۸). این ویژگی، نشان‌دهنده توانایی داربست در حفظ رطوبت مناسب برای فرآیند ترمیم زخم و تبادل موثر بخار آب است. از دیدگاه ساختاری، تصاویر SEM نشان دادند که ساختار متخلخل داربست‌های حاوی عصاره دارای تخلخل بهینه ۸۵ درصد می‌باشد. همچنین، طیف سنجی FTIR تعاملات هیدروژنی بین گروه‌های آمینی ماتریس و ترکیبات فنولی عصاره را تایید نمود. کاهش میزان تورم در

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که افزودن عصاره *Rosmarinus officinalis* به داربست‌های مبتنی بر کیتوزان-کراتین منجر به بهبود عملکرد ضد باکتریایی، کاهش نرخ تخریب زیستی و افزایش عبور بخار آب گردید. به طور کلی، حساسیت *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به عصاره رزماری بالاتر بود که به ساختار دیواره سلولی ساده‌تر و نفوذپذیری بیشتر آن نسبت داده می‌شود. در مقابل، باکتری‌های گرم منفی با وجود غشای خارجی مقاوم‌تر، در غلظت‌های بالاتر مهار شدند. این نتایج با یافته‌های پیشین در خصوص اثر ترکیبات فنولی (رزمارینیک اسید و کارنوزیک اسید) بر باکتری‌های گرم مثبت مطابقت دارد و نشان می‌دهد که عصاره رزماری می‌تواند به عنوان ترکیب طبیعی موثر در طراحی داربست‌های زیستی و پانسمان‌های ضد باکتریایی مورد استفاده قرار گیرد (۱۴، ۱۵). در مطالعه‌های دیگر بر روی هیدروژل ژلاتین-کیتوزان خاصیت ضد باکتریایی قوی علیه *استریپتوکوکوس موتانس* گزارش شده است (۱۶). همچنین، ترکیب کیتوزان با عصاره‌های گیاهی در پژوهش‌های پیشین جهت افزایش فعالیت

سطح مولکولی، این داربست با تقلید از ساختار ماتریکس خارج سلولی (ECM) موجب تحریک مهاجرت کراتینوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها و تنظیم بیان ژن‌ها می‌شود، مشابه مکانیسمی که در سایر هیدروژل‌های کیتوزان گزارش شده است (۲۱).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که داربست کیتوزان-کراتین حاوی ۵ درصد عصاره رزماری یک گزینه بسیار امیدبخش برای کاربرد به عنوان پانسمان زیستی در ترمیم زخم‌های عفونی و مزمن است. این داربست با ترکیب ویژگی‌های ضد باکتریایی و رطوبت‌ساز، عملکردی فراتر از هیدروژل‌های سنتی ارائه می‌دهد. با این حال، محدودیت اصلی پژوهش حاضر عدم بررسی عملکرد در مدل‌های حیوانی و ارزیابی رهایش کنترل شده ترکیبات فنولی است. لذا پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی، آزمایش‌های *in vivo* (بخصوص در مدل‌های دیابتی)، آزمون‌های سمیت سلولی، آنالیز رهایش و بررسی پروفایل زیستی کامل جهت تایید کارایی بالینی انجام گیرد. همچنین، بهینه‌سازی نسبت‌های پلیمر یا ادغام نانوحامل‌ها برای رهایش هدفمند رزماری و بررسی زیست تخریب پذیری در مدت زمان طولانی‌تر (۲۱ روز) و در حضور آنزیم‌هایی مانند لیزوزیم که شرایط *in vivo* را شبیه‌سازی می‌کنند می‌تواند اثربخشی را بیشتر کند.

نمونه‌های حاوی عصاره (به‌ویژه گروه A) همراه با افزایش WVTR ناشی از تغییر ساختار شبکه است. ترکیبات فنولی رزماری با گروه‌های آمینی کیتوزان پیوند هیدروژنی برقرار کرده و باعث کاهش ظرفیت جذب آب آزاد می‌شوند، اما از سوی دیگر موجب ایجاد کانال‌های میکروسکوپی در ماتریس می‌شوند که مسیرهای انتشار بخار را تسهیل می‌کند. در نتیجه، گرچه جذب کل کاهش یافته، تبادل بخار به‌صورت موثرتر انجام می‌شود.

از نظر عملکرد زیستی، هیدروژل کیتوزان-کراتین علاوه بر حفظ رطوبت و نفوذپذیری اکسیژن، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی قابل توجهی نیز دارد. این ویژگی‌ها منجر به تسریع مراحل تکثیر سلولی و بازسازی بافت می‌شود. نرخ بسته شدن زخم در مدل‌های حیوانی برای فیلم‌های کیتوزان-کراتین تا ۷۱ درصد پس از ۲۴ روز گزارش شده است، در حالی که ترکیب حاضر با دارا بودن WVTR بهینه و MIC پایین، پتانسیل بالاتری برای کاربرد در زخم‌های دیابتی و عفونی دارد (۱۹). به طور مشابه، هیدروژل‌های چندکاره کیتوزان در پژوهش‌های اخیر توانسته‌اند با حذف باکتری‌ها و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، فرآیند ترمیم را تسریع کنند. همچنین، نانوحامل‌های مبتنی بر کیتوزان اخیرا اثرات آنتی‌اکسیدانی بالایی در ترمیم زخم نشان داده‌اند که همراه با نتایج کاهش تجزیه زیستی در مطالعه حاضر می‌تواند پایداری را برای کاربردهای طولانی مدت تضمین کند (۲۰).

از منظر مکانیسمی، کاهش سرعت تخریب با افزایش عصاره رزماری می‌تواند ناشی از پیوندهای هیدروژنی قوی‌تر میان گروه‌های آمینی ماتریس و ترکیبات فنولی باشد که موجب محدودیت دسترسی آنزیم‌های تجزیه‌کننده به ساختار داربست می‌شود. در

References

- Boateng, J. and O. Catanzano, Advanced therapeutic dressings for effective wound healing—a review. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2015. 104(11): p. 3653-3680. doi 10.1002/jps.24562 .
- Feng, P., et al., Chitosan-based functional materials for skin wound repair: Mechanisms and applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021. 9: p. 650598. doi: 10.3389/fbioe.2021.650598.
- Tan, H.B., et al., Fabrication and evaluation of porous keratin/chitosan (KCS) scaffolds for effectively accelerating wound healing. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2015. 28(3): p. 178-189. doi: 10.3967/bes2015.024 .
- Dai, T., et al., Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert review of anti-infective therapy*, 2011. 9(7): p. 857-879. DOI: 10.1586/eri.11.53.
- Aadil, K.R., et al., Keratin nanofibers in tissue engineering: Bridging nature and innovation. *Biotechnology for Sustainable Materials*, 2024. 1(1): p. 19. doi: 10.1007/s44172-024-00019-7.
- Wang, Y.-m., et al., Keratin/chitosan film promotes wound healing in rats with combined radiation-wound injury. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2025. 36(1): p. 15. doi: 10.1007/s10856-024-06915-3
- Zhai, M., et al., Keratin-chitosan/n-ZnO nanocomposite hydrogel for antimicrobial treatment of burn wound healing: Characterization and biomedical application. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2018. 180: p. 253-258. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.02.017.
- AlSheikh, H.M.A., et al., Plant-based phytochemicals as possible alternative to antibiotics in combating bacterial drug resistance. *Antibiotics*, 2020. 9(8): p. 480. doi: 10.3390/antibiotics9080480

9. Li Pomi, F., et al., *Rosmarinus officinalis* and skin: antioxidant activity and possible therapeutical role in cutaneous diseases. *Antioxidants*, 2023. 12(3): p. 680. doi: 10.3390/antiox12030680
10. González-Minero, F.J., L. Bravo-Díaz, and A. Ayala-Gómez, *Rosmarinus officinalis* L.(Rosemary): An ancient plant with uses in personal healthcare and cosmetics. *Cosmetics*, 2020. 7(4): p. 77. doi: 10.3390/cosmetics7040077 .
11. Xu, J., et al., The applications and mechanisms of *Rosmarinus officinalis* L. in the management of different wounds and UV-irradiated skin. *Frontiers in Pharmacology*, 2025. 15: p. 1461790. doi: 10.3389/fphar.2024.1461790
12. Cuellar-Gaona, C., et al., Enhancing biocompatibility and antimicrobial efficacy through plasma technology modification of chitosan/*Rosmarinus officinalis* hydrogels. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 2023. 23(1): p. 1-29. doi: 10.24275/rmiq/Pol2372.
13. Parastar, M. and A.A. Merati, Fabrication and characterization of polycaprolactone/chitosan/rosemary composite nanofibrous layers. *The Journal of The Textile Institute*, 2025. 116(8): p. 1583-1593. doi: 10.1080/00405000.2024.2345678
14. Nieto, G., G. Ros, and J. Castillo, Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A review. *Medicines*, 2018. 5(3): p. 98. doi: 10.3390/medicines5030098.
15. Gavan, A., et al., Development and evaluation of hydrogel wound dressings loaded with herbal extracts. *Processes*, 2022. 10(2): p. 242. doi: 10.3390/pr10020242.
16. Flores-Espinoza, A.I., et al., Gelatin–chitosan hydrogel biological, antimicrobial and mechanical properties for dental applications. *Biomimetics*, 2023. 8(8): p. 575. doi: 10.3390/biomimetics8080575
17. Fard, G.C., et al., Novel polyamide/chitosan nanofibers containing glucose oxidase and rosemary extract: fabrication and antimicrobial functionality. *Coatings*, 2024. 14(4): p. 411. doi: 10.3390/coatings14040411
18. Xu, R., et al., Controlled water vapor transmission rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction enhancement. *Scientific reports*, 2016. 6(1): p. 24596. doi: 10.1038/srep24596.
19. Colobatiu, L., et al., Evaluation of bioactive compounds-loaded chitosan films as a novel and potential diabetic wound dressing material. *Reactive and Functional Polymers*, 2019. 145: p. 104369. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104369.
20. Yang, Y., et al., Chitosan nanocarriers containing essential oils as a green strategy to improve the functional properties of chitosan: A review. *International journal of biological macromolecules*, 2023. 236: p. 123954. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123954.
21. Molaei, R., A. Hosseinkhani, and M. Saberian, Molecular Regulation of Tissue Remodeling Through Chitosan-Based Hydrogels in Wound Healing Dynamics. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2025. doi: 10.1089/ten.teb.2024.0123.