



ساخت و بررسی خواص فیزیکی و بیولوژیکی داربست‌های بر پایه هیدروکسی اتیل سلولز/هیالورونیک اسید مورد استفاده در ترمیم زخم‌های سوختگی درجه دوم سطحی

عاطفه درخشانی^۱، سعید حصارکی^{۱*}، نادر نظافتی^۱، محمود اعظمی^۲

^۱ پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، مشکین دشت، البرز، ایران

^۲ گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۳۹۹/۰۱/۲۴

دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۹/۰۸/۱۹

پذیرش قطعی: ۱۳۹۹/۱۲/۱۴

کلیدواژه‌ها:

هیدروکسی اتیل سلولز،
هیالورونیک اسید،
ژلاتین،
زخم سوختگی،
داربست

چکیده هدف از این مطالعه، تهیه داربست‌هایی بر پایه هیدروکسی اتیل سلولز/هیالورونیک اسید، با و بدون حضور ژلاتین و مقایسه آنها، برای ترمیم زخم‌های سوختگی درجه دو سطحی است. داربست‌ها، از محلول آبی پلیمرهای ذکر شده و به روش خشک کردن انجمادی، تهیه شدند. بررسی ریزساختاری با میکروسکوپ الکترونی روبشی، نشانگر میانگین اندازه حفرات ۱۲۰ و ۹۸ میکرومتر، به ترتیب برای داربست‌های فاقد ژلاتین و دارای ژلاتین بود. براساس نتایج رئولوژی، در تمامی نمونه‌ها، همواره مقدار مدول اتلاف، بیشتر از مدول ذخیره بود و محلول‌های تهیه شده، جریان پذیر بودند. تمامی نمونه‌ها، در بسامدهای کم، دارای رفتار رقیق برشی و در بسامدهای بالاتر از 10^1 s⁻¹، رفتار عکس، از خود نشان دادند. با افزودن ژلاتین، اندازه هر دو مدول اتلاف و ذخیره، افزایش یافت. آزمون جذب مایع و کاهش وزن نمونه‌ها، توانایی زیاد داربست‌ها را در میزان جذب تا بالای ۳۰۰۰ درصد، نشان داد. افزودن ژلاتین، موجب افزایش زمان فروپاشی شبکه، تا ۲ ساعت و کاهش نرخ تخریب داربست‌ها شد. آزمون سمیت سلولی، نشانگر زنده‌مانی بیش از ۸۰ درصد سلول‌های فیبروبلاست مجاور نمونه‌ها (در مقایسه با نمونه‌های کنترل) بود؛ ضمن اینکه حضور ژلاتین، بر فعالیت متابولیسی سلول‌ها، تأثیر مثبت داشت و موجب افزایش سرعت تکثیر سلول‌ها شد. نتایج آزمون خراش، توانایی داربست‌ها را در افزایش سرعت مهاجرت سلولی، نسبت به نمونه کنترل، نشان داد. داربست هیدروکسی اتیل سلولز/هیالورونیک اسید/ژلاتین، به علت حضور ژلاتین و تأثیر آن در افزایش بیشتر سرعت مهاجرت سلول‌ها که نشانگر شکل‌گیری سریع بافت پوششی اپی تلیوم بود، انقباض زخم را طی ۲۴ ساعت، به ۷۳ درصد رساند.

<https://doi.org/10.30501/jamt.2021.226575.1086>

URL: http://www.jamt.ir/article_127692.html

JAMT: Vol. 9, No. 4, (Winter 2021), 35-46

Fabrication and Evaluation of Physical and Biological Properties of Hydroxyethyl Cellulose/Hyaluronic Acid-Based Scaffolds Used for Second-Degree (Partial-Thickness) Burns Wounds Healing

Atefeh Derakhshani¹, Saeed Hesaraki^{1*}, Nader Nezafati¹, Mahmoud Azami²

¹ Department of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center (MERC), MeshkinDasht, Alborz, Iran

² Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Tehran, Iran

*عهده دار مکاتبات

نشانی: ایران، البرز، مشکین دشت، پژوهشگاه مواد و انرژی، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، تلفن: ۰۲۶-۳۶۲۸۰۰۴۱، دورنگار: ۰۲۶-۳۶۲۰۱۸۸۸

پیام نگار: hesaraki@merc.ac.ir

Please cite this article as: Derakhshani, A., Hesaraki, S., Nezafati, N., Azami, M., "Fabrication and evaluation of physical and biological properties of hydroxyethyl cellulose/hyaluronic acid-based scaffolds used for second-degree (partial-thickness) burns wounds healing", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 9, No. 4, (2021), 35-46. (<https://doi.org/10.30501/jamt.2021.226575.1086>).

2783-0829/© 2021 The Author(s). Published by MERC. This is an open access article under the CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Paper History:

Received: 2020-04-12

Revised in revised form: 2020-11-09

Accepted: 2021-03-04

Keywords:Hydroxyethyl Cellulose,
Hyaluronic Acid,
Gelatin,
Burn Wound,
Scaffold

Abstract The purpose of this study was to prepare and compare a hydroxyethyl cellulose/hyaluronic acid (HEC/HA)-based scaffold with and without gelatin for the treatment of second-degree partial-thickness burns. The scaffolds were prepared by freeze-drying method from the aqueous solutions of the mentioned polymers. Microstructural examination by scanning electron microscopy (SEM) indicated the average pore size of 120 and 98 μm for the gelatin-free and gelatin-containing scaffolds, respectively. According to the dynamic rheology measurements (DMA), all the solutions were flowable in which, the loss modulus was higher than the storage one. Moreover, the solutions revealed shear-thinning behaviour at low frequencies, which changed to shear thickening at frequencies higher than 100 s^{-1} . Both loss and storage modulus increased by adding gelatin to the polymer solutions. The scaffolds water uptake was up to 3,000 %. The addition of gelatin to the HA/HEC solution increased the polymer network collapse up to 2 hours and led to reducing the scaffolds degradation rate. Cytotoxicity assay in the presence of the scaffolds showed that more than 80 % of the fibroblast cells were viable (compared to the control group), meanwhile, the presence of gelatin had a positive effect on the metabolic activity of the cells and increased the rate of cell proliferation. Scratch test results showed the ability of scaffolds to increase the cell migration rate compared to the control sample. The hydroxyethyl cellulose/hyaluronic acid/gelatin scaffold due to the presence of gelatin and improved the cell migration, which indicating the rapid re-epithelialization, reduced wound contraction to 73 % within 24 hours.

<https://doi.org/10.30501/jamt.2021.226575.1086>

URL: http://www.jamt.ir/article_127692.html

۱- مقدمه

سریع بافت پوششی اپی تلیوم^۹ (Re-Epithelialization)، مانع از تشکیل بافت اسکار (جوشگاه) و یا کاهش شکل گیری آن خواهد شد [۹].

هیدروژلها، شبکه‌های سه‌بعدی پایداری هستند که به واسطه ساختارهایی با تخلخل بالا، توانایی جذب حجم قابل-توجهی از مایعات را دارند [۱۰]. بدین ترتیب، این ساختار، محیط مرطوبی را فراهم می‌کند تا سرعت روند ترمیم زخم را افزایش دهد. ساختار بی‌همتای هیدروژلها، مشابه زمینه خارج سلولی^{۱۰} است که از تکثیر و مهاجرت سلولها، پشتیبانی کرده [۱۱] و همچنین، ظرفیت بالایی در جذب ترشحات زخم دارد [۱۲]. این ساختارهای متخلخل، در پلیمرها، با ایجاد اتصالات عرضی، به دو صورت فیزیکی و شیمیایی، ایجاد می‌شوند. اتصال عرضی فیزیکی، براساس برهم‌کنش‌های غیرکوالانت بین زنجیره‌های درشت مولکول، مانند پیوندهای هیدروژنی، الکترواستاتیک، نیروهای واندروالس و پیوندهای آب‌گریز، ایجاد می‌شود که ضعیف بوده، اما برگشت پذیر است. در مقابل، اتصالات عرضی شیمیایی، پایداری مکانیکی را برای دوره زمانی طولانی‌تری فراهم می‌کند که برای ایمپلنت‌های داخل بدن انسان، مناسب است [۱۰ و ۱۳].

روش‌های متعددی، برای ساخت داربست‌های متخلخل از هیدروژلها، وجود دارد که از جمله آنها، می‌توان به خشک-کردن انجمادی، اشاره کرد. به این ترتیب که فضای اشغال شده به وسیله حلال در داربست، پس از خروج مایع یا حلال منجمد، موجب ایجاد حفرات می‌شود [۱۴].

به طور کلی، داربست‌های اسفنجی شکل تهیه شده از

پوست، بزرگ‌ترین عضو بدن مهره‌داران است که سراسر آن را در بر گرفته و در محافظت از بدن، در برابر عوامل آسیب-رسان خارجی، نقش کلیدی ایفاء می‌کند [۱]. از بین رفتن یکپارچگی پوست یا هر بافت دیگری، زخم نامیده می‌شود که می‌تواند بر اثر ضربه^۱ یا بیماریها، ایجاد شود. زخم‌های سوختگی، از شایع‌ترین جراحات هاست که همچنان، به عنوان یک مشکل جهانی در حوزه سلامت، به شمار می‌رود [۲]. زخم‌های سوختگی، برحسب عمق جراحات، به سه گروه درجه اول، دوم و سوم، دسته‌بندی می‌شوند که زخم سوختگی درجه دوم، خود به دو گروه سوختگی درجه دو سطحی^۲ و عمقی^۳، تقسیم می‌شود [۳]. ترمیم زخم، روندی پویاست که از چندین گام، تشکیل شده که در نهایت، ساختار سلولی و بافت ناحیه مجروح را به حالت اولیه، باز می‌گرداند. این دوره درمانی، ممکن است برای زخم سوختگی درجه دو سطحی، تا دو هفته به طول بیانجامد [۴ و ۵]. در روش نوین سیستم‌های مدیریت زخم، محیط مرطوب، یکی از مهم‌ترین عوامل، برای دستیابی به ترمیم سریع است [۶]. این شرایط، حذف بافت نکروز^۴ و فیبرین^۵ را تسریع می‌کند و همچنین، مهاجرت سلولهای اپیدرم^۶، رگ‌زایی، سنتز کلاژن^۷ [۷] و تقسیم سلولی فیبروبلاست^۸ را افزایش می‌دهد [۸]. در نهایت، ترمیم و تشکیل

¹ Trauma

² Superficial-Partial Thickness

³ Deep-Partial Thickness

⁴ Necrosis

⁵ Fibrin

⁶ Epidermis

⁷ Collagen

⁸ Fibroblast

⁹ Epithelium

¹⁰ Extracellular Matrix

در میان دیگر پلیمرها، هیالورونیک اسید^۷ (HA)، یک پلی ساکارید طبیعی است که به دلیل خواص مطلوبی، نظیر جذب بالای مایع برای مرطوب نگه داشتن زخم، تحریک مهاجرت سلولی، رگ‌زایی و کاهش التهاب، به‌طور گسترده‌ای در کاربردهای ترمیم زخم، مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر این، تکثیر فیبروبلاست‌ها و ترشح کلاژن در محل زخم را افزایش می‌دهد؛ بنابراین، افزودن هیالورونیک اسید، جذب آب، انعطاف‌پذیری و زیست‌سازگاری داربست تهیه‌شده را افزایش می‌دهد؛ اما محدودیت‌های استفاده از این پلیمر، قیمت بالا و خواص مکانیکی ضعیف، به‌شمار می‌روند [۲۳].

ژلاتین^۸ (G)، پلیمر طبیعی است که از هیدرولیز کلاژن، تهیه می‌شود و به سبب زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و قیمت مناسب، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. ژلاتین، علاوه بر توانایی بند آوردن خون^۹، خاصیت آنتی‌ژنی نیز دارد [۲۰].

گاما-گلاسیسیدوکسی پروپیل تری متوکسی سیلان^{۱۰} (GPTMS)، عامل اتصال‌دهنده عرضی زیست‌سازگاری است که پیوند شیمیایی میان ماتریس‌های معدنی و آلی را توسط واکنش سل-ژل، ایجاد می‌کند. واکنش سل-ژل بر پایه عاملیت سیلان، سیلانول (Si-OH)، آماده واکنش بسپارش تراکمی برای رسیدن به پیوندهای (Si-O-Si) سیلوکسان است [۲۴]. تاکنون، از این عامل، برای تهیه داربست‌های کیتوسان، آلژینات، ژلاتین و سلولز، استفاده شده است [۲۸-۲۵].

در مطالعه‌ای، واکنش بین اپوکسی و گروه عاملی هیدروکسیل موجود در هیالورونیک اسید، بررسی شده است. به این ترتیب که با افزودن GPTMS، به‌عنوان عامل اتصال‌دهنده عرضی ثانویه، در شرایط بازی، نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های طیف‌بینی رزونانس مغناطیسی هسته به روش پروتون^{۱۱} (HNMR) و طیف‌نگاری فوتوالکترون پرتوی ایکس^{۱۲} (XPS)، نشان داد که با تشکیل پیوند از سمت حلقه اپوکسی و هیدروکسیل و از طرف دیگر، ایجاد پیوندهای

خشک‌کردن انجمادی هیدروژل‌ها، به چهار گروه، تقسیم می‌شوند:

- ۱) مورد اول، بدون تخلخل^۱، بدون هیچ ساختار متخلخل.
- ۲) مورد دوم، میکرومتخلخل^۲، با اندازه تخلخل متغیر و ساختار بسته، با ابعادی بین ۰/۱-۰/۱ میکرومتر.
- ۳) مورد سوم، ماکرومتخلخل^۳ با اندازه تخلخل متغیر و ساختار بسته، با ابعاد ۱-۰/۱ میکرومتر [۱۵].
- ۴) مورد چهارم، اُبرمتخلخل^۴، با ابعادی تا چند صد میکرومتر که به هم پیوسته بوده و یک نظام کانالی باز را تشکیل می‌دهد [۱۶]. این ساختار متخلخل، به‌عنوان کانال‌هایی برای جذب آب، عمل می‌کند؛ در نتیجه، داربست‌ها، توانایی جذب آب زیادی دارند که منجر به افزایش میزان تورم آن‌ها، درحین جذب ترشحات زخم خواهد شد [۱۷].

ویژگی‌های ایده‌آل یک داربست برای مهندسی بافت پوست، استحکام مکانیکی، زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و رهایش قابل‌کنترل داروها و مواد بیولوژیکی است. طی چندین دهه، از پلیمرهای طبیعی، نظیر کلاژن، هیالورونان، کیتوسان، آلژینات^۵، الاستین، فیبرین و ابریشم، برای ساخت این داربست‌ها، استفاده شده است. این پلیمرها، زیست-تخریب‌پذیر بوده؛ شبیه به زمینه خارج سلولی هستند و از چسبندگی سلولی، پشتیبانی می‌کنند [۲۰-۱۸]. داربست‌های کامپوزیتی تشکیل‌شده از چند پلیمر طبیعی و یا ترکیب آنها با پلیمرهای سنتزی، جهت بهبود خواص شیمیایی، فیزیکی، مکانیکی و بیولوژیکی، طراحی و ساخته می‌شوند.

هیدروکسی اتیل سلولز^۶ (HEC) که از مشتقات سلولز است، یک پلیمر محلول در آب و غیریونی است که دارای لینک بتاگلوکز است و برای کاربردهای مهندسی بافت، مناسب به نظر می‌رسد؛ این پلیمر، به‌تازگی، در تهیه داربست‌های پوستی و زخم‌پوش‌ها، برای ترمیم زخم نیز، مورد استفاده قرار گرفته است [۱۸، ۲۱ و ۲۲].

⁷ Hyaluronic Acid

⁸ Gelatin

⁹ Hemostatic

¹⁰ γ -Glycidoxypropyltrimethoxysilane

¹¹ Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

¹² X-Ray Photoelectron Spectroscopy

¹ Non-Porous

² Micro-Porous

³ Macro-Porous

⁴ Super-Porous

⁵ Alginate

⁶ Hydroxyethyl Cellulose

هیدروکسی اتیل سلولز (HEC)، به صورت پودری (شرکت سیگما، شماره ۴۳۴۹۸۱)، هیالورونیک اسید (HA)، به صورت پودری (شرکت کیتوتک، وزن مولکولی $10^6 \times 1/2$ دالتون)، ژلاتین (G) پودری (مرک، شماره ۱۰۴۰۷۰) و GPTMS (مرک، شماره ۴۴۰۱۶۷)، تهیه شدند. آب دیونیزه نیز، به عنوان حلال، مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- روش ساخت داربست‌ها

برای تهیه داربست HEC/HA با نسبت وزنی ۳۰:۷۰، محلول‌های آبی ۲ درصد وزنی از این دو ماده، تهیه شدند (جدول ۱). برای دستیابی به یک محلول شفاف و همگن از مخلوط مورد نظر، به مدت یک شبانه‌روز، با همزن مغناطیسی، در دمای ۶۰ درجه سلسیوس، هم‌زده شد. سپس، GPTMS، به مقدار ۱۰ درصد وزنی مجموع پلیمرها، به مخلوط، افزوده و هم‌زدن، به مدت ۴۸ ساعت، با دمای ۶۰ درجه سلسیوس و سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه، انجام شد.

سنتز، با روش مشابه داربست قبلی، برای تهیه داربست HEC/HA/G، با نسبت وزنی ۱۰:۳۰:۶۰، انجام شد؛ با این تفاوت که ابتدا ژلاتین، به آب دیونیزه، اضافه شد و سپس، دو پلیمر دیگر، به ترتیب، افزوده شدند. هیدروژل‌های تهیه‌شده، در پتری دیش‌های به قطر ۶ سانتی‌متر، تا ارتفاع ۴ میلی‌متر، ریخته شد و برای حباب‌زدایی، یک شبانه‌روز، در یخچال، نگهداری شدند. هیدروژل‌ها، به مدت ۴۸ ساعت، به ترتیب در دماهای ۲۰- و ۸۰- درجه سلسیوس، به‌طور کامل، منجمد شدند. سپس، در دستگاه خشک‌کن انجمادی (Pishtaz equipment - Eng - ایران)، با دمای ۵۷- درجه سلسیوس و فشار ۰/۵ تور (Torr)، تحت خلأ، قرار گرفتند تا بلورهای یخ، در داخل نمونه‌ها، تصعید شد و ساختاری متخلخل، پدید آمد.

جدول ۱. کد داربست‌ها و درصد وزنی پلیمرهای آن‌ها (w/w)

G	HA	HEC	کد
۰	۳۰	۷۰	HEC70-HA30
۱۰	۳۰	۶۰	HEC60-HA30-G
۱۰	۳۰	۶۰	HEC60-HA30-G بدون GPTMS
GPTMS (۱۰ w/w) - زمان شبکه ای شدن ۴۸ ساعت			

سیلوکسان در هیدروژل تهیه‌شده از هیالورونیک اسید و او۴ بوتان دیول دی گلایسیدال اتر^۱ (BDDE)، خواص مکانیکی، افزایش و نرخ زیست‌تخریب‌پذیری آن، کاهش یافته است. همچنین، با بازشدن یک حلقه اپوکسی و تشکیل سیلانول، ۴ گروه آلدوست OH نیز، ایجاد می‌شود که سبب آلدوستی بیشتر سیستم خواهد شد [۲۴]. در دیگر مطالعات، پیوند متشکل از GPTMS و گروه هیدروکسیل مربوط به هیدروکسی اتیل سلولز و هیدروکسی پروپیل سلولز^۲ (HPMC)، بررسی شده است [۲۹-۳۱]. طبق مطالعات طیف‌سنجی فرورسرخ^۳ کیتوسان و GPTMS، جذب فرورسرخ جدید مربوط به پیوندهای Si-OH، Si-O-Si، Si-O-C، در ۹۲۰، ۱۱۰۰-۱۰۰۰ و 1150 cm^{-1} مشاهده شد. اما پیوندهای نام‌برده، در نتایج طیف‌سنجی فرورسرخ دو پلیمر HEC و HPMC، با GPTMS، به دلیل جذب قوی در این طیف بسامدی و یا نسبت کم سیلان‌شدن، مشاهده نشد. در مطالعه‌ای دیگر، داربست HEC/HA، با اتصال‌دهنده عرضی دی‌وینیل سولفون^۴ (DVS)، در نسبت‌های مختلف، تهیه و نمونه HEC/HA، با نسبت ۲۰:۸۰، انتخاب شد [۱۸]. از آنجاکه هیالورونیک اسید، زیست‌ماده‌ای گران محسوب می‌شود، حضور ۸۰ درصد وزنی از آن در داربست، از نکات منفی آن به حساب می‌آید.

هدف از این مطالعه، تهیه داربستی با ترکیب دو پلیمر HEC و HA، در مقادیر بهینه و تشکیل پیوند HA با GPTMS بود. سپس، برای بهبود خواصی نظیر کاهش وزن، با کاهش HEC، از ژلاتین، استفاده شد؛ چراکه گروه‌های آمینی موجود در آن، به دلیل هسته‌دوستی بیشتر و خنثی‌بودن شرایط نمونه‌های تهیه‌شده، تمایل زیادی به ایجاد پیوند با گروه اپوکسی عامل اتصال‌دهنده عرضی دارند و بدین‌ترتیب، داربست، ساختار پایدارتری خواهد داشت که متعاقباً در نرخ کاهش وزن و میزان جذب مایع، تأثیرگذار خواهد بود.

۲- روش تحقیق

۲-۱- مواد

¹ 1,4-Butanediol Diglycidyl Ether

² Hydroxypropyl Cellulose

³ Infrared Spectroscopy

⁴ Divinyl Sulfone

۲-۳- ویژگی‌های داربست‌های تهیه شده

برای مطالعه ریخت‌شناسی داربست‌های تهیه شده، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM، Tescan، جمهوری چک) و برای اندازه‌گیری قطر تخلخل داربست‌ها، از نرم‌افزار Image J استفاده شد.

سنجش ویژگی‌های ویسکوالاستیک هیدروژل‌های تهیه شده، در حالت دینامیک، با استفاده از رئومتر (physica MCR 301، Anton Paar، ساخت اتریش)، انجام شد. اندازه‌گیری، در حالت کرنش متغیر، با بسامد و دمای ثابت، صورت گرفت تا بیشترین حد کرنش ناحیه ویسکوالاستیک خطی، به دست آید. منحنی ویسکوزیته مختلط، نسبت به بسامد زاویه‌ای، به‌طور هم‌زمان، به دست می‌آید.

رفتار جذب داربست‌های تهیه‌شده توسط خشک‌کردن انجمادی، با غوطه‌وری در محلول بافری فسفات سالین^۱ (PBS)، با pH برابر ۷/۴، در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، در فواصل زمانی معین، تا ۲۴ ساعت، اندازه‌گیری شد. به این منظور، وزن خشک نمونه‌ها، محاسبه شد و داربست‌ها، بعد از هر دوره زمانی، از محلول، خارج شد و رطوبتشان، با کاغذ خشک‌کن، گرفته شد تا مایع اضافه آنها، حذف شود. سپس، توزین شدند. میزان جذب مایع، با استفاده از معادله ۱، محاسبه شد:

$$\frac{W_w - W_d}{W_d} \times 100 = \text{درصد جذب مایع} \quad (1)$$

W_d و W_w ، به ترتیب وزن مرطوب و خشک نمونه است.

جهت اندازه‌گیری سرعت کاهش وزن داربست‌ها، در محیط برون‌تنی^۲، از آزمون کاهش وزن، استفاده شد. بدین صورت که ابتدا نمونه‌های خشک، توزین و در محلول PBS، غوطه‌ور شد. نمونه‌ها، در بازه زمانی موردنظر، از محلول، خارج شد و در دمای محیط، خشک شد و وزن آنها، اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که محلول داربست‌ها، در بازه‌های زمانی مشخص شده، تعویض شد. سپس، میزان کاهش وزن داربست‌ها در بازه زمانی موردنظر، با استفاده از معادله ۲، محاسبه شد:

$$\frac{W_0 - W_f}{W_0} \times 100 = \text{درصد کاهش وزن} \quad (2)$$

W_0 و W_f ، به ترتیب وزن اولیه و وزن نمونه خشک‌شده پس از غوطه‌وری است.

آزمون سمیت سلولی رنگ‌سنجی (MTT)، با استفاده از سلول‌های فیبروبلاست موشی L929 (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران)، طی زمان‌های ۶ ساعت، ۱، ۳ و ۶ روز، برای مطالعه تکثیر سلولی، روی داربست‌های تهیه شده، انجام شد.

آزمون خراش^۳، توسط سلول‌های فیبروبلاست موشی L929، جهت مطالعه مهاجرت سلولی نیز، انجام شد. سلول‌های L929، در محفظه کشت ۱۲ خانه‌ای، به تعداد 5×10^4 سلول در هر خانه، کشت شدند. محیط کشت، بعد از انکوبه‌شدن، در ۳۷ درجه سلسیوس، به مدت ۲۴ ساعت، تعویض شد. پس از به هم پیوستن سلول‌ها و رسیدن به تراکم ۹۰ درصد، با استفاده از میکروپیپت ۱۰۰ میکرولیتر، یک خراش، ایجاد شد. سپس، برای زدودن سلول‌های مرده، شست‌وشو با PBS، انجام شد. نمونه‌ها، پس از استریل با اشعه ماوراءبنفش، در چاهک‌ها، قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت، انکوبه شدند. سپس، نمونه‌ها در بازه زمانی موردنظر، با میکروسکوپ نوری، مشاهده شدند. آزمون، مشابه قسمت‌های قبل، با ۳ بار تکرار انجام شد. انقباض زخم، با استفاده از تصاویر به دست آمده و محاسبه با نرم‌افزار ImageJ، طبق معادله ۳، محاسبه شد:

$$\frac{W_{d0} - W_{dt}}{W_{d0}} \times 100 = \text{درصد انقباض زخم} \quad (3)$$

W_{d0} ، فاصله بین مرزهای زخم، بلافاصله بعد از ایجاد خراش و W_{dt} ، فاصله بین دو مرز زخم تماس داده شده با داربست، پس از بازه زمانی موردنظر است.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ریخت‌شناسی

برای مشاهده تأثیر ژلاتین بر ریزساختار داربست، یک نمونه ژلاتین و GPTMS نیز، تهیه و تصاویر میکروسکوپی آن، مورد مطالعه قرار گرفت. همان‌گونه که از نتایج ریخت‌شناسی

¹ Phosphate Buffer Saline

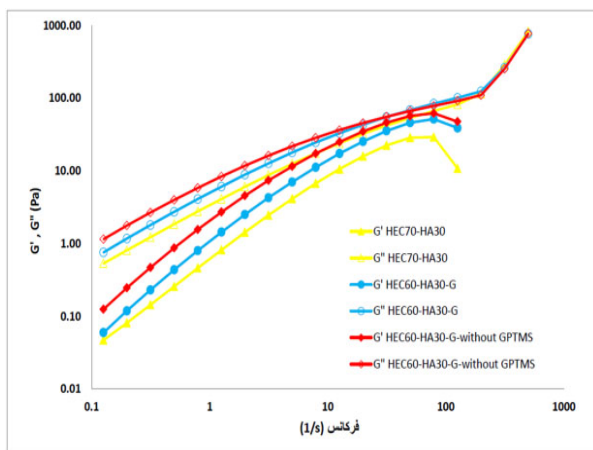
² In-Vitro

³ Scratch-Wound Assay

اتصال عرضی شده با کربو دی‌ایمید (EDC)، معادل ۴۰۰-۱۰۰ میکرومتر [۲۰]، HA/G/کندروایتین سولفات، مقدار ۱۵۰-۷۵ میکرومتر [۳۲] و اندازه تخلخل داربست تهیه شده از HA/HEC با اتصال‌دهنده عرضی دی‌وینیل سولفون، ۹۰-۵۰ میکرومتر است [۱۸]. طبق نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات اخیر، اندازه حفرات بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ میکرومتر، ابعاد مناسبی، جهت جای‌گیری سلول‌ها، رگ‌زایی و نفوذ بافت به درون داربست است [۳۳]. مقایسه نتایج این پژوهش و مطالعات ذکر شده، نشانگر مناسب بودن ابعاد حفرات داربست‌های تهیه‌شده است.

۳-۲- ویژگی‌های رئولوژی

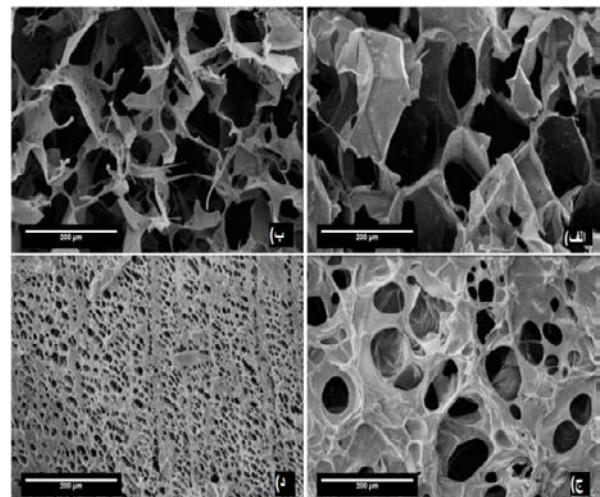
رئولوژی دینامیک، رفتار ویسکوالاستیک مواد را تحت نیروی نوسانی، بررسی می‌کند. در این آزمون، دامنه نوسان تنش یا کرنش ورودی، ثابت نگه داشته می‌شود، درحالی‌که بسامد، افزایش می‌یابد. آزمون روبش بسامد، به‌منظور بررسی اثر افزودنی‌های مختلف و اثر فرایندهای مختلف بر تغییر رفتار ویسکوالاستیک مواد، به‌کار می‌رود. مدول ذخیره (G')، نشان‌دهنده بخش الاستیک و مدول اتلاف (G'')، نشان‌دهنده بخش ویسکوز هیدروژل است.



شکل ۲. مدول ذخیره و مدول اتلاف نمونه‌ها برحسب بسامد زاویه‌ای

مدول ذخیره و مدول اتلاف هیدروژل‌های تهیه شده، برحسب بسامد زاویه‌ای، در شکل ۲، نشان داده شده‌اند. در تمامی نمونه‌ها، مقدار مدول اتلاف، همواره بیشتر از مدول ذخیره است و هیچ نقطه تلاقی، مشاهده نمی‌شود که مشخص می‌کند در این نمونه‌ها، بخش ویسکوز، غالب و محلول‌ها،

در شکل ۱ مشاهده می‌شود، تمامی نمونه‌ها، به‌جز نمونه HEC60-HA30-G بدون GPTMS، دارای ساختارهای متخلخل به‌هم‌پیوسته هستند. در میان آنها، اندازه تخلخل‌های درشت نمونه‌های HEC70-HA30 و HEC60-HA30-G، حداکثر ۲۰۰ میکرومتر است و لذا در زمره داربست‌های آبرمتخلخل، قرار می‌گیرند. همان‌گونه که از شکل ۱ مشخص است، داربست (الف) HEC70-HA30، دارای حفرات بزرگ‌تری، نسبت به نمونه حاوی ژلاتین (ب) HEC60-HA30-G است. به‌نظر می‌رسد کوچک‌تر شدن تخلخل‌های داربست، به‌علت تشکیل پیوند ژلاتین با GPTMS و همچنین، حضور گروه‌های اسیدآمینه آن در میان زنجیره‌های پلی‌ساکارید است. این مطلب، از بررسی ریزساختار داربست ژلاتینی شبکه‌ای شده با GPTMS، قابل مشاهده است که دارای ابعاد کوچک‌تری نسبت به دو نمونه نام‌برده است. در نتایج به‌دست‌آمده از ImageJ، میانگین اندازه تخلخل نمونه‌های ژلاتینی، HEC60-HA30-G و HEC70-HA30، به‌ترتیب ۵۴، ۱۲۰ و ۹۸ میکرومتر، محاسبه شد.

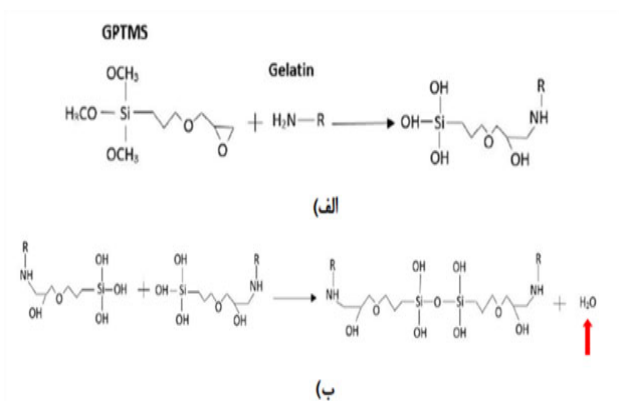


شکل ۱. تصاویر SEM سطح داربست‌های تهیه شده: (الف) HEC70-HA30

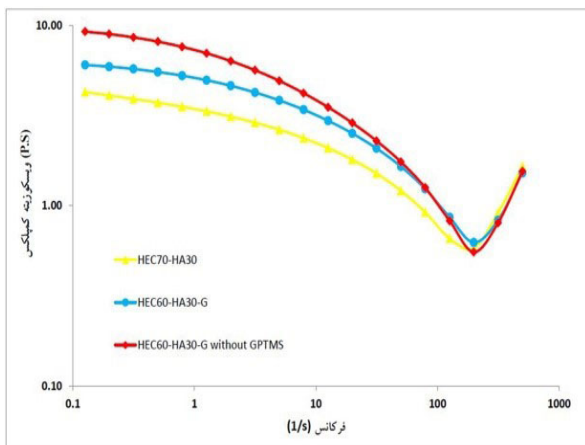
(ب) HEC60-HA30، با میانگین اندازه تخلخل ۱۲۰ میکرومتر، (ج) داربست ژلاتینی، با میانگین اندازه تخلخل ۹۸ میکرومتر، (د) داربست HEC60-HA30-G without GPTMS، داربست میکرومتخلخل. تصاویر، نشانگر به‌هم‌پیوسته بودن تخلخل‌هاست

در نتایج به‌دست‌آمده از دیگر مطالعات با روش تهیه مشابه، اندازه تخلخل‌های به‌دست‌آمده از ترکیبات HA/G

ساختارهای تشکیل شده در محلول، در اثر پیوندهای ثانویه باشد. اما در بسامدهای بالاتر نزدیک به ۱۰۰۰، رفتار رقیق برشی^۱، به غلیظ برشی^۲، تغییر کرده است. این پدیده، در بسیاری از سیالات دارای مولکولهای قطبی، دیده می شود و علت آن، تشکیل مجدد ساختارهای جدید، در سرعت یا بسامدهای بالاست که می تواند مانع جریان و همچنین، افزایش ویسکوزیته شود. حضور ژلاتین، مقدار ویسکوزیته کمپلکس را افزایش داده است و نمونه بدون GPTMS نیز، بیشترین مقدار را دارد.



شکل ۳. الف) واکنش ژلاتین و GPTMS و ب) ترکیب دو عامل سیلانول و تولید مولکول آب



شکل ۴. ویسکوزیته مختلط نمونه‌ها برحسب بسامد زاویه‌ای

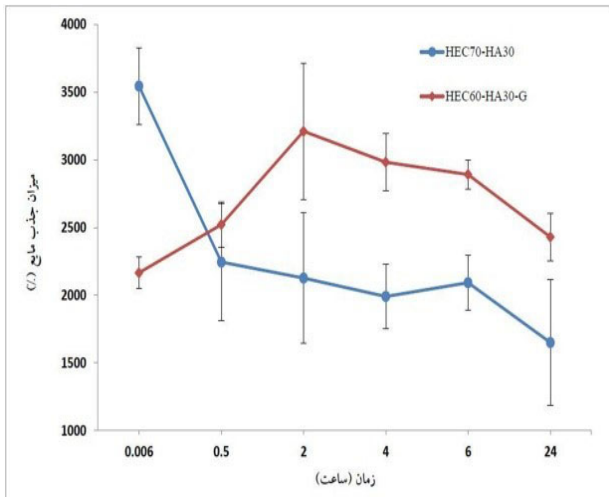
از دیگر متغیرهای مورد بررسی در تعیین قدرت ژل، شیب نمودار ویسکوزیته کمپلکس، نسبت به بسامد زاویه‌ای است. از راه‌های تعیین این شیب، استفاده از نرم‌افزار

ویسکوز هستند. این نتایج، نشان می‌دهند که ترکیب تهیه شده، در گروه محلول‌های دارای جریان، قرار می‌گیرد. در مطالعه دیگری که پیرامون هیدروکسی پروپیل متیل سلولز و GPTMS، صورت گرفته بود، رفتار رئولوژیکی آن، مقایسه شد که نتایج آن، مشابه نتایج به دست آمده در این پژوهش بود؛ یعنی میزان مدول اتلاف، از مدول ذخیره، بالاتر است [۳۱]. در شکل ۲، با افزودن ژلاتین، میزان هر دو مدول، افزایش یافته‌اند که می‌تواند نشانگر برقراری پیوند آن، با اتصال‌دهنده عرضی مورد نظر باشد [۲۶]؛ هرچندکه همچنان، مدول اتلاف، بالاتر از مدول ذخیره است. سازوکار ایجاد اتصالات عرضی، در محلول دارای ژلاتین، در شکل ۳، نشان داده شده است. باز شدن حلقه اپوکسی در GPTMS و واکنش آن با گروه آمین و مجدداً، واکنش همین کمپلکس‌ها، منجر به افزایش طول زنجیر و نیز ایجاد مولکول آب می‌شود. برای اثبات ایجاد اتصال عرضی در حضور GPTMS، نمونه‌ای بدون افزودن اتصال‌دهنده عرضی نیز، تهیه گردید. اگرچه انتظار می‌رود مدول ذخیره و حتی ویسکوزیته نمونه بدون GPTMS، در مقایسه با دو نمونه دیگر که حاوی GPTMS هستند، مقدار کمتری باشد؛ اما نتایج شکل‌های ۲ و ۴، عکس این مطلب را نشان می‌دهد. پیش-آزمون‌های انجام شده و غوطه‌ور سازی نمونه‌ها در محلول فیزیولوژیک، نشان داد که نمونه فاقد GPTMS، به هیچ‌عنوان، پایدار نبوده و به محض ورود در مایع، دچار اضمحلال و از هم گسیختگی می‌شود؛ درحالی‌که نمونه‌های حاوی اتصال-دهنده، از پایداری مناسب‌تری، برخوردارند. آزمون‌های اولیه غوطه‌وری، موجب شد تا نمونه‌های فاقد GPTMS، از ادامه ارزیابی‌ها، کنار گذاشته شوند. شاید بتوان، کاهش ویسکوزیته و افزایش مدول اتلاف با حضور GPTMS را به ایجاد مولکول‌های آب حاصل از واکنش نشان داده شده در شکل ۳، مربوط دانست.

ویسکوزیته کمپلکس، معیاری از قدرت ساختار و سفتی کلی مواد است. در شکل ۴، تأثیر بسامد بر ویسکوزیته کمپلکس، نشان داده شده است. نتایج، نشان‌دهنده وابستگی این متغیر به بسامد است، به طوری‌که با افزایش بسامد، ویسکوزیته کمپلکس، کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده رفتار غیرنیوتنی و روان‌شوندگی است. این موضوع، می‌تواند به دلیل هم‌راستا شدن مولکول‌ها، در جهت تنش وارد شده و تخریب

¹ Shear Thinning
² Shear Thickening

(الف) نمونه خشک قبل از غوطه‌وری و شکل ۷ (ب) نمونه پس از ۳۰ ثانیه غوطه‌وری و افزایش ابعاد آن بر اثر جذب آب را نشان می‌دهد.



شکل ۶. نمودار درصد جذب مایع داربست‌ها

همچنین، میزان جذب این نمونه، پس از فروپاشی شبکه، نسبت به نمونه دیگر، کاهش داشت و این افت، در نیم ساعت اول، مشهود است. این میزان، طی ۶ ساعت، به مقدار تعادل رسید و بعد از آن، تا روز اول، شروع به تخریب کرد و در نهایت، به مقدار ۱۶۵۰ درصد، رسیده است. از شکل ظاهری نمونه که یکپارچگی خود را از دست داده و حالت ژل‌گونه یافته است نیز، می‌توان به این مطلب، پی برد (شکل ۷ (ج)). حضور گروه‌های آلدوست OH و COOH در هیالورونیک اسید، OH در هیدروکسی اتیل سلولز، OH موجود در سیلانول و گروه OH حاصل از باز شدن حلقه اپوکسی، موجب این میزان جذب زیاد آب شده است. همچنین، بزرگ بودن ابعاد تخلخل‌ها نیز، جایگاه مناسبی برای جذب مایعات است.

در مقابل، نمونه HEC60-HA30-G، در عرض ۲ ساعت، به بیشینه مقدار ۳۲۱۱ درصد رسید و تا ساعت ۶، رفتار متعادلی در پیش گرفته است. سپس، مشابه نمونه قبلی، تا ساعت ۲۴، در میزان جذب، کاهش دیده می‌شود و به مقدار ۲۴۳۰ درصد رسید که نشانگر رو به تخریب رفتن نمونه است؛ هرچند که شکل ظاهری نمونه، تغییری نکرده و داربست، یکپارچگی خود را حفظ کرده است (شکل ۷ (د)). در کنار حضور گروه‌های عاملی آلدوست نام‌برده در HEC70-HA30، ژلاتین نیز، با داشتن گروه آلدوست COOH، بر جذب بالای

Rheoplus است و مقدار بالای آن، نشان‌دهنده رفتار الاستیک است. شیب نمودار ویسکوزیته کمپلکس-بسامد زاویه‌ای نزدیک به ۰/۸-، نمایانگر یک ژل ضعیف پلی‌ساکاریدی است که با درهم‌تنیدگی و تداخل زنجیره‌های حلقه تصادفی پلی-ساکاریدها، حاصل می‌شود [۳۴] که می‌توان، رفتار ضعیف نمونه HEC70-HA30 را به این مسئله، نسبت داد.

۳-۳- میزان جذب مایع داربست

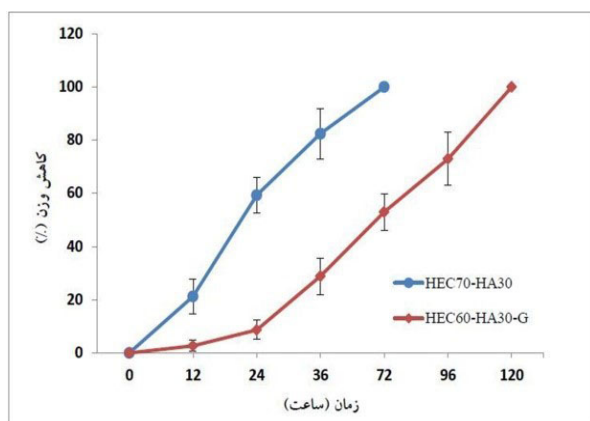
توانایی جذب مایع، ویژگی مهمی در داربست‌ها محسوب می‌شود که نفوذ مواد مغذی به سلول‌ها و جذب بهتر مایعات محیط را تسهیل می‌کند. این میزان، با تغییر مقادیر مواد مصرفی و غلظت اتصال‌دهنده عرضی، کنترل می‌شود و به تخلخل، اندازه حفرات و ساختار آن، بلورینگی و حجم آزاد بستگی دارد [۳۵]. از آنجاکه در این پژوهش، مقدار اتصال‌دهنده عرضی، در تمامی نمونه‌ها، یکسان است، تنها تغییر غلظت پلیمرها و حضور ژلاتین، از عوامل مؤثر محسوب می‌شوند. در شکل ۵، داربست تهیه شده به روش خشک‌کردن انجمادی، نشان داده شده است.



شکل ۵. داربست تهیه شده توسط خشک‌کردن انجمادی

شکل ۶، نمودار مربوط به درصد جذب مایع نمونه‌ها را نشان می‌دهد. میزان جذب مایع نمونه HEC70-HA30، در ۳۰ ثانیه اول، به بیشینه مقدار خود، ۳۵۴۵ درصد می‌رسد و سپس، این مقدار، با گذر زمان، کاهش می‌یابد. این کاهش وزن، ممکن است به خاطر فروریختن شبکه پلیمری، بعد از جذب مقدار زیادی مایع، در ثانیه‌های اول تماس با آن باشد [۳۶]. شکل ۷

آبدوست زیاد، تا ۷۲ ساعت، به‌طور کامل، وزن خود را از دست داده است، درحالی‌که نمونه HEC60-HA30-G در همان زمان، ۵۳ درصد از وزن خود را از دست داده است. در ادامه، تا ۹۶ ساعت، میزان ۷۲ درصد از وزن خود را از دست داده و در نهایت، طی ۱۲۰ ساعت، به‌طور کامل تخریب شده است. ژلاتین، به دلیل اتصال با GPTMS و تشکیل تخریب‌های کوچک‌تر در داربست، نرخ کاهش وزن کمتری، نسبت به HEC70-HA30 دارد.



شکل ۸. نمودار نرخ کاهش وزن داربست‌ها

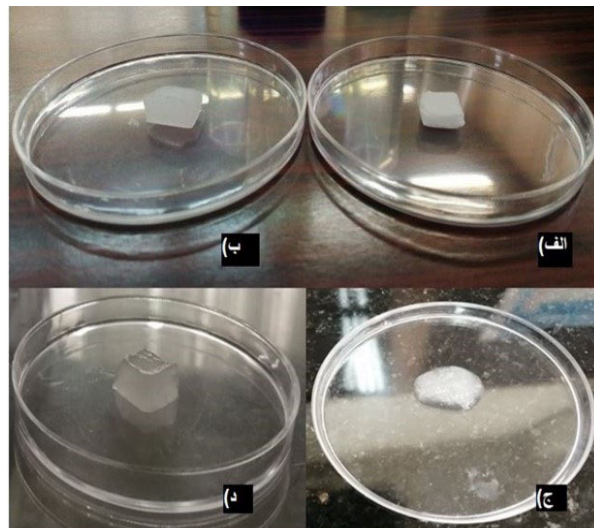
کاهش وزن داربست‌های تهیه‌شده، نقش مؤثری در روند ترمیم زخم دارد. محصولات تخریب هیالورونیک اسید، دارای ویژگی‌های متعددی هستند که با جذب توسط بدن، آنها را برای کاربردهای درمانی، به‌خصوص در حیطه ترمیم زخم، مناسب کرده است [۳۸]. ژلاتین نیز، محصولات جانبی سمی ندارد و با تبدیل به آمینوفنول، توسط بدن، جذب می‌شود [۳۷].

به‌طور کلی، کاهش وزن بر اثر تخریب (هیدرولیتیکی یا آنزیمی) سریع یک داربست، نشان‌دهنده عدم توانایی آن، در پشتیبانی از تکثیر سلولی است و تخریب آهسته نیز، به منزله سپر تنش^۱، مانعی جهت رشد بافت، محسوب می‌شود [۳۹].

۳-۵- سمیت سلولی

یکی از روش‌های مرسوم و سریع برای سنجش میزان سمیت زیست‌مواد، آزمون MTT است. این آزمون، جهت مطالعه تکثیر سلول‌های فیبروبلاست L929، روی داربست‌های تهیه‌شده، انجام شد.

مایع توسط این داربست، تأثیرگذار است؛ هرچند، کمتر شدن میزان آن نسبت به نمونه قبل، به‌خاطر کاهش اندازه تخلخل‌های آن است.



شکل ۷. الف) برشی از نمونه برای غوطه‌ورسازی، ب) نمونه‌ها بعد از ۳۰ ثانیه غوطه‌وری و گرفته شدن آب اضافی بدون ایجاد تغییر در شکل، ج) نمونه HEC70-HA30 بعد از ۲۴ ساعت غوطه‌وری که ظاهری ژل‌مانند دارد و د) نمونه HEC60-HA30-G بعد از ۲۴ ساعت غوطه‌وری که باوجود فروپاشی شبکه، همچنان شکل ظاهری خود را حفظ کرده است

با افزودن ژلاتین، زمان فروپاشی شبکه، به ۲ ساعت، افزایش یافته است و درحین داشتن میزان جذب بالا، پایداری بیشتری در مقابل مایع، نسبت به نمونه بدون ژلاتین، از خود نشان می‌دهد. داربست، باوجود فروپاشی شبکه در ۲ ساعت، ساختار فیزیکی خود را حفظ نموده و تا ساعت ۲۴، توانایی جذب از خود، نشان داده است. قابلیت جذب بالای نمونه‌ها، علاوه‌بر مناسب بودن آنها در جذب ترشحات زخم، آنها را برای کاربردهای دیگر، نظیر بارگذاری دارو، مناسب می‌کند.

۳-۴- کاهش وزن

داربست زیست‌تخریب‌پذیر، می‌تواند با تخریب در طی ترمیم زخم، فضای مناسبی، جهت رشد بافت و سلول‌ها، فراهم کند [۳۷]. نتایج به‌دست‌آمده از داربست‌ها، در شکل ۸، نشان داده شده است.

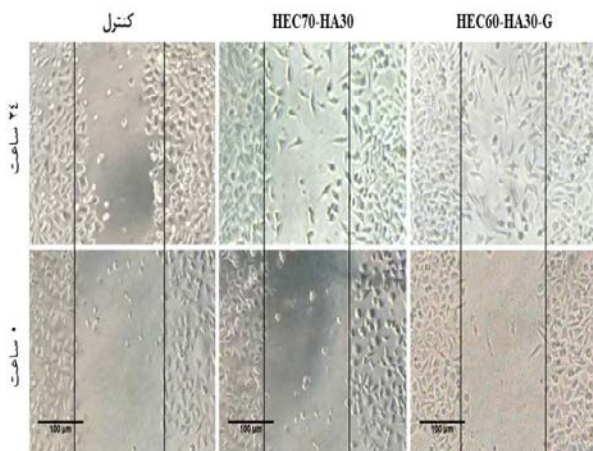
همان‌طور که از نمودار مشخص است، نمونه HEC70-HA30، به‌دلیل داشتن اندازه تخلخل بالا و تعداد گروه‌های

¹ Stress Shielding

علل آن، می‌توان به آبدوست بودن نمونه‌ها، اشاره کرد. اثر ژلاتین بر فعالیت سلولی نیز، به‌خوبی قابل مشاهده است که میزان تکثیر سلولی را افزایش داده است. همچنین، ژلاتین با پایدار کردن ساختار و کاهش سرعت تخریب، تأثیر فیزیکی مناسب‌تری بر سلول‌ها داشته و تنها مقدار ناچیزی از آنها را به‌علت تخلیه محصولات تخریب، طی تعویض محیط کشت در روز ششم، از میان برده است.

۳-۶- مهاجرت سلولی

این آزمون، یک روش استاندارد برون‌تنی، جهت مطالعه مهاجرت سلولی است [۴۰]. به‌منظور تخمین توانایی داریست‌ها، در افزایش مهاجرت سلول‌های فیروبلاست L929، مطابق شکل ۱۰، یک آزمون وابسته به زمان (۲۴-۰ ساعت)، انجام شد. سلول‌ها، در این آزمون، توانایی تکثیر ندارند، بلکه مطابق شکل ۱۰، در فاصله ایجادشده به‌عنوان «زخم»، مهاجرت خواهند کرد.

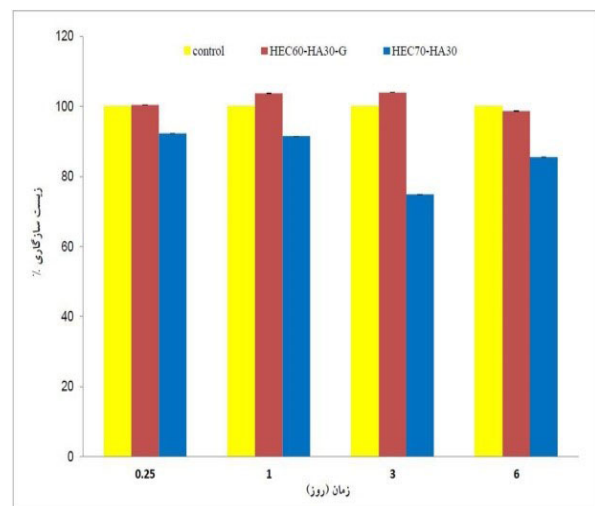


شکل ۱۰. آزمون ترمیم زخم برون‌تنی، حضور سلول‌های

فیروبلاست در محل زخم، بعد از ۲۴ ساعت تماس با داریست‌ها

آزمون ترمیم زخم برون‌تنی، با اندازه‌گیری نواحی زخم پس از ۲۴ ساعت، در شکل ۱۱، نمایش داده شده است. هر دو نمونه، نسبت به نمونه کنترل، بر مهاجرت سلولی، اثرگذار بوده‌اند. نمونه HEC60-HA30-G، با افزایش انقباض زخم برابر ۷۳ درصد، بیشترین مقدار را داشته است که می‌تواند نشانگر توانایی این داریست، در افزایش سرعت مهاجرت سلولی و ساخت دوباره بافت پوششی اپی تلیوم، به‌علت حضور ژلاتین باشد [۲۰]. بنابراین، نمونه HEC60-HA30-G

باتوجه به شکل ۹، از نتایج به‌دست‌آمده، می‌توان مشاهده کرد که نمونه HEC60-HA30-G، بیشترین زنده‌مانی را دارد و نمونه دیگر، نرخ کمتری را نسبت به نمونه کنترل، از خود نشان می‌دهد. کمترین مقدار، مربوط به نمونه HEC70-HA30، در روز سوم و به میزان ۷۴ درصد بوده است که می‌توان به‌سرعت تخریب و رهایش سریع محصولات تخریب در محیط، نسبت داد؛ درحالی‌که نمونه HEC60-HA30-G، به بیشترین مقدار خود، یعنی ۱۰۴ درصد رسیده است. از آنجاکه در روز سوم، محیط کشت هر چاهک، تعویض شده است، محصولات تخریب نمونه‌ها، خارج شده است و بدین ترتیب، تنها ذرات اندکی از داریست، در نمونه HEC70-HA30، پس از تعویض محیط کشت، باقی مانده که توانایی تحریک تکثیر سلولی را تا روز ششم داشته است (طبیعتاً کمتر از حالتی که نمونه، در تماس با سلول باشد) و حتی در صورت تخلیه کامل محصولات، می‌توان گفت که اثر منفی بر این روند، نداشته است. همان‌طور که گفته شد، در نمونه HEC60-HA30-G، به دلیل حفظ ساختار و رهایش تدریجی محصولات تخریب، به‌خصوص ژلاتین، در روز سوم، به بیشینه مقدارش رسیده است. همچنین، با تغییر محیط کشت و حذف محصولات تخریب، روند تکثیر سلولی، نسبت به قبل از تعویض، اندکی کاهش یافته است که نشانگر خروج محصولات بوده است.



شکل ۹. نمودار آزمون سمیت سلولی داریست‌ها طی ۶ ساعت و

روزهای ۱، ۳ و ۶

به‌طورکلی، از نتایج به‌دست‌آمده، می‌توان استنباط کرد که این دو نمونه، سمیتی از خود نشان نداده‌اند که از بارزترین

خراش، توانایی افزایش مهاجرت سلول‌های فیبروبلاست را داشتند و این میزان، نسبت به نمونه کنترل، بیشتر بود. بهترین اثربخشی در ترمیم زخم، در نمونه حاوی ژلاتین، با ۷۳ درصد انقباض، مشاهده شد. نتایج، نشانگر مناسب بودن داربست پایه هیدروکسی اتیل سلولز-هیالورونیک اسید حاوی ژلاتین، جهت ترمیم زخم‌های سوختگی درجه دو سطحی بود. در ادامه تحقیقات، می‌توان به‌منظور کاهش نرخ تخریب و دستیابی به ساختاری پایدارتر برای بارگذاری دارو، با تغییر در یکی از پلیمرها و یا اتصال‌دهنده عرضی، این داربست را جهت ترمیم سوختگی درجات بالاتر و حتی زخم‌های مزمن، مناسب نمود.

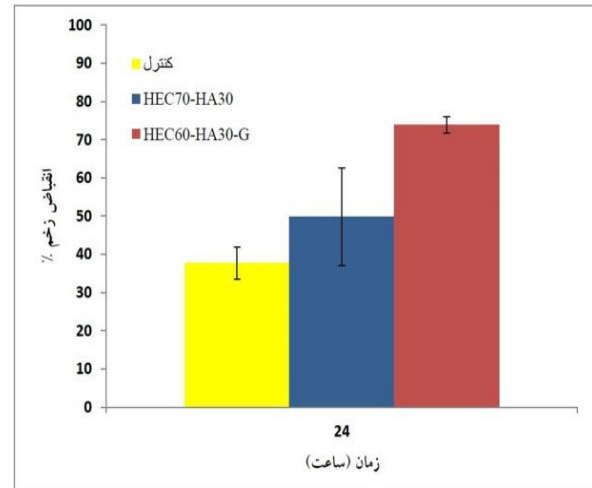
۵- سپاسگزاری

از حمایت‌های پژوهشگاه مواد و انرژی، در پیشبرد این پژوهش، کمال تشکر را داریم.

مراجع

- Kalaskar, D. K., Butler, P. E., Ghali, S., *Textbook of Plastic and Reconstructive Surgery*, Ucl Press, London, (2016). <https://doi.org/10.14324/111.978191063394>
- Upadhyay, N., Kumar, R., Mandotra, S. K., Meena, R. N., Siddiqui, M. S., Sawhney, R. C., Gupta, A., "Safety and healing efficacy of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) seed oil on burn wounds in rats", *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 47, No. 6, (2009), 1146-1153. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.002>
- Altintas, M. A., Altintas, A. A., Knobloch, K., Guggenheim, M., Zweifel, C. J., Vogt, P. M., "Differentiation of superficial-partial vs. deep-partial thickness burn injuries in vivo by confocal-laser-scanning microscopy", *Burns*, Vol. 35, No. 1, (2009), 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2008.05.003>
- Moore, F. A., Sawaia, A., Moore, E. E., Haanel, J. B., Burch, J. M., Lezotte, D. C., "Postinjury multiple organ failure: A bimodal phenomenon", *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, Vol. 40, No. 4, (1996), 501-512. https://journals.lww.com/jtrauma/Fulltext/1996/04000/Treatment_Results_of_Patients_with_Multiple.1.aspx
- Pan, S. C., "Burn blister fluids in the neovascularization stage of burn wound healing: a comparison between superficial and deep partial-thickness burn wounds", *Burns & Trauma*, Vol. 1, No. 1, (2013), 2321-3868.113332. <https://doi.org/10.4103/2321-3868.113332>
- Mondal, M. I. H., *Cellulose-based Superabsorbent Hydrogels*, Springer, Basel, (2019). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-76573-0>
- Eaglstein, W. H., "Moist wound healing with occlusive dressings: A clinical focus", *Dermatologic Surgery*, Vol. 27, No. 2, (2001), 175-182. <https://doi.org/10.1046/j.1524-4725.2001.00299.x>
- Katz, M. H., Alvarez, A. F., Kirsner, R. S., Eaglstein, W. H., Falanga, V., "Human wound fluid from acute wounds stimulates fibroblast and endothelial cell growth", *Journal of the American Academy of Dermatology*, Vol. 25, No. 6, (1991), 1054-1058. [https://doi.org/10.1016/0190-9622\(91\)70306-M](https://doi.org/10.1016/0190-9622(91)70306-M)
- Junker, J. P., Kamel, R. A., Caterson, E., Eriksson, E., "Clinical impact upon wound healing and inflammation in moist, wet, and dry environments", *Advances in Wound Care*, Vol. 2, No. 7, (2013), 348-356. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0412>

مطابق زمان تخریب به‌دست‌آمده در قسمت ۳-۴ و آزمون خراش، برای کاهش زمان ترمیم و در نتیجه، عدم تشکیل اسکار (جوشگاه)، مناسب است؛ چراکه روند ترمیم، با روند تخریب داربست، قابل انطباق است.



شکل ۱۱. نمودار درصد انقباض زخم داربست‌ها

(کنترل=۳۷٪، HEC70-HA30=۵۰٪ و HEC60-HA30-G=۷۳٪)

۴- نتیجه‌گیری

از هیدروکسی اتیل سلولز و هیالورونیک اسید، بدون و با ژلاتین، داربست‌هایی با تخلخل‌های به‌هم پیوسته، با ابعاد زیر ۲۰۰ میکرومتر، تهیه‌شد. محلول تهیه‌شده از این پلیمرها، ویسکوز و جریان‌پذیر بود و با افزودن اتصال‌دهنده GPTMS، مدول ذخیره و ویسکوزیته آنها، به‌دلیل تشکیل مولکول‌های آب، کاهش یافت. این داربست‌ها، توانایی بالایی در جذب مایع داشتند که با افزودن ژلاتین، جذب آب نیز، متعادل‌تر شد و زمان فروپاشی شبکه، از ۳۰ ثانیه، به ۲ ساعت، افزایش یافت. قابلیت جذب آب بیشتر، نشانگر مناسب بودن داربست‌ها، برای جذب ترشحات زخم‌های سوختگی درجه دو سطحی است؛ مشروط بر آنکه داربست‌ها، یکپارچگی خود را حفظ کنند که با افزودن ژلاتین، این نتیجه، به‌طور نسبی، حاصل شد. همچنین، حضور اتصال‌دهنده GPTMS، با کاهش سرعت تخریب، به‌دلیل تشکیل پیوند، ساختار یکنواخت و پایدارتری را نسبت به نمونه دیگر، به داربست بخشید. نتایج مربوط به آزمون سمیت سلولی، حاکی از زیست‌سازگاری هر دو نمونه است. حضور ژلاتین، موجب فعالیت متابولیکی سلول‌ها شد و در تکثیر آنها، اثر مثبتی داشت. نمونه‌ها، با توجه به نتایج آزمون

26. Tonda-Turo, C., Gentile, P., Saracino, S., Chiono, V., Nandagiri, V. K., Muzio, G., Canuto, R. A., Ciardelli, G., "Comparative analysis of gelatin scaffolds crosslinked by genipin and silane coupling agent", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 49, No. 4, (2011), 700-706. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.07.002>
27. Vueva, Y., Connell, L. S., Chayanun, S., Wang, D., McPhail, D. S., Romer, F., Hanna, J. V. Jones, J. R., "Silica/alginate hybrid biomaterials and assessment of their covalent coupling", *Applied Materials Today*, Vol. 11, (2018), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.12.011>
28. Wang, D., Romer, F., Connell, L. S., Walter, C., Saiz, E., Yue, S., Lee, P. D., McPhail, D. S., Hanna, J. V., Jones, J. R., "Highly flexible silica/chitosan hybrid scaffolds with oriented pores for tissue regeneration", *Journal of Materials Chemistry B*, Vol. 3, No. 38, (2015), 7560-7576. <https://doi.org/10.1039/C5TB00767D>
29. Bourges, X., Weiss, P., Coudreuse, A., Daculsi, G., Legeay, G., "General properties of silylated hydroxyethylcellulose for potential biomedical applications", *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, Vol. 63, No. 4, (2002), 232-238. <https://doi.org/10.1002/bip.10053>
30. Hasani, S., Nezafati, N., Hesaraki, S., "Investigating the effect of time and amount of cross linker on on hydroxyethyl cellulose based scaffolds, prepared by freeze drying method", *Proceedings of 5th International Conference on Applied Research in Chemistry and Chemical Engineering Focusing on Local Technologies*, Tehran, Iran, (2018).
31. Fatimi, A., Tassin, J. F., Quillard, S., Axelos, M. A., Weiss, P., "The rheological properties of silylated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering matrices", *Biomaterials*, Vol. 29, No. 5, (2008), 533-543. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.10.032>
32. Wang, T. W., Sun, J. S., Wu, H. C., Tsuang, Y. H., Wang, W. H., Lin, F. H., "The effect of gelatin-chondroitin sulfate-hyaluronic acid skin substitute on wound healing in SCID mice", *Biomaterials*, Vol. 27, No. 33, (2006), 5689-5697. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.07.024>
33. Katoh, K., Tanabe, T., Yamauchi, K., "Novel approach to fabricate keratin sponge scaffolds with controlled pore size and porosity", *Biomaterials*, Vol. 25, No. 18, (2004), 4255-4262. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.11.018>
34. Morris, E. R., "Shear-thinning of 'random coil' polysaccharides: Characterisation by two parameters from a simple linear plot", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 13, No. 1, (1990), 85-96. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(90\)90053-U](https://doi.org/10.1016/0144-8617(90)90053-U)
35. Monfregola, L., Bugatti, V., Amodeo, P., De Luca, S., Vittoria, V., "Physical and water sorption properties of chemically modified pectin with an environmentally friendly process", *Biomacromolecules*, Vol. 12, No. 6, (2011), 2311-2318. <https://doi.org/10.1021/bm200376c>
36. Saarai, A., Kasparikova, V., Sedlacek, T., Saha, P., "On the development and characterisation of crosslinked sodium alginate/gelatin hydrogels", *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Vol. 18, (2013), 152-166. <https://doi.org/10.1016/j.jmbm.2012.11.010>
37. Si, S., Zhou, R., Xing, Z., Xu, H., Cai, Y., Zhang, Q., "A study of hybrid organic/inorganic hydrogel films based on in situ-generated TiO₂ nanoparticles and methacrylated gelatin", *Fibers and Polymers*, Vol. 14, No. 6, (2013), 982-989. <https://doi.org/10.1007/s12221-013-0982-x>
38. Price, R. D., Myers, S., Leigh, I. M., Navsaria, H. A., "The role of hyaluronic acid in wound healing", *American Journal of Clinical Dermatology*, Vol. 6, No. 6, (2005), 393-402. <https://doi.org/10.2165/00128071-200506060-00006>
39. Zhong, S., Zhang, Y., Lim, C., "Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction", *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, Vol. 2, No. 5, (2010), 510-525. <https://doi.org/10.1002/wnan.100>
40. Ilina, O., Friedl, P., "Mechanisms of collective cell migration at a glance", *Journal of Cell Science*, Vol. 122, No. 18, (2009), 3203-3208. <https://doi.org/10.1242/jcs.036525>
10. Hoffman, A. S., "Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for clinical translation", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 65, No. 1, (2013), 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.11.004>
11. Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. S., Ichikawa, H., "Hydrogels in pharmaceutical formulations", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol. 50, No. 1, (2000), 27-46. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00090-4](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00090-4)
12. Sinko, P. J., Stein, S., Menjoge, A. R., Gunaseelan, S., Priya Anumolu, S. N. S., Navath, R., *Dressing Compositions and Methods*, Rutgers State University of New Jersey, U.S. Patent, (2015). <http://patents.google.com/patent/US9211358B2/en>
13. Li, J., Mooney, D. J., "Designing hydrogels for controlled drug delivery", *Nature Reviews Materials*, Vol. 1, No. 12, (2016), 1-17. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>
14. Sachlos, E., Czernuszka, J. T., "Making tissue engineering scaffolds work, Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds", *European Cells and Materials*, Vol. 5, No. 29, (2003), 29-40. <https://doi.org/10.22203/eCM.v005a03>
15. Ganji, F., Vasheghani Farahani, S., Vasheghani Farahani, E., "Theoretical description of hydrogel swelling: A review", *Iranian Polymer Journal (English)*, Vol. 19, No. 5, (2010), 375-398. <http://journal.ippi.ac.ir>
16. Omidian, H., Rocca, J. G., Park, K., "Advances in superporous hydrogels", *Journal of Controlled Release*, Vol. 102, No. 1, (2005), 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.09.028>
17. Manoukian, O. S., Matta, R., Letendre, J., Collins, P., Mazzocca, A. D., Kumber, S. G., "Electrospun nanofiber scaffolds and their hydrogel composites for the engineering and regeneration of soft tissues", *Biomedical Nanotechnology*, Springer, New York, (2017), 261-278. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6840-4_18
18. Kwon, S. S., Kong, B. J., Park, S. N., "Physicochemical properties of pH-sensitive hydrogels based on hydroxyethyl cellulose-hyaluronic acid and for applications as transdermal delivery systems for skin lesions", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol. 92, (2015), 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.02.025>
19. Mogoşanu, G. D., Grumezescu, A. M., "Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 463, No. 2, (2014), 127-136. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.015>
20. Wu, S., Deng, L., Hsia, H., Xu, K., He, Y., Huang, Q., Peng, Y., Zhou, Z., Peng, C., "Evaluation of gelatin-hyaluronic acid composite hydrogels for accelerating wound healing", *Journal of Biomaterials Applications*, Vol. 31, No. 10, (2017), 1380-1390. <https://doi.org/10.1177/0885328217702526>
21. Li, D., Xia, Y., "Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel?", *Advanced Materials*, Vol. 16, No. 14, (2004), 1151-1170. <https://doi.org/10.1002/adma.200400719>
22. El Fawal, G. F., Abu-Serie, M. M., Hassan, M. A., Elnouby, M. S., "Hydroxyethyl cellulose hydrogel for wound dressing: Fabrication, characterization and in vitro evaluation", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 111, (2018), 649-659. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.040>
23. Eskandarinia, A., Kefayat, A., Gharakhloo, M., Agheb, M., Khodabakhshi, D., Khorshidi, M., Sheikmoradi, V., Rafienia, M., Salehi, H., "A propolis enriched polyurethane-hyaluronic acid nanofibrous wound dressing with remarkable antibacterial and wound healing activities", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 149, (2020), 467-476. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.255>
24. Lee, H. Y., Kim, H. E., Jeong, S. H., "One-pot synthesis of silane-modified hyaluronic acid hydrogels for effective antibacterial drug delivery via sol-gel stabilization", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 174, (2019), 308-315. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.034>
25. Shang, S. M., Li, Z., Xing, Y., Xin, J. H., Tao, X. M., "Preparation of durable hydrophobic cellulose fabric from water glass and mixed organosilanes", *Applied Surface Science*, Vol. 257, No. 5, (2010), 1495-1499. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.08.081>