ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2021;10(4):225-240

Journal of Police Medicine

Journal Homepage: http://jpmed.ir/

Original Article Open Access

Design and Manufacture of Modified Alginate Spray as a New Wound Dressing to Control Bleeding and Wound Healing

Reza Mahdavi[1 MSc], Melika Hassani[2 MSc], Ali Roostaie[3* PhD], Mehdi Khalili[1 MSc], Masoumeh Haghbin Nazar Pak[1 PhD]

[1] Department of Biomedical Engineering, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran.
[2] Department of Biomedical Engineering, Faculty of Biomedical Engineering, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[3] Police Technology & Equipment Department, Police Sciences & Social Studies Institute, Tehran, Iran.

ABSTRACT

AIMS: Alginate is one of the substances that is considered as a promising candidate for wound healing. The aim of this study was to design and manufacture a dressing spray based on alginate / calcium chloride / gelatin alginate to control bleeding and wound healing.

MATERIALS & METHODS: This experimental research was conducted in the research laboratory of Amirkabir University from December 2019 to January 2020. In this study, saline phosphate buffer solution was prepared first. Then, their sterilization process was performed by autoclave and MTT salt solution was prepared during a process. In order to prepare an alginate-based spray dressing, we adjusted the concentration of the solution so that it could escape from the spray pore. On the other hand, in order to obtain gel alginate with suitable strength in equal proportions of calcium chloride concentrations, aqueous solution of gelatin was prepared for copolymerization with alginate. Finally, the bonds in the proposed dressing were evaluated by FTIR. Also, the degree of degradability, water absorption, changes in weight and pH, physical properties and microstructure of the extrinsic biological response were investigated in the designed dressing. Scanning electron microscopy and infrared spectroscopy were used to examine the dressing structure resulting from the ratio of different amounts of materials involved.

FINDINGS: The results showed that the amount of water absorption in the sample and their degradation rate were AGC3> AGC4> AGC2> AGC1. In the study of biocompatibility, it was found that despite better results in AGC3, the degree of non-toxicity of AGC2 group was higher and also showed better cell adhesion behavior. Therefore, according to the results, AGC2 sample was selected as the final sample.

CONCLUSION: The results revealed that increasing calcium chloride levels could lead to increased alginate hydrogel formation. Also, the presence of gelatin and calcium chloride in the constant concentration of alginate will reduce the formation time of the spray hydrogel until they create space barriers.

KEYWORD: Spray-On Dressing; Bleeding; Alginate; Gelatin; Calcium Chloride; Hydrogel

How to cite this article:

Mahdavi R, Hassani M, Roostaie A, Khalili M, Haghbin Nazar Pak M. *Design and Manufacture of Modified Alginate Spray as a New Wound Dressing to Control Bleeding and Wound Healing.* J Police Med. 2021;10(4):225-40.

***Correspondence:**

Address: Research Institute of Police Science and Social Studies, Vali-e-Asr Street, Tehran, Iran.
Postal Code: 6516-19395
Tel: +982181886058
Fax : -
Mail: mailto:a.kiamarsi52@gmail.com

Article History:

Received: 18/07/2021
Accepted: 25/08/2021
ePublished: 07/10/2021

Copyright © 2021, Journal of Police Medicine | This open access article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2021;10(4):225-240

مجله طب انتظامی

وب‌سایت مجله: http://jpmed.ir/

مقاله اصیل

دسترسی آزاد

طراحی و ساخت اسپری آلژینات اصلاح شده به عنوان زخم پوش نوین جهت کنترل خونریزی و بهبود زخم

رضا مهدوی[1] MSc، ملیکا حسنی[2] MSc، علی روستایی[3*] PhD، مهدی خلیلی[1] MSc، معصومه حق بین نظرپاک[1] PhD

[1] گروه مهندسی پزشکی، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران ، ایران.
[2] گروه مهندسی پزشکی، دانشکده مهندسی پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
[3] پژوهشکده تجهیزات و فناوری‌های انتظامی، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی ناجا، تهران، ایران.

چکیده

اهداف: آلژینات ازجمله موادی است که به‌عنوان کاندیدای امیدبخش برای درمان زخم به شمار می‌آید. این پژوهش با هدف طراحی و ساخت اسپری پانسمان بر پایه آلژینات/کلسیم کلرید/ ژلاتین جهت کنترل خونریزی و بهبود زخم انجام شد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش تجربی در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه امیرکبیر از آذرماه سال ۱۳۹۸ تا بهمن‌ماه ۱۳۹۹ انجام شد. در این پژوهش ابتدا محلول بافر فسفات نمکی آماده شد. سپس فرآیند سترون‌سازی آنها از طریق اتوکلاو انجام شد و محلول نمک MTT طی فرآیندی آماده‌سازی شد. به منظور تهیه پانسمان اسپری‌شونده بر پایه آلژینات، غلظت محلول را به گونه‌ای که امکان خروج از منفذ اسپری داشته باشد، تنظیم کردیم. از طرفی به منظور دست‌یابی به آلژینات ژلی با استحکام مناسب به نسبت برابر از غلظت‌های کلسیم کلراید، محلول آبی ژلاتین جهت کوپلیمرسازی با آلژینات تهیه گردید. درنهایت پیوندهای موجود در پانسمان پیشنهادی توسط FTIR بررسی شدند. همچنین میزان تخریب‌پذیری، جذب آب، تغییرات وزن و pH، خواص فیزیکی و ریزساختار پاسخ زیستی برون‌تنی نیز در پانسمان طراحی‌شده بررسی شدند. میکروسکوپ الکترونی روبشی و طیف‌سنج مادون قرمز جهت بررسی ساختار پانسمان حاصل از نسبت مقادیر متفاوت مواد درگیر مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج به‌دست‌آمده نشان داد میزان جذب آب در نمونه AGC3>AGC4>AGC2>AGC1 بود که درنتیجه میزان تخریب آنها نیز به همین ترتیب بود. در بررسی نتایج زیست‌سازگاری نیز مشخص گردید که علی‌رغم نتایج بهتر در گروه AGC3، رفتار چسبندگی سلولی گروه AGC2 بهتر بود. در نهایت با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، ترکیب AGC2 به عنوان بهترین پانسمان با بالاترین کارایی انتخاب شد.

نتیجه‌گیری: نتایج آشکار کرد که افزایش مقادیر کلسیم کلراید می‌تواند منجر به افزایش تشکیل هیدروژل آلژیناتی شود. همچنین حضور ژلاتین و کلسیم کلراید در غلظت ثابت آلژینات تا زمانی که ممانعت‌های فضایی توسط آنها ایجاد نشود، زمان تشکیل هیدروژل حاصل از اسپری را کاهش خواهند داد.

کلیدواژه‌ها: پانسمان اسپری‌شونده، خونریزی، آلژینات، ژلاتین، کلسیم کلراید، ژل‌شوندگی

نحوه استناد به این مقاله:

Mahdavi R, Hassani M, Roostaie A, Khalili M, Haghbin Nazar Pak M. *Design and Manufacture of Modified Alginate Spray as a New Wound Dressing to Control Bleeding and Wound Healing.* J Police Med. 2021;10(4):225-40.

نویسنده مسئول*:

آدرس پستی: تهران، خیابان ولیعصر (عج)، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی ناجا، تهران، ایران.
کدپستی: ۶۵۱۶-۱۹۳۹۵
تلفن: ۰۲۱۸۱۸۸۶۰۵۸
فاکس -
پست الکترونیک:
mailto:a.kiamarsi52@gmail.com

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۷
پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۰۳
چاپ: ۱۴۰۰/۰۷/۱۵

Copyright © 2021, Journal of Police Medicine | This open access article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

مقدمه

پوست یکی از بزرگ‌ترین و مهم‌ترین اندام‌های انسان است. این عضو به دلیل قرارگرفتن در تماس مستقیم با محیط، به شدت در معرض آسیب‌های مختلفی از جمله زخم‌ها است. بشر زمانی که با پدیده زخم مواجه شد، از مواد طبیعی پیرامون خود همچون برگ درختان، صمغ، عسل و غیره برای ترمیم استفاده نمود. در آن دوران به دلیل عدم وجود پوشش‌های مناسب برای انسان، عفونت ناشی از زخم به علت ورود میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، عامل اصلی مرگ و میر بود و با وجود پیشرفت‌هایی که طی سالیان در زمینه محافظت از زخم با مواد طبیعی رخ داده بود، هنوز جان بسیاری را می‌گرفت. تحقیق در این زمینه منجر به استفاده از مواد سنتزی و پانسمان‌های مختلفی در زمینه ترمیم زخم و بندآوری خونریزی شده است که امروزه اغلب آنها را در زمینه زیست مواد پوستی یا مهندسی بافت پوست طبقه‌بندی می‌کنند [۴-۱]. با گذشت زمان، پزشکان و محققان به پیشرفت‌های شگرفی در حوزه پوشش‌های مناسب برای زخم که تحت عنوان زخم‌پوش‌ها شناخته می‌شوند، دست یافته‌اند. زخم‌پوش‌هایی که توانسته‌اند خاصیت‌هایی همچون تنظیم رطوبت و بخارات ناحیه زخم، تنظیم اسیدیته، خاصیت ضد باکتری و سایر خواص مورد نیاز را داشته باشد. همین امر منتج به بهبود ترمیم زخم و کنترل عفونت شد اگرچه هنوز دستیابی به پوشش ایده‌آل برای ترمیم زخم ممکن نشده است. امروزه زخم‌پوش‌های مورد استفاده به دو دسته سنتزی و بیولوژیکی تقسیم می‌شوند [۵، ۶].

با معرفی مهندسی بافت و زیست مواد، پیشرفت‌ها از این هم فراتر رفت و در آینده امیدوار به ترمیم کامل زخم بدون هیچ‌گونه آثاری از بافت اسکار، هستیم. یکی از موارد معرفی‌شده توسط این زمینه علمی، ساخت پانسمان‌های خودتخریب‌شونده است که می‌تواند از منشأ طبیعی یا سنتزی تهیه شده باشد. ماده استفاده‌شده در این پژوهش آلژینات بود که خود دارای منشأ طبیعی (نوعی جلبک دریایی) است. این ماده دارای خواص بسیار خوبی ازجمله سرعت پلیمریزه شدن بالا، مقاومت مکانیکی مناسب و زیست تخریب‌پذیر است [۵]. می‌توان گفت این نیاز همواره وجود دارد تا در کمترین زمان بتوان از یکی از مهم‌ترین علل این آسیب‌ها یعنی خونریزی جلوگیری کرد. زخم‌پوش‌های نوین با حفظ یک محیط موضعی مرطوب اطراف زخم، انتقال گازهای مناسب، حذف ترشحات بیش از حد، محافظت از زخم در برابر حمله میکروارگانیسم‌ها و آلودگی‌ها، جلوگیری از خشکی زخم، کاهش نکروز سطح زخم، تحریک فاکتور رشد، داشتن حفاظت مکانیکی، سهولت در برداشته شدن و تعویض از روی زخم، غیرآلرژیک، غیرسمی و سازگار بودن با بدن، زیست‌تخریب‌پذیری (قابل تخریب‌شدن توسط بدن) و الاستیک بودن، کاهش درد زخم و قابل‌قبول بودن هزینه و استریلیزه کردن راحت می توانند در رقابت از پانسمان‌های قدیمی ایده‌آل‌تر باشند [۷].

نوعی از این زخم‌پوش‌ها، پانسمان‌های پلیمری هستند که در فرآیند بهبود و درمان می توانند نقش داشته باشند. *وینتر*، اولین نسل از پانسمان‌های پلیمری را معرفی کرد [۸]. در اواسط دهه ۱۹۷۰، غشاهای پلیمری در توسعهٔ مواد سنتزی پانسمانی، مورد توجه قرار گرفتند. در سال ۱۹۸۸، چندین مواد پلیمری بر پایه کیتین، به‌عنوان اولین پوشش‌دهنده‌های زخم مورد استفاده قرار گرفتند. با توجه به فعالیت جالب بیولوژیکی این مواد، نشان داده شد که پلیمرها گزینه‌های مناسبی برای توسعه دادن مواد پانسمانی هستند [۹].

آلژینات ازجمله موادی است که به‌عنوان کاندیدای امیدبخش برای درمان زخم به شمار می‌آید. این ماده می‌تواند به‌صورت پوششی بادوام، جاذب آب و زیست سازگار، مستقیماً برای درمان انواع زخم استفاده شود. یکی از مزیت‌های این نوع پوشش ها، نفوذپذیری بالای آن نسبت به اکسیژن است که بهبود زخم را تسریع می‌کند. علاوه بر موارد فوق، این‌گونه از پوشش‌ها قادرند آب را جذب کرده و به‌طور طبیعی در اثر آنزیم‌های بدن تجزیه شوند و نیازی به برداشت پوشش، بعد از بهبود زخم نیست [۱۰]. تهیه زخم‌پوش از هیدروژل در سامانه‌های رهایش دارو و پانسمان‌ها، سبب افزایش سرعت بهبود زخم می‌شود. آلژینات نیز به دلیل داشتن خواصی مانند بندآورندگی خون از طریق تشکیل ژل، زیست‌سازگاری، غیرسمی بودن و خاصیت زیست‌فعالی در زخم‌پوش‌ها استفاده می‌شود [۱۱، ۱۲].

تحقیقات بسیاری درخصوص تولید زخم‌پوش‌های پایه پلیمری انجام شده است. آلژینات‌های جذب‌شونده و زیست‌تخریب‌پذیر از جلبک‌های دریایی به‌دست می‌آیند. در این نوع آلژینات‌ها میزان جذب به قدرت ژل‌شوندگی آنها وابسته بوده که به شدت می‌تواند ترشحات زخم را به خود جذب نماید. هنگامی که یک پانسمان آلژینات برروی زخم قرار می‌گیرد، به دلیل تبادلات یونی بین آلژینات و خون، یک لایه محافظ را بر روی زخم تشکیل می‌دهد. به‌طور کلی پانسمان آلژینات برای زخم‌های با ترشحات متوسط تا زیاد مناسب‌تر از زخم‌های خشک نظیر سوختگی‌های درجه ۳ و غیره هستند Sorbsan™, Kaltostat™, Algisite™. ازجمله برخی انواع محصولات پانسمان آلژینات تجاری‌شده هستند [۱۳].

دریک تحقیق صورت‌گرفته در سال ۲۰۱۵ از محلول آلژینات حاوی روغن درخت چای و محلول کلسیم کلراید به عنوان یک پانسمان نوین استفاده شده است. در این تحقیق ابتدا محلول آلژینات برروی موضع زخم اسپری می‌شود و پس از آن به منظور تهیه یک هیدروژل و محافظت از زخم، محلول کلسیم کلراید بر روی آن اسپری می‌شود. این عمل باعث برقراری پیوندهای شبکه‌ای بینابینی در میان زنجیره‌های آلژینات شده و باعث شکل‌گیری ساختار هیدروژل‌مانند می‌شود. نتایج به‌دست‌آمده از ارزیابی‌ها نشان می‌دهد که این نوع پانسمان دارای اثر ضدمیکروبی بسیار خوبی برروی فعالیت باکتری‌های اشرشیاکولی بوده و می‌تواند به عنوان یک زخم‌پوش زیست‌فعال مورد استفاده قرار گیرد [۱۴].

یکی از جنبه‌های مهم در امر درمان زخم میزان حذف ترشحات است. هرچه این میزان بیشتر باشد، میزان رشد باکتری‌ها در سطح زخم کمتر بوده و درنتیجه فرآیند درمان سریع‌تر انجام می‌شود. زخم‌پوش‌های زیستی دارای مزایایی ازجمله تشکیل قسمتی از ماتریس بافت طبیعی و زیست‌تخریب‌پذیری هستند و نقش فعالی نیز در بهبود زخم و تشکیل بافت جدید دارند [۱۵]. توجه به این نکته نیز حائز اهمیت است که هرچه بستر برای نفوذ سلول به داخل ماتریس بیشتر باشد، احتمال لانه‌گزینی و تکثیر نیز بیشتر است به همین منظور استفاده از هیدروژل‌ها همواره می‌تواند به یک گزینه مهم در این امر تلقی شود. به عنوان مثال در سال ۲۰۱۴، *Sood* گزارش کرده است که پانسمان‌های زخم پلیمری مبتنی بر هیدروژل، بهبود زخم بیمار را توسط تسریع و افزایش

اپیتلیوم‌سازی، تسهیل می‌کنند. ازاین‌رو تعداد زخم‌های بهبودیافته با پانسمان هیدروژلی، ۸۵٪ در مقایسه با بهبود ۵۰٪ پانسمان‌های گاز سنتی بودند [۱۶].

نکته مهم در بحث پانسمان‌های آلژینات، میزان قابلیت ژل‌شوندگی آنها است که عموماً ممکن است بسته به مدت زمان مورد نیاز جهت حضور پانسمان، از طریق مکانیسم‌های مختلفی این زمان کمتر یا بیشتر شود. به عنوان مثال ممکن است در جایی نیاز باشد تا میزان ژل‌شوندگی آن کاهش یافته یا نیاز باشد در زخم‌هایی میزان جذب بالا باشد. به عنوان مثال در یک تحقیق هیدروژل‌های مختلف از کلسیم آلژینات را که همگی دارای درصدهای مختلفی از کلسیم بودند، تهیه کرده و با کیتوسان هیدروکلراید پوشش دادند. این عمل باعث تغییر در میزان رهایش داروی بارگذاری‌شده در آنها شده و توانستند میزان رهایش داروی آبدوست بارگذاری‌شده در آلژینات را در مدت زمان بیشتری کنترل کنند [۱۷].

درنهایت می‌توان چنین ادعا نمود که جراحات، ازجمله آسیب‌هایی هستند که فرآیند درمان آنها نیاز به صرف زمان و مراقبت زیادی داشته و همچنین خونریزی‌های شدید به‌وجودآمده در آنها چه در عملیات‌های نظامی و چه در آسیب‌هایی که برای مردم عادی رخ می‌دهد، می‌تواند آسیب‌های جبران‌ناپذیری نظیر مرگ، اغما و غیره را به همراه داشته باشد. این نیاز همواره وجود دارد تا در کمترین زمان، بتوان از مهم‌ترین علل این آسیب‌ها یعنی خونریزی جلوگیری کرد. قرارگیری اسپری پانسمانی معرفی‌شده در این پژوهش در سبد درمانی می‌تواند به نحو مؤثری بر تقویت توان تولید داخل در بخش بهبود زخم‌ها اثرگذار باشد و درنتیجه در آینده پرسنل نیروهای مسلح درگیر در حوادث، سایر افراد جامعه نظیر بخش اورژانس و هلال احمر در شرایط بسیار سخت و غیرعادی بتوانند به راحتی از این محصول جهت بهبود زخم و جلوگیری از خونریزی استفاده کنند. این پژوهش با هدف طراحی و ساخت اسپری پانسمان بر پایه آلژینات/کلسیم کلرید/ ژلاتین آلژینات جهت کنترل خونریزی و بهبود زخم انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش تجربی در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه امیرکبیر از آذرماه سال ۱۳۹۸ تا بهمن‌ماه سال ۱۳۹۹ انجام شد. در این پژوهش ابتدا محلول بافر فسفات نمکی (PBS) از طریق انحلال قرص‌های PBS تهیه‌شده در ۱۰۰ یا ۵۰۰ میلی‌لیتر آب آماده شد. سپس فرآیند سترون‌سازی آنها از طریق اتوکلاو انجام شد. جهت آماده‌سازی محلول نمک MTT، ابتدا ۵ میلی‌گرم نمک تترازولیوم را دریک میلی‌لیتر محلول PBS سترون‌شده حل کردیم. سپس به منظور تهیه ۴ میلی‌لیتر محلول نمک MTT، ابتدا ۳/۶ میلی‌لیتر محیط DMEM بدون FBS و محتوی یک درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین را تهیه کردیم و با ۴۰۰ میکرولیتر محلول نمک تترازولیوم ترکیب کردیم. درنهایت محلول نمک MTT به‌دست‌آمده را از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور دادیم و تا زمان مصرف به صورت فویل‌پیچ شده در یخچال نگهداری کردیم [۱۸]. مواد مورد استفاده در این پژوهش از قبیل آلژینات سدیم، ژلاتین، کلسیم کلراید از شرکت Merck خریداری شد. محیط کشت DMEM، سرم جنین گاو و قرص PBS از شرکت Gibco خریداری شد. ترکیبات Celllytic، pNPP و رنگ تریپان بلو از سیگما الدریچ تهیه شدند. از جمله تجهیزات و دستگاه‌های مورد استفاده در این پژوهش می توان به pHمتر، انکوباتور و میکروسکوپ نوری معکوس اشاره نمود. طیف‌سنج مادون قرمز مدل Perkin Elmer Corp. spectrometer شرکت Norwalk کشور آمریکا به منظور بررسی طیف FTIR هیدروژل آلژینات-ژلاتین مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه‌سازی: به منظور تهیه پانسمان اسپری‌شونده بر پایه آلژینات، لازم است تا میزان غلظت محلول آن به گونه‌ای باشد که امکان خروج آن از منفذ خروجی اسپری فراهم باشد. لذا در این خصوص غلظت‌های مختلف از آلژینات بر اساس مقالات منتشرشده تهیه شد (۰/۵٪ و ۱٪ و ۲٪ و ۴٪ و ۸٪). عمده مقالات بر میزان محلول آلژینات ۰/۵٪ وزنی-حجمی تأکید داشته‌اند [۱۴، ۱۹] اما پس از تهیه محلول اولیه آلژینات و اسپری آن، در کنار محلول اولیه کلسیم کلراید ۰/۵٪ مشخص گردید که این میزان بسیار کمتر از مقداری است که امکان تشکیل ژل توسط پانسمان فراهم باشد. لذا به منظور تهیه محلول پایه آلژینات و کلسیم کلراید در دمای محیط، ابتدا به مرور غلظت آلژینات افزایش داده شد تا جایی که بتواند در شرایط دمایی محیط (از ۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد) قابلیت خروج از نازل اسپری را داشته باشد. به همین دلیل نمونه‌های ۴٪ و ۸٪ آلژینات به دلیل ویسکوزیته بالا و عدم خروج از اسپری حذف شدند و درنهایت مقدار آلژینات ۲٪ وزنی-حجمی به عنوان غلظت بهینه انتخاب شد.

جدول ۱) نمونه‌ها به همراه متغیرهای درنظر گرفته‌شده

نام گروه	آلژینات	ژلاتین	کلسیم کلراید
AGC1	٪۲	٪۲	٪۴
AGC2	٪۲	٪۴	٪۴
AGC3	٪۲	٪۴	٪۸
AGC4	٪۲	٪۸	٪۸

جدول ۲) نمونه‌های حذف‌شده از چرخه ارزیابی و دلایل مربوط به آن

آلژینات	ژلاتین	کلسیم کلراید	دلیل حذف نمونه
٪۲	٪۲	٪۲	کم‌بودن غلظت کلسیم و عدم تشکیل ژل با استحکام اولیه مناسب
٪۲	٪۲	٪۸	رسوب کلسیم بعد از ۲۴ ساعت خشک‌کردن اولیه و عدم کارایی مناسب
٪۲	٪۴	٪۲	کم‌بودن غلظت کلسیم و عدم تشکیل ژل با استحکام اولیه مناسب به دلیل اثر مهاری ژلاتین
٪۲	٪۸	٪۲	کم‌بودن غلظت کلسیم و عدم تشکیل ژل با استحکام اولیه مناسب به دلیل اثر مهاری ژلاتین
٪۲	٪۸	٪۴	کم‌بودن غلظت کلسیم و عدم تشکیل ژل با استحکام اولیه مناسب به دلیل اثر مهاری ژلاتین

همچنین مطابق با کارهای انجام‌شده در زمینه تهیه ژل آلژینات، غلظت برابر با غلظت آلژینات به عنوان اولین درصد از کلسیم کلراید انتخاب شد و به مرور به صورت دو برابری تا جایی که امکان اسپری‌شدن و عدم تشکیل رسوب در سطح ژل فراهم باشد، غلظت کلسیم کلراید افزایش داده شد. بنابراین سه غلظت مختلف از کلسیم کلراید (۲٪ و ۴٪ و ۸٪) به عنوان نمونه‌های مورد آزمایش انتخاب شدند. از طرفی به منظور دست‌یابی به آلژینات ژلی با استحکام مناسب به نسبت برابر از غلظت‌های کلسیم کلراید، محلول آبی ژلاتین (۲٪ و ۴٪ و ۸٪) جهت کوپلیمرسازی با آلژینات تهیه گردید؛ چراکه حضور ژلاتین می‌تواند موجب تقویت ساختار ژلی و عاملی جهت افزایش سرعت ترمیم زخم باشد. در

جدول ۱ مقادیر انتخاب‌شده جهت آزمون و ارزیابی امکان ژل‌شدن آورده شد. لازم به ذکر است نمونه‌های حاوی ۲٪ کلسیم کلراید با ۲ و ۴ درصد ژلاتین به ترتیب به دلیل عدم ایجاد ژل با استحکام اولیه مناسب و عدم تشکیل ژل (به دلیل اثر مهاری ژلاتین ۴٪ در نفوذ کلسیم به داخل آلژینات) از چرخه ارزیابی حذف شدند (جدول ۲).

پاساژ دادن سلول‌ها: کشت سلول براساس استاندارد ISO 10993 انجام شد. پس از اینکه کف فلاسک به لحاظ تعداد سلول تکثیریافته، تقریباً ۸۰٪ کف فلاسک را پوشاند(Confluency)، سلول‌ها با محلول PBS استریل شستشو داده شده و دو میلی‌لیتر آنزیم تریپسین به آن زده شد. لازم به ذکر است چون فلاسک مورد استفاده از نوع T75 بود، این مقدار برای آن در نظر گرفته شد. پس از آن فلاسک برای مدت ۵-۳ دقیقه به انکوباتور منتقل شد و به منظور تأیید جداشدن سلول‌ها از کف فلاسک از میکروسکوپ نوری معکوس استفاده شد. با توجه به اینکه همچنان تعدادی از سلول‌ها از کف جدا نشده بودند، چند ضربه به دیواره فلاسک زده شد تا تمامی سلول‌ها به حالت گرد، که نشان‌دهنده جدایش آنهاست، در زیر میکروسکوپ دیده شود. سپس ۴ میلی‌لیتر محیط DMEM+15%FBS به آن زده شد تا آنزیم خنثی شود. سلول‌ها به فالکون ۱۵ میلی‌لیتر منتقل شده و برای مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شدند. محیط رویی خارج و دوباره سلول‌ها در ۳ میلی‌لیتر محیط شناور شدند. مقداری از سلول‌ها جهت بررسی‌های آینده در نیتروژن مایع، منجمد و ذخیره شدند و بقیه سلول‌ها برای مطالعات برون‌تنی مورد استفاده قرار گرفتند.

منجمد کردن سلول‌ها: ابتدا محلول FBS+10% DMSO تهیه شد و سپس تعداد 10^6 سلول به هر میلی‌لیتر محلول تهیه‌شده اضافه شد و به لوله کرایوی ۱/۸ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس سلول‌ها برای مدت ۳ ساعت در فریزر ۲۰- سانتی‌گراد و بعد در فریزر ۷۰- سانتی‌گراد منجمد شدند. درنهایت پس از ۲۴ ساعت سلول‌های منجمد به تانک نیتروژن ۱۹۶- سانتی‌گراد منتقل شدند.

سترون‌سازی: با توجه به اینکه لازم بود تا پانسمان‌ها پیش از شروع ارزیابی‌های سلولی، سترون شوند؛ این فرآیند از دو طریق صورت گرفت. اولاً شرایط تولید در فضای کنترل‌شده زیر هود شیمیایی روشن انجام شد و ثانیاً نمونه‌ها پس از اسپری و خشک شدن با غوطه‌وری در اتانول ۷۰ درصد انجام شد. به این صورت که نمونه‌ها بعد از برش به ابعاد مشخص، برای مدت ۱۵ دقیقه در اتانول غوطه‌ور شده و سپس ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با محلول PBS استریل، شسته شدند.

بارگذاری سلول‌ها روی پانسمان: پس از تکثیر سلول‌های بنیادی بافت پوست موشی به میزان مورد نیاز، از کف فلاسک جدا کرده و تعلیق سلولی به همراه FBS فیلترشده تهیه شد. پانسمان‌ها را درون پلیت ۴۸خانه قرار داده و تعداد ۱۰۰۰۰ سلول روی هر یک از آنها نشانده شد. پس از گذشت ۴۵ دقیقه از زمان سلول‌نشانی و قراردادن پانسمان در انکوباتور، مقداری محیط به هر یک از چاهک‌ها اضافه و درون انکوباتور قرار داده شدند. لازم به ذکر است در هر پلیت، ۳ چاهک فاقد نمونه به عنوان کنترل منفی درنظر گرفته شد تا تغییرات احتمالی ناشی از دستگاه‌ها و تجهیزات نیز قابل ثبت باشد. همچنین هر ۳ الی ۴ روزیک بار محیط رویی تمام چاهک‌ها تعویض می‌شد.

ملاحظات اخلاقی: کلیه ارزیابی‌های زیستی براساس استاندارد ISO 10993 انجام شدند.

بررسی پیوندهای موجود در پانسمان توسط FTIR: به منظور بررسی پیوندهای شیمیایی میان اجزا مختلف پانسمان از ابزار FTIR استفاده شد. به این منظور ابتدا از ژلاتین و آلژینات طیف‌نگاری شد و درنهایت پس از ساخت محلول‌ها نیز طیف فروسرخ (IR) گرفته شد. تمامی پیک‌ها و قله‌ها بر اساس منابع تحلیل و بررسی شدند [۲۰].

بررسی تخریب‌پذیری پانسمان: در این قسمت میزان تورم پانسمان که ناشی از نفوذ آب است، مورد ارزیابی قرار گرفت. ارزیابی‌های نهایی می‌بایست از روند تخریب پانسمان‌ها در نتیجه غوطه‌وری در محلول بافر فسفاتی انجام گیرد. علاوه بر موارد ذکرشده بررسی تغییرات pH ناشی از تخریب آنها، امری ضروری جهت جلوگیری از بروز تغییرات شدید است. هدف از انجام این مطالعات بررسی تخریب پانسمان‌ها بود.

بررسی جذب آب: باتوجه به گزارشات منتشرشده در منابع، آب‌دوستی اجزا تشکیل‌دهنده باعث تغییر در رفتار تورم‌پذیری پانسمان‌های پایه آلژینات و ظرفیت جذب بالای آب حتی بیشتر از وزن اولیه‌شان می‌شود [۲۲].

بررسی تغییرات وزن و pH: نکته جالب توجه درخصوص عملکرد پانسمان، توانایی جذب رطوبت آنها در محیط زخم است و این فاکتور از طریق تغییرات وزن پانسمان قابل بررسی است. همچنین اثرات واکنش‌های شیمیایی در طول فرآیند تخریب به وسیله بررسی تغییرات PH مشخص می‌شود.

مطالعه خواص فیزیکی: یکی از پارامترهای مهم در بررسی پانسمان اسپری‌شونده، مدت زمان تشکیل ژل و میزان آن است. از طرفی ژل حاصل از آن باید به گونه‌ای باشد که امکان عبور بخار و تنفس سلولی جهت جایگزینی بافت جدید و نوسازی بافتی فراهم باشد. در این بخش ابتدا به تعیین زمان ژلینگی و میزان تشکیل ژل پرداخته شد و سپس عملکرد پانسمان به لحاظ ساختاری و خلل و فرج در عبور میزان بخار پرداخته شد. زمان ژلینگی در حقیقت بازه زمانی لازم جهت باز ایستادن آهنربای درحال چرخش به جهت ممانعت به وجود آمده از ژل تشکیل‌شده است.

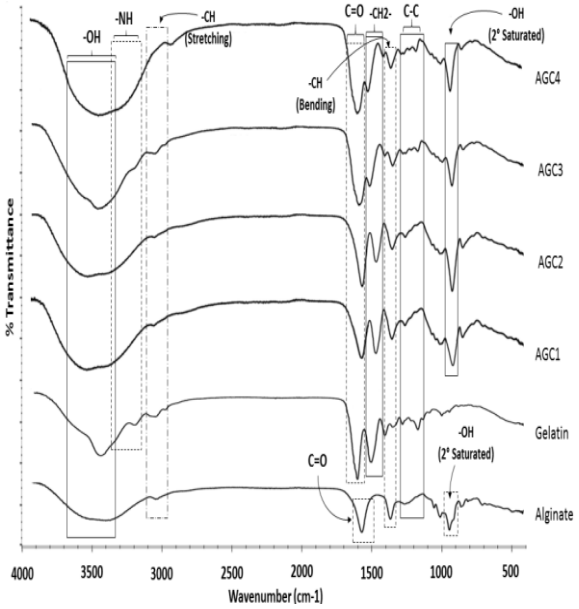
مطالعه ریزساختار (SEM): از آنجا که پانسمان‌ها به صورت ژل‌ها آبدار بوده و در دستگاه SEM می‌بایست تحت خلأ و روکش طلا قرار گیرند، به ناچار جهت مطالعه ساختار، نمونه‌ها تحت خشک‌کن انجمادی قرار گرفته و سپس جهت روکش دادن و شکل‌برداری، ارسال شدند.

مطالعه پاسخ زیستی برون‌تنی: به جهت بررسی رفتار برون‌تنی پانسمان‌ها لازم است تا در مجاورت با سلول‌ها قرار گرفته و نوع عملکرد آنها مشخص شود. به این منظور آزمون‌های زنده‌مانی سلولی (MTT) و چسبندگی سلول‌ها به سطح پانسمان مطابق با استاندارد ISO-10993 انجام شدند. آزمون MTT جهت بررسی رفتار سمیت پانسمان‌ها استفاده شد. به منظور بررسی رفتار چسبندگی سلول‌ها به سطح پانسمان‌ها، پس از کشت به مدت ۴ روز، تصاویر SEM از آنها در دو بزرگنمایی ۵ و ۳۰ میکرون تهیه شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی پیوندهای موجود در پانسمان به روش FTIR: طیف FTIR نمونه‌ها مطابق با شکل ۱ به‌دست آمد. در تمامی نمونه‌ها، پیک ظاهرشده در محدوده $3650-3350\ cm^{-1}$

مربوط به گروه هیدروکسیل بود که شدت آن بسته به میزان غلظت آن در نمونه متفاوت به‌دست آمد. بر این اساس در نمونه AGC4 به علت حضور بیشتر ژلاتین، شدت آن بیشتر بود اما در نمونه AGC1 درنتیجه برهم‌کنش π-π گروه‌های هیدروکسیل آلژینات با ژلاتین این قله ضعیف‌تر دیده شد. حضور برخی ناخالصی‌ها و عیوب ساختاری در مواد اولیه باعث شد تا در کل طیف‌ها پیک‌های پراکنده اما ضعیفی مشاهده شود (شکل ۱). با این وجود نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده سنتز درست بود [۲۱]. با توجه به اینکه تقریباً گروه‌های عاملی موجود در دو ترکیب ژلاتین و آلژینات مشابه با یکدیگر بودند، لازم بود تا به دنبال پیک تمایزدهنده‌ای در بین این ساختار باشیم. در ساختار آلژینات حلقه‌های اکسیژن‌دار وجود داشتند و این درحالی بود که در ژلاتین توالی از گروه‌های عاملی کربوکسیل و آمین وجود داشت و همین موضوع سبب بروز برخی پیک‌های تمایزدهنده در بین این دو ساختار شد.



شکل ۱) نتایج حاصل از آزمون FTIR نمونه‌ها

حضور CH_2- آلیفاتیک در ساختار می‌تواند باعث ظهور پیک در طیف جذب IR مواد در عدد موج cm^{-1} ۱۴۰۰-۱۵۰۰ شود. انتظار ظهور چنین پیکی با درنظرگرفتن ساختار ژلاتین وجود داشت اما با توجه به اینکه محل ظهور این پیک می‌توانست با گروه‌های متیل و متیلن متقارن و نامتقارن هم‌پوشانی داشته باشد، امکان تفکیک آن به صورت دقیق وجود نداشت. بر این اساس و با توجه به ساختار آلژینات و ژلاتین می‌توان نتیجه گرفت که ساختار ماده مورد استفاده مورد تأیید بود و پس از محلول‌سازی نیز این گروه‌ها حفظ شدند.

همان‌طور که در طیف‌های شکل ۱ مشاهده می‌شود، به دلیل حضور گروه‌های آمینی و کربوکسیلیک در ساختار ژلاتین، میزان برهمکنش بین زنجیرهای ژلاتین و گروه‌های هیدروکسیل آلژینات در طیف‌های AGC1 و AGC2 و AGC3 و AGC4، طیف ظاهرشده در عدد موج cm^{-1} ۳۲۰۰-۳۶۰۰ بسیار پهن و با شدت زیاد بود. همچنین با توجه به ظهور پیک شاخص الکلی در تمامی نمونه‌ها، می‌توان گفت که ساختار آلژینات نیز بدون تغییر در پانسمان‌ها باقی ماند.

براساس مشاهده الگوی ظهور قله‌ها در عدد موج cm^{-1} ۳۲۰۰-۳۶۰۰ که مربوط به گروه‌های N-H و OH- بود، در هر سه نمونه AGC2 و AGC3 و AGC4 در مقایسه با گروه AGC1، قله ظاهرشده پهن و با شدت زیاد بود که می‌توانست ناشی از طبیعت آب‌دوست ژلاتین و تأییدکننده اشغال‌شدن زنجیرهای آلژینات به وسیله آن باشد (شکل ۱)؛ بنابراین می‌توان انتظار داشت که هرچه میزان ژلاتین در پانسمان‌ها بیشتر شود، ظرفیت تورم بیشتر و تخریب سریع‌تر باشد.

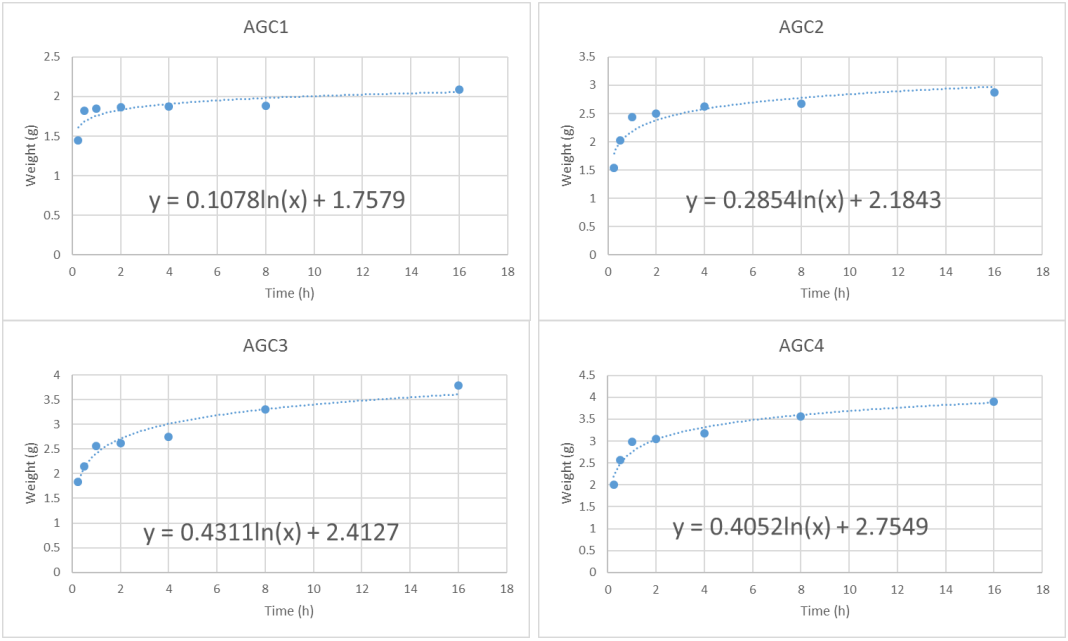
جدول ۳) مقادیر بیشینه جذب آب پانسمان‌ها و زمان رسیدن به آن | (زمان رسیدن به بیشینه: ۱۶ ساعت)

نمونه	بیشینهٔ درصد جذب آب (M±SD)	نرخ جذب آب (gr/h)
AGC1	۲۲۰/۰±۸۹/۰۳۲	۰/۱۰۷۸
AGC2	۳۰۴/۰±۸۵/۰۴۲	۰/۲۸۵۴
AGC3	۳۹۲/۰±۴۵/۰۱۹	۰/۴۳۱۱
AGC4	۳۳۸/۰±۲۶/۰۲۴	۰/۴۰۵۲

جدول ۴) نرخ تخریب پانسمان‌ها
(زمان رسیدن به بیشینه تخریب:۱۹۲ ساعت)

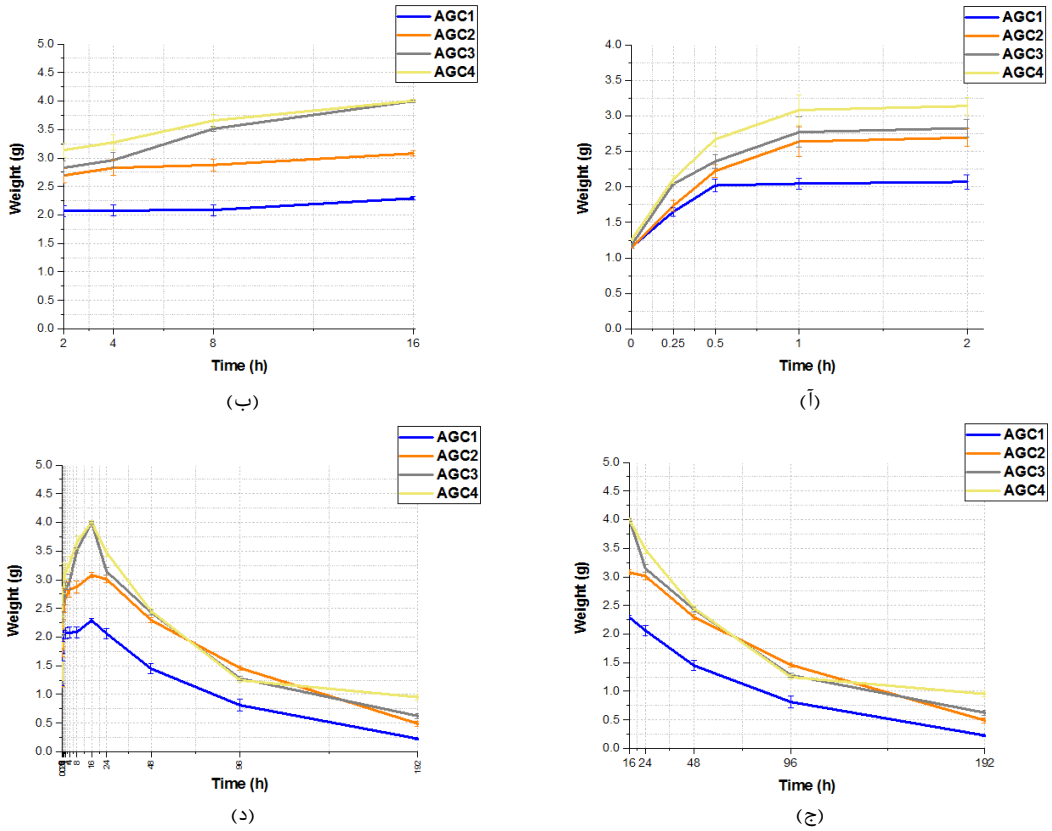
نمونه	AGC1	AGC2	AGC3	AGC4
نرخ تخریب (gr/h)	۰/۰۰۸	۰/۰۱	۰/۰۱۱	۰/۰۱۳

نتایج حاصل از مطالعه تخریب‌پذیری پانسمان: با وجود مشابهت روند کلی تخریب نمونه‌ها، تفاوت در میزان تراکم ساختاری پانسمان‌ها، ساختار شیمیایی، میزان آزادی زنجیرهای ژلاتین منجر به تفاوت در برخی نواحی شیب منحنی‌ها شد. از آنجا که نمونه‌ها جهت بررسی روند تخریب، به طور دائم درحال به هم خوردن بر روی شیکر و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بودند، تخریب عمدتاً برمبنای تخریب هیدرولیتیکی بود زیرا از هیچ گروه آنزیمی در روند تخریب استفاده نشد و نقش تخریب حرارتی چندان شاخص نبود. مطابق با شکل ۳، فرآیند تخریب نمونه‌ها به صورت تابعی نمایی بود که در آن ضریب x به عنوان نرخ تخریب معرفی شد. در جدول ۴ نرخ تخریب تمامی نمونه‌ها ثبت شد. هرچه میزان ژلاتین و یون‌های کلسیم کلراید، که به عنوان عوامل کنترل‌کننده در تخریب پانسمان ژلی حاصل از آلژینات بودند، بیشتر باشد، فرآیند از بین رفتن ژل حاصل از آلژینات نیز بیشتر بود که درنتیجه روند درمان بافت جدید و ترمیم زخم را با اخلال مواجه خواهد کرد. لذا در این خصوص می‌بایست نرخ تخریب با نرخ جایگزینی بافت جدید متعادل باشد. اگرچه تخریب آنزیمی به دلیل پیچیدگی‌های آزمایشی امکان انجام نداشت اما همین نتایج نشان دادند که در نمونه AGC3 روند تخریب نه به کندی نمونه AGC1 بود و نه به اندازه AGC4 به سرعت متورم و تخریب شد. بنابراین با توجه به نتایج این بخش، نمونه‌های AGC3 و AGC2 رفتار بهتری در برابر نفوذ آب، تورم و تخریب از خود نشان دادند.



شکل ۲) معادله نرخ جذب آب توسط پانسمان‌ها

نتایج حاصل از بررسی میزان جذب آب: مطابق با جدول ۳ بیشینه درصد جذب آب به ترتیب AGC1<AGC2<AGC4<AGC3 بود. در بین پانسمان‌ها AGC3 بیشترین درصد جذب را داشت که پس از گذشت ۱۶ ساعت اتفاق افتاد؛ این مطلب تأییدکنندهٔ نتایج قبل نیز بود. ارزیابی جذب آب در بازه ۸روزه صورت گرفت. اما با توجه به ماهیت آب‌دوست اجزا تشکیل‌دهنده و همچنین انسجام پایین ژل در برابر آب، تمامی نمونه‌ها تقریباً پس از ۱۶ ساعت روند نزولی جذب آب و افزایش تخریب در پیش گرفتند که این موضوع به تفصیل در بخش‌های بعدی شرح داده شد. بنابراین سرعت تخریب نمونه‌ها و همچنین میزان جذب آب آنها که یکی از پارامترهای مهم در فرآیند ترمیم جراحات است، به میزان قابل توجهی با سرعت طبیعی بدن همسو بود.

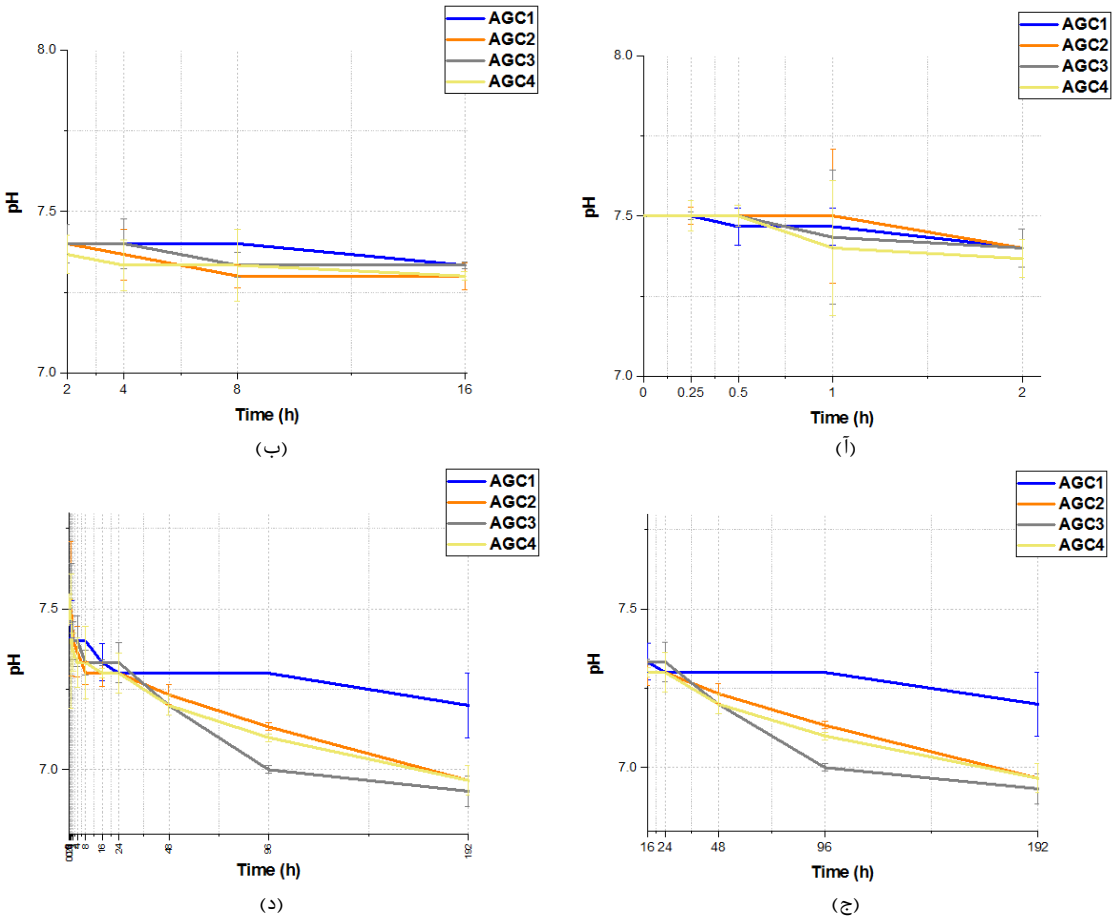


شکل ۳) تغییرات وزن ناشی از تخریب پانسمان‌ها

در شکل ۲ معادله نرخ جذب هر پانسمان تشریح شد. ضریب x در معادلات مربوط به بررسی نرخ جذب آب در پانسمان‌ها بیانگر شیب معادلات لگاریتمی هر مدل بود. همان‌طور که پیش‌تر نیز در جدول ۳ نشان داده شد، میزان درصد جذب آب در پانسمان AGC3 بیشترین مقدار (۰/۰۱۹±۳۹۲/۴۵۰) را داشت که این مطلب با توجه به ضریب x در معادله مربوط به آن یعنی ۰/۴۳۱۱ منطقی بود و بیانگر بیشترین میزان جذب و بیشترین نرخ جذب آب بود. از طرف دیگر در نمونه AGC1 که کمترین مقادیر ژلاتین و کلسیم کلراید را داشت و به تبع آن میزان برقراری اتصالات عرضی کمتری در بین زنجیرهای آلژنات اتفاق افتاد، نرخ جذب آب برابر ۰/۱۰۷۸ بود.

نتایج حاصل از بررسی تغییرات وزن و pH: روند تخریب نمونه‌ها در شکل ۳ نشان داده شد. تورم و افزایش وزن تمامی نمونه‌ها در مدت یک ساعت ابتدایی به صورت صعودی با شیب بسیار سریع بود. شیب افزایش وزن نمونه‌ها از ساعت ابتدایی تا ساعت ۴ ارزیابی، به کندی بیشتر شد. این روند افزایش وزن تا مدت ۱۶ ساعت برای تمامی نمونه‌ها به جز گروه AGC1 ادامه پیدا کرد و پس از آن تا روز ۸ام دچار کاهش وزن شدند.

نمودار زرد رنگ مربوط به گروه AGC4، پیوسته تا روز ۱۶ام درحال افزایش وزن بود و پس از آن دچار کاهش وزن شد اما در سایر نمونه‌های محتوی ژلاتین و کلسیم کلراید افزایش وزن تقریباً از همان ساعات ابتدایی غوطه‌وری با یک شیب ملایم افزایش یافت، این رفتار کاملاً قابل توجیه است زیرا گروه‌های عاملی موجود در زنجیرهای ژلاتین باعث جذب زیاد مولکول‌های قطبی آب شده و درنتیجه بر روی رفتار فیزیکی و پیوندهای شیمیایی پانسمان تأثیرگذار است و مانع از کنترل آلژینات در برابر تخریب و ازبین رفتن انسجام ساختار می‌شود. رابطه مستقیمی بین کاهش وزن مولکولی و کاهش وزن در پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر در طول زمان حاکم بود. بخشی از فرآیند تخریب که با تغییر در تورم و pH قابل ردیابی بود با کاهش طول زنجیره ژلاتین رخ داد که منجر به کنترل تخریب و درمعرض محیط قرارگرفتن بیشتر زنجیرهای ژلاتین شد.



شکل ۴) تغییرات pH پانسمان‌ها

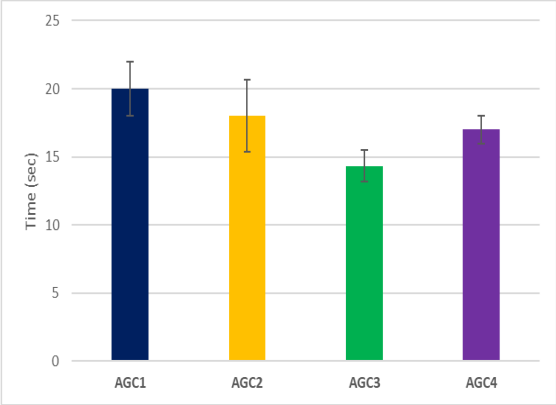
بر اساس شکل ۳، روند تخریب نمونه‌ها را به طور کلی می‌توان به چهار مرحله تقسیم‌بندی کرد. مرحله اول، نفوذ آب و یون‌های PBS به داخل ساختار بود. وزن پانسمان تقریباً از بازه زمانی صفر تا ۴ ساعت ابتدایی افزایش یافت و تقریباً تخلخل‌ها از محلول پر شدند. درحله دوم، جداشدن زنجیرهای ژلاتین و تغییر فیزیکی ساختار بود. مجموع مرحله اول و دوم را می‌توان به عنوان فاز متورم‌شدن (Swelling) مشخص کرد. به مرور زنجیرهای ژلاتین با نفوذ بیشتر محلول به داخل ساختار پس از ساعت چهارم غوطه‌وری تا ساعت هشتم غوطه‌وری، از ساختار آزاد شده و منجر به تورم پانسمان‌ها و تحرک آزادانه‌تر زنجیرهای ژلاتین شدند. مرحله سوم، انحلال (Dissolution) انجام شد. تقریباً تمامی نمونه‌ها به جز گروه AGC1 درنتیجه حضور آب و یون‌ها در بین

زنجیرهای ژلاتین، با اجزا ساختار در بازه هشت تا ۱۶ ساعت برهمکنش کردند و pH محلول افت شدیدتری به دنبال آزادشدن زنجیرهای ژلاتین و یون‌های کلسیم و سدیم داشت. با وجود مقادیر زیاد زنجیرهای ژلاتین و نقش غالب برهمکنش بین یون‌های زیادتر کلسیم و آلژینات باعث شد که این اتفاق در گروه AGC4 سریع تر رخ دهد. مرحله چهارم نیز تجزیه انجام شد؛ زنجیرهای ژلاتین به مرور درنتیجه برهمکنش با یون‌های آزاد محیط نظیر OH^- کوچکتر شدند و درنهایت پس از زمان ۱۶ ساعت تا پایان روزهشتم (۱۹۲ ساعت) نمونه‌ها دچار تجزیه شدند و پیوند بین تمامی ذرات (آلژینات و ژلاتین و کلسیم کلراید) باز شد. در این حین pH به سمت نزولی حرکت کرد. مونومرهای ژلاتین با توجه به ماهیت اسید آمینه بودنشان و یون‌های آزاد حاصل از هیدرولیز آلژینات و یون‌های کلسیم کلراید هر یک به نوبه خود توان تغییر pH محیط را داشتند که تمامی این عوامل باعث شد تا روند تخریب با ازبین رفتن خاصیت بافری محلول سریع‌تر صورت پذیرد.

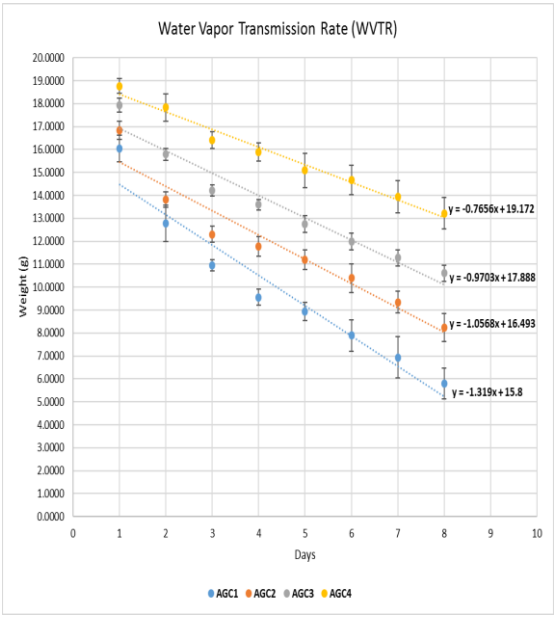
شکل ۴ نمودار pH مربوط به نمونه‌ها را نشان می‌دهد. از آنجا که ژلاتین محتوی گروه‌ها، باردار بود ، آزادشدن آنها در محیط، منجر به تغییر pH و افت pH ابتدایی (بازه صفر تا هشت ساعت) شد. در محیط بدن نیز، محلول‌ها نقش بافری داشته و این تغییر چندان قابل اهمیت نیست و این تغییر بسیار کوچکتر از آن بود که بتواند تغییر زیادی را در pH مایعات بدن ایجاد کند. با این وجود تحقیقات درون‌تنی اهمیت این مطلب را شفاف‌تر نشان خواهد داد. احتمال بروز تغییرات ناگهانی در pH با افزایش سرعت تخریب پانسمان بیشتر می‌شود. بنابراین سرعت تخریب نمونه AGC4 بیشترین مقدار و AGC1 کمترین مقدار را داشت.

نتایج حاصل از بررسی خواص فیزیکی

تعیین زمان ژلینگی: مطابق با شکل ۵، نمونه‌های مختلف بسته به میزان مواد موجود در آنها و مکانیسم به‌وجودآمده در بین مولکول‌های آلژینات و ژلاتین، رفتارهای مختلفی از تشکیل ژل از خود نشان دادند. در گروه AGC1 به دلیل غلظت پایین ژلاتین، این انتظار وجود داشت که تشکیل بلوکه‌های ژلاتینی در بین زنجیرهای آلژینات در حین فرآیند تشکیل ژل کمتر باشد که درنتیجه می‌توانست افزایش زمان ژلینگی را به همراه داشته باشد. تشکیل ژل پس از اسپری محلول حاوی کلسیم کلراید و ژلاتین بر روی آلژینات در مدت زمان طولانی‌تری نسبت به بقیه گروه‌ها به وجود آمد که ناشی از جایگزینی آهسته یون‌های سدیم با یون‌های کلسیم بود (شکل ۵). از طرف دیگر افزایش ژلاتین و کلسیم کلراید در سیستم به دلیل نقطه ایزوالکتریک تقریباً اسیدی ژلاتین (در حدود ۴/۸) باعث جذب بیشتر یون سدیم و به تبع آن جذب بیشتر یون کلسیم توسط آلژینات شد که این موضوع در دو گروه AGC3 و AGC4 به دلیل افت بیشتر زمان ژلینگی به طور کامل مشهود بود. باید توجه داشت که این افزایش میزان ژلاتین تا یک میزان مؤثر بود و پس از مقداری روند عکس از خود نشان داد [۲۳]. همان‌طور که نمونه AGC4 مشاهده شد، به دلیل اشباع زنجیرهای ژلاتین از یون کلسیم، تمایل جهت برهمکنش با یون‌های سدیم کاهش یافت و درنتیجه میزان کلسیم کمتری در اختیار زنجیرهای آلژینات قرار گرفت؛ که این موضوع منجر به افزایش زمان ژلینگی گروه AGC4 نسبت به گروه AGC3 شد. بنابراین نمونه AGC3 در مقایسه با سایر نمونه‌ها مدت زمان تشکیل ژل بهتری را از خود نشان داد.



شکل ۵) بررسی مدت‌زمان تشکیل ژل در نمونه‌ها



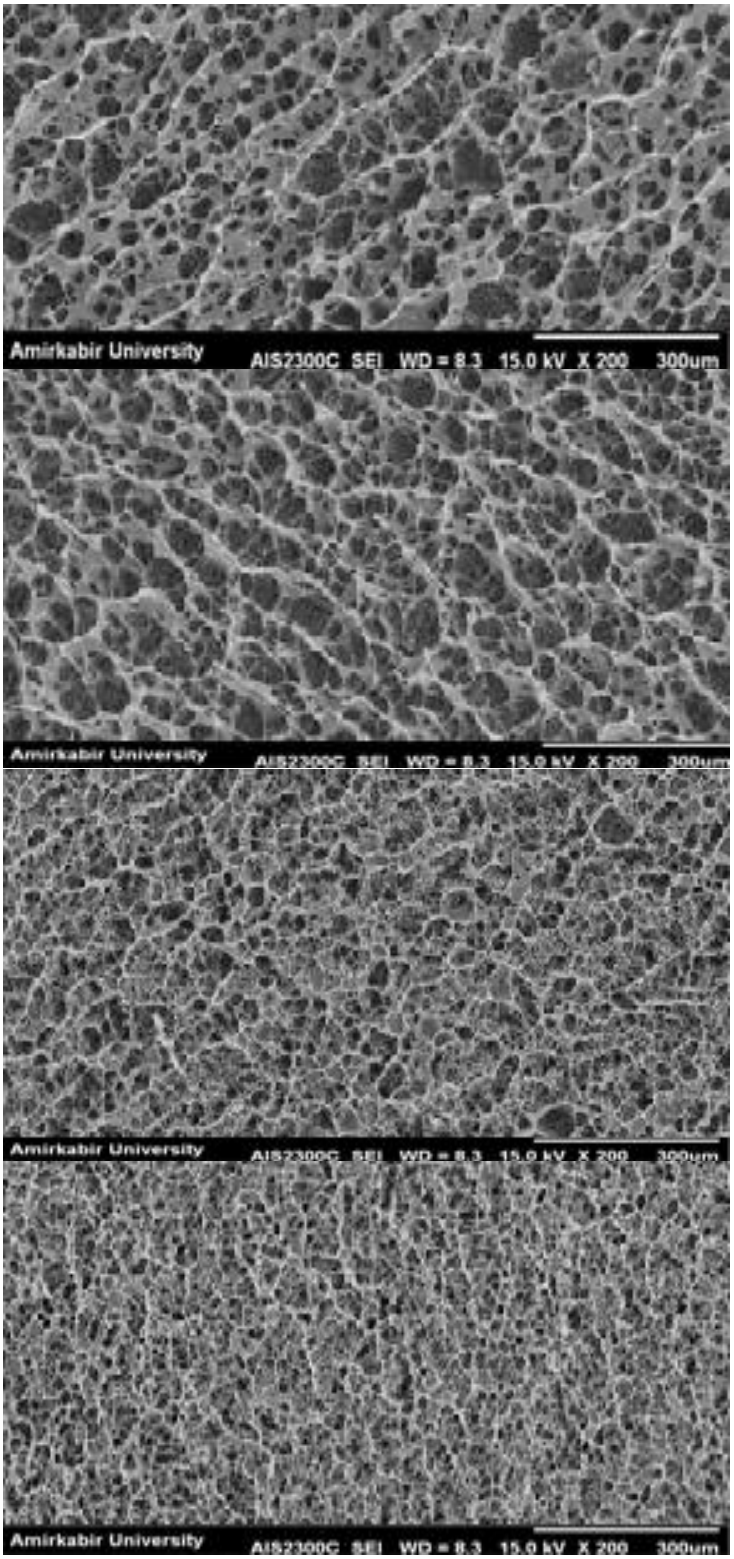
شکل ۶) معادلات و روند عبور بخار آب در گذر زمان

بررسی میزان گذردهی بخار آب: مطابق با شکل ۶، با گذشت زمان، به دلیل خشک‌شدن ساختار و همچنین به هم فشردگی زنجیرهای آلژینات و ژلاتین، میزان عبور بخار کاهش یافت. باید توجه داشت به دلیل محدودیت در آزمون، در این روش ارزیابی تمامی پارامترهای دیگر نظیر تخریب آنزیمی و شرایط فیزیولوژیکی در نظر گرفته نشد و تنها خروج بخار آب از پانسمان به روش استاتیک مورد مطالعه قرار گرفت. میزان گذردهی در پانسمان‌ها مطابق جدول ۵ بود. حضور بیشتر ژلاتین و کلسیم کلراید در بین زنجیرهای آلژینات در ساختار نمونه AGC4 باعث شد تا استحکام هیدروژل حاصل بسیار بیشتر از سایر نمونه‌ها شود. بنابراین این موضوع قابل پیش‌بینی بود که در این حالت نرخ گذردهی بخار آب کمتر باشد. نکته جالب توجه در این گروه، شکل SEM آن بود. این گروه به دلیل ساختار به هم فشرده میزان تخلخل بسیار کمتری نسبت به گروه AGC1 داشت (شکل ۷). در گروه AGC1 به دلیل حضور تخلخل بیشتر و همچنین حضور کمتر ژلاتین و کلسیم کلراید، اولاً هم زنجیرها به صورت کاملاً محکم به هم متصل نشده‌اند که این موضوع منجر به به دام‌اندازی کمتر مولکول‌های آب و همچنین نرخ جذب آب پایین‌تر می‌شود و هم ثانیاً چون آلژینات

در سطح به راحتی در دسترس است، ذرات و مولکول‌های آب را به راحتی در اثر گذر زمان از دست می‌دهد چرا که پیوند واندروالس که یکی از ضعیف‌ترین پیوندهای شیمیایی است، تنها در بین مولکول‌های آلژینات و مولکول آب برقرار است. حضور تخلخل‌های بزرگ و زیاد در این گروه (مطابق شکل SEM) حاکی از سطح زیاد در دسترس این پانسمان داشته که در نتیجه خروج تسریع شده آب را به همراه دارد.

جدول ۵) نرخ گذردهی بخار آب در پانسمان‌ها

نمونه	AGC1	AGC2	AGC3	AGC4
نرخ گذردهی (g/cm^2day)	۳/۲۹	۲/۶۴	۲/۴۲	۱/۹۱



شکل ۷) تصاویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی روبشی پانسمان‌های آ) **AGC1**، ب) **AGC2**، ج) **AGC3** و د) **AGC4** در بزرگنمایی ۳۰۰ میکرون

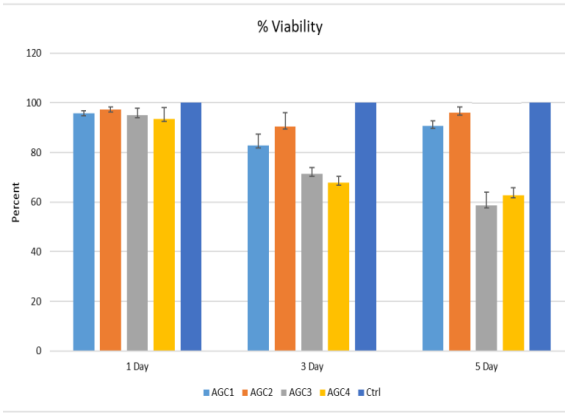
در گروه AGC2 و AGC3 میزان گذردهی متفاوت از سایر گروه‌ها بود. از مطالعه رفتار این دو گروه می‌توان دریافت، افزایش ژلاتین و افزایش کلسیم کلراید، اثر تقویت‌کنندگی آلژینات در کنترل میزان مایعات در موضع زخم را کاهش داده و حتی می تواند در مواردی که ترشحات زخم بالا باشد، عدم خروج بخار آب و تجمیع آن در زیر پانسمان منجر به عفونت شود. از طرف دیگر نرخ تخریب پانسمان باید متناسب با نرخ جایگزینی بافت زیرین باشد. از آنجا که تقریبا بازه زمانی یک هفته ابتدایی جراحت به عنوان بازه زمانی مهم در حذف بقایای سلولی و ایجاد جهت گیری در سلول های مزانشیمی بافت پوست می باشد؛ بنابراین می توان گفت هرچند که میزان جذب آب نمونه AGC3 بیشترین مقدار را داشته اما رفتار پانسمان AGC2 تقریبا به دلیل نرخ گذردهی بخار آب بیشتر و همچنین حضور تخلخل‌های بیشتر در مقایسه با گروه AGC3، روند ترمیم بهتری را فراهم خواهد آورد. این موضوع در بخش ارزیابی های زیستی نشان داده شده است.

نتایج مطالعه ریزساختار (SEM): حضور ژلاتین و آلژینات به صورت توامان باعث ایجاد ساختارهای متخلخل شد و با به دام انداختن بلورهای آبی باعث ایجاد حفرات شدند [۲۳]. وجود تخلخل‌های راه به در، در پانسمان‌ها نیز می‌تواند درکنار جنس ساختار، تأثیر مهمی در بیشنهٔ جذب آب داشته باشد. براساس تصاویر SEM، می‌توان دریافت که چرا نمونهٔ AGC1 کمترین درصد جذب آب را داشت. در این گروه هم تخلخل‌ها دارای اندازه بزرگی بودند و هم میزان حضور آنها بیشترین مقدار است. بنابراین مولکول‌های آب می تواند به راحتی در بین آنها حرکت کرده و از ساختار خارج شود [۲۴]. افزودن کلسیم کلراید به منظور ژل‌سازی آلژینات تأثیرات بالقوه‌ای در سطح نمونه‌ها داشت؛ تصاویر شکل ۷ به نوعی تأییدکننده نتایج قبل بود به گونه‌ای که هر چه میزان کلسیم کلراید در سیستم بیشتر شد، با وجود اثر فزاینده در ژل‌سازی، رسوبات زیادی در سطح نمونه‌ها به جای گذاشت. به عنوان مثال در نمونه AGC4 بیشترین رسوب بلورهای یونی کلسیم کلراید در سطح مشاهده شد. این درحالی است که در نمونه AGC1 به دلیل غلظت پایین‌تر کلسیم، بلورهای کمتر و گاهی پراکنده در سطح مشاهده شد.

از آنجاکه وجود لبه‌های تیز و حفرات، بستر مناسبی جهت چنگ‌اندازی سلولی خواهد بود؛ با توجه به تصاویر حاصل از نمونه‌ها انتظار می‌رفت که در نمونه‌های AGC1 و AGC2 رفتار چسبندگی بهتری مشاهده شود. موارد به صورت تفصیلی در بخش‌های بعدی مورد بررسی قرار گرفته است.

حضور ژلاتین در لابه‌لای زنجیرهای آلژینات در گروه AGC1 و AGC2 باعث ایجاد ساختار متخلخل حفره‌ای شد چراکه در فرآیند خشک‌کردن انجمادی، مولکول‌های آب به‌دام‌افتاده در بین زنجیرها تحت فرآیند تصعید خارج شده و به جای آنها حفره باقی خواهد ماند. با توجه به این موضوع، هرچه میزان سفتی ژل بیشتر بود (یعنی نمونه‌های AGC3 و AGC4) ساختار حاوی تخلخلات کمتر و حتی گاهی در برخی نقاط بدون تخلخل بود. راه به در بودن تخلخل‌ها و حتی وجود آنها یکی از نکات حائز اهمیت در امر چسبندگی و تبادلات سیگنال‌های سلولی است.

بنابراین با توجه به موارد ذکرشده، اولاً حضور ذرات سرامیکی کلسیم در زنجیر تا یک میزان مشخص می‌تواند نقش ریگ و سنگ‌ریزه در بتن را ایفا کرده و باعث بهبود چنگ‌اندازی سلولی و حتی استحکام شده (این موضوع نافی استحکام بهتر گروه AGC4 در برابر AGC1 به دلیل حضور بیشتر کلسیم نیست) و از طرف دیگر غلظت بهینه ژلاتین جهت تقویب ساختار آلژینات می‌تواند باعث ایجاد ساختاری متخلخل و سلول‌پسند ایجاد نماید. لذا می توان گفت به لحاظ کیفی ساختار گروه AGC2>AGC1>AGC3>AGC4 بود.

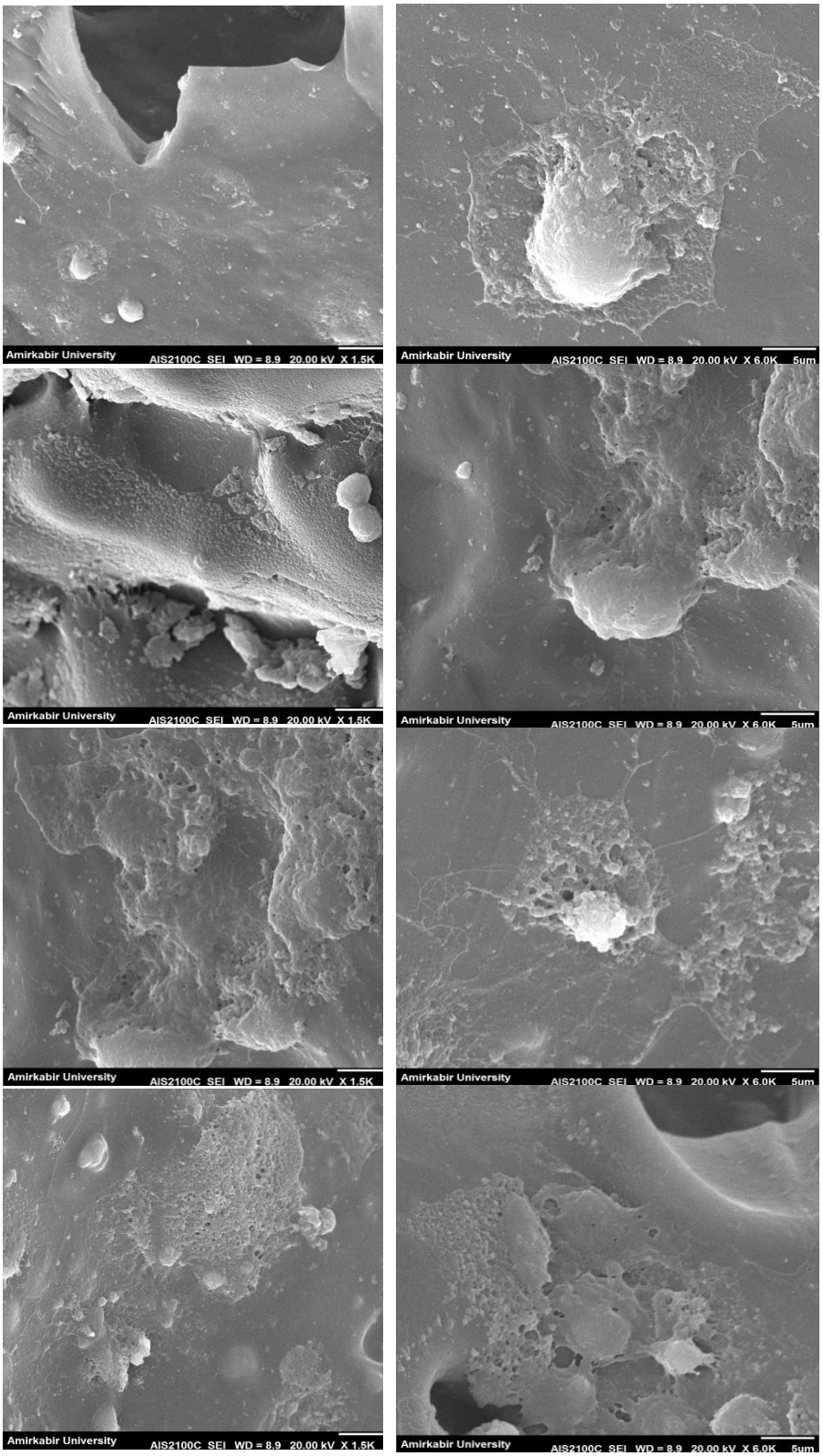


شکل ۸) نتایج بررسی زنده‌مانی سلول‌ها در نتیجه تماس با پانسمان‌ها به تفکیک زمان

مطالعه پاسخ زیستی برون‌تنی

بررسی زنده‌مانی سلولی (MTT): در شکل ۸ درصد زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست موشی در تماس با پانسمان‌ها نشان داده شد. در مقایسه با گروه کنترل که مربوط به کشت سلول در پلیت فاقد پانسمان بود، تمامی نمونه‌ها به جز نمونه AGC4 به نسبت، پاسخ زیستی مناسبی نشان دادند. این موضوع می‌تواند ناشی از حضور متناسب ژلاتین و آلژینات در پانسمان باشد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان نتیجه گرفت هرچه میزان کلسیم کلراید در محیط بیشتر می شود، احتمال مرگ سلولی بالاتر می رود. این موضوع تا جایی ادامه خواهد داشت که دیگر توان جبران زنده مانی توسط ژلاتین فراهم نباشد [۲۴، ۲۵]. نکته دیگری که در این خصوص و همسو با نتایج تصاویر SEM پانسمان‌هاست این است که گروه AGC3 و AGC4 در تصاویر SEM تقریبا فاقد تخلخل (یا بسیار کمتر از دو گروه دیگر) بوده که می تواند چنگ‌اندازی سلول برروی دیواره را کاهش داده و سطح خارجی نسبتاً صافی را به‌وجود آورد که با عدم چسبندگی مناسب روی سطح دچار مرگ سلولی شده باشند. نتایج این بررسی در بخش بررسی ریخت‌شناسی سلولی نیز مورد تایید است. تکثیر برخی سلول‌های زندهٔ درحال تقسیم می‌تواند منجر به افزایش میزان زنده‌مانی در تمامی گروه‌ها با گذشت زمان در طی مدت پنج روز شود؛ اما این میزان به اندازه‌ای نبود که بتواند منجر به جبران تعداد بالای سلول‌های ازبین‌رفته در گروه‌های AGC3 و AGC4 شود. بنابراین با توجه به نکاتی که مطرح شد، در روز پنجم میزان زنده‌مانی در گروه AGC2 در مقایسه با AGC3 اختلاف معناداری داشت که می توان دلیل آن را حضور بالای کلسیم کلراید دانست؛ چراکه در نمونه AGC4 به دلیل بالاتر بودن میزان ژلاتین، اثر سمیت غلظت بالای کلسیم کلراید تقریباً در روز پنجم نسبت به روز سوم جبران شد. همچنین در گروه AGC1 ابتدا تا روز سوم به دلیل شوک سلولی دچار مرگ شد اما با گذشت زمان و افزایش ترغیب بستر به دلیل حضور رشته‌های به‌هم تنیده

آلژینات و بلاک‌های ژلاتینی، مجدداً روند به افزایشی تغییر کرد و تکثیر سلولی را به دنبال داشت. بنابراین با وجود اینکه در نمونه AGC3 خواص فیزیکو شیمیایی بهتری مشاهده شد و ساختار ژلی بهتری به دست آمد اما در زمان تماس با سلول‌های زنده، منجر به افزایش مرگ شد و نمونه AGC2 با خواص فیزیکی ضعیف‌تر نسبت به آن، رفتار سلولی بهتری را از خود نشان داد.



شکل ۹) تصاویر **SEM** مربوط به چسبندگی سلول‌ها به سطح پانسمان‌ها
آ) **AGC1**، ب) **AGC2**، ج) **AGC3** و د) **AGC4** در دو بزرگنمایی ۵ میکرون (راست) و ۳۰ میکرون (چپ)

چسبندگی سلولی: رشته‌های پلیمری موجود در ECM به طور گسترده در تمامی نمونه‌ها شکل گرفت (شکل ۹). مطلوب بودن چسبندگی سلول‌ها در بستر پانسمان‌ها مشاهده شد و تغییر چروکیدگی ظاهری ناشی‌از فرآیند آبگیری از سلول‌ها بود (شکل ۹). در تمام نمونه‌ها پس از گذشت پنج روز، ترشح ECM با توجه به بررسی نتایج چسبندگی سلولی جهت آماده‌سازی بستر برای لانه‌گزینی شروع شد؛ اما نکته جالب توجه ادامه روند فعالیت سلول‌ها بود چرا که با وجود زیست‌سازگاری اجزا سازنده پانسمان، تا غلظتی مشخص، سلول دچار عدم سمیت و از غلظتی به بعد باعث افزایش مرگ سلولی شد. این مورد به خوبی درنمونه‌های AGC3 و به مقدار کمتر در نمونه AGC3 مشاهده شد. از طرف دیگر، همان‌طور که پیشتر نیز اشاره شد، حضور ساختار به‌هم فشرده در دو نمونه AGC4 و AGC3، امکان چسبندگی سلولی را کاهش داد و به تبع آن منجر به حضور کمتر سلول‌ها بر روی سطح شد. یک نکته مهم در تمامی نمونه‌ها، میزان پهن‌شدگی سلول‌ها بود. هرچه بر میزان ذرات کلسیم سطحی افزوده شده بود، سلول های فیبروبلاست علی‌رغم تمایل به پهن شدگی، به صورت کروی روی سطح باقی ماندند. این موضوع هم می‌تواند در زمان‌هایی که نیاز به تعویض پانسمان باشد مفید بوده و هم می‌تواند در نمونه‌هایی که نیازمند تعویض پانسمان نیست و قصد تخریب زیستی وجود داشته باشد، مضر باشد؛ چرا که در این حالت امکان به تأخیر افتادن زمان تخریب بیشتر است. با این وجود، این نکات کمتر در نمونه AGC2 مشاهده شد. هرچند این گروه خواص ژلینگی مناسب‌تری در قیاس با گروه AGC3 از خود نشان نداد.

بحث

مطالعه حاضر با هدف تهیه پانسمان بر پایه آلژینات/ کلسیم کلرید/ ژلاتین به روش اسپری‌کردن بر روی زخم و بررسی عملکرد آن در جهت جلوگیری از خونریزی و بهبود زخم انجام شد. در این پژوهش، پانسمان با قابلیت اسپری‌شدن بر پایه آلژینات با درصد متفاوت برای اولین بار در کشور جهت ترمیم زخم تهیه شد تا فرد دچار جراحت یا اطرافیان حاضر در صحنه، بتوانند با اسپری بر روی زخم مانع از خونریزی فرد آسیب‌دیده شوند تا نیروهای امدادی فرد آسیب‌دیده را جهت درمان به مرکز درمانی منتقل کنند. برای جداکردن پانسمان می‌توان با پاشش مایع سرم فیزیولوژیک (به دلیل حضور سدیم و آب به صورت هم‌زمان) انسجام ژل را از بین برد و پانسمان به راحتی از زخم جدا شود. همچنین جهت کنترل میزان ژل‌شوندگی و تسریع روند ترمیم زخم، مقادیر متفاوت از افزودنی‌ها مانند کلسیم کلراید و ژلاتین در غلظت ثابت از آلژینات مورد بررسی و بهینه سازی قرار گرفت.

نتایج آشکار کرد که غلظت محلول آبی آلژینات نقش بسیار مهمی در تهیه هیدروژل داشت. حضور مقادیر بالای آلژینات اگرچه توانست هیدروژل‌های مستحکم‌تری را فراهم آورد اما امکان اسپری‌شدن در آنها وجود نداشت. همچنین افزایش مقادیر کلسیم کلراید توانست منجر به افزایش تشکیل هیدروژل آلژیناتی شود. در مقادیر کم آلژینات می‌توان به منظور تقویت ساختار هیدروژل نهایی از کامپوزیت آن با ژلاتین بهره گرفت. استفاده از ژلاتین منجر به ایجاد خواص منحصر به فردی در هیدروژل نهایی شد. حضور ژلاتین به عنوان یک جزء کامپوزیت‌کننده در هیدروژل آلژینات، تغییری در پیوندهای شیمیایی مواد ایجاد نکرد. حضور ژلاتین، جذب آب ساختار را افزایش داد و همچنین ساختار ژل مستحکم‌تر شد.

افزایش میزان ژلاتین و کلسیم کلراید توانست منجر به افزایش نرخ تخریب به دلیل جذب آب توسط زنجیرهای ژلاتین و نفوذ یون‌های کلسیم کلراید به داخل زنجیره شود. حضور ژلاتین و کلسیم کلراید در غلظت ثابت آلژینات تا زمانی که ممانعت‌های فضایی توسط آنها ایجاد نشود، زمان تشکیل هیدروژل حاصل از اسپری را کاهش داد؛ اما به محض عبور از غلظت آستانه (نمونه AGC4 با غلظت ژلاتین ۸٪ و کلسیم کلراید ۸٪) زمان تشکیل هیدروژل افزایش یافت. هرچه بر میزان اجزای جانبی کامپوزیت (ژلاتین و کلسیم کلراید) افزوده شد، نرخ گذردهی بخار آب در گذر زمان هشت‌روزه کاهش یافت که نشان‌دهنده ساختار مستحکم‌تر بود (نمونه AGC4 کمترین و نمونه AGC1 بیشترین نرخ گذردهی بخار آب را داشتند).

اگرچه افزایش ژلاتین در غلظت ثابت آلژینات توانست ساختار ژل را تقویت نماید، اما حضور تخلخلات در سیستم را کاهش و نرخ تخریب هیدرولیتیکی را افزایش داد. با وجود رفتار فیزیکو شیمیایی بهتر در گروه AGC3 نسبت به سایر نمونه‌ها، در زمان تماس با سلول زنده، به دلیل بالاتر بودن غلظت یون‌های کلسیم کلراید و تغییر فشار اسمزی خارج سلولی، افزایش مرگ سلول‌ها را به همراه داشت و نمونه AGC2 میزان زنده‌مانی بهتری داشت؛ به دلیل غلظت کمتر کلسیم کلراید نسبت به گروه‌های AGC3 و AGC4 و همچنین حضور بیشتر ژلاتین نسبت به گروه AGC1.

همانند آزمون سمیت سلولی، نمونه AGC2 به دلیل ساختار تخلخلی مناسبت‌تر نسبت به دو گروه AGC3 و AGC4 چسبندگی سلولی بهتری از خود نشان داد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده اگرچه خواص ژلی به لحاظ تخریب و جذب آب و استحکام نمونه AGC3 مناسب‌تر بود اما از آنجا که موضع استفاده نهایی در محل زخم است، تنفس سلولی و چسبندگی سلولی به پانسمان با هدف داربست، نقش به سزایی دارد و نمونه AGC2 به عنوان بهترین نمونه معرفی شد.

اخیراً تحقیقاتی در زمینه ترکیب نانوذرات یا مواد با گروه‌های عاملی فراوان با پلیمر زیست تخریب‌پذیر آلژینات گزارش شده است [۲۶، ۲۷]. نتایج نشان داده که آلژینات در پانسمان‌های ساخته‌شده به منظور قوام‌دهندگی، تثبیت، تعلیق، تشکیل فیلم و تولید ژل و پایدارسازی امولسیون استفاده می‌گردد. نتایج حاصل از این پژوهش آشکار کرد که آلژینات نقش مؤثری در بهبود زخم داشت و رفتاری مشابه با زخم‌پوش‌های تولیدشده از آلژینات داشت زیرا آن، جاذب رطوبت، سازگار با بدن و زیست تخریب‌پذیر است [۲۶، ۲۷] و حضور ژلاتین و کلسیم کلرید در این پژوهش باعث افزایش سرعت بهبود و ترمیم زخم‌های پوستی شد.

این نکته قابل قبول است که بهبود سریع زخم در محیط مرطوب رخ می‌دهد؛ بنابراین استفاده از ترکیبات آب‌دوست در محصولات مراقبت از زخم جهت بهبودی سریع‌تر پیشنهاد می‌گردد. همچنین کاربرد نانوذرات، ویتامین K و داروهای آنتی بیوتیک در ساختار آلژینات از طریق ایجاد گروه‌های عاملی بیشتر در ساختار هیدروژلی آلژینات می‌تواند باعث بهبود عملکرد پانسمان و درمان سریع‌تر زخم شود. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده اثرات پانسمان حاضر بر بهبود زخم‌های ایجادشده بر بدن موش

آزمایشگاهی مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد. محدودیت‌های پژوهش شامل عدم تأمین منابع مالی کافی جهت ارزیابی درون‌تنی و حیوانی محصول، محدودیت‌های ناشی از تحریم‌های ظالمانه در واردات نمونه مشابه خارجی جهت انجام مقایسه بود.

نتیجه‌گیری

اسپری‌کردن محلول آلژینات بر محل زخم در حضور کلسیم کلرید و ژلاتین باعث تشکیل سریع پانسمان و جلوگیری از خونریزی می‌گردد. نتایج آشکار کرد که تشکیل هیدروژل آلژیناتی تحت تأثیر میزان کلسیم کلرید واقع شده و جذب آب در ساختار پانسمان ارائه‌شده مرتبط با مقدار ژلاتین موجود در آن است. همچنین نرخ تخریب پانسمان وابسته به میزان کلسیم کلرید و ژلاتین در ساختار آلژینات است و مقدار هر جزء در ساختار پانسمان بهینه شدند تا بالاترین کارایی برای پانسمان AGC2 به‌دست‌آید.

نکات بالینی و کاربردی در طب انتظامی: با توجه به امکان ایجاد خونریزی‌های شدید در عملیات‌های نظامی و آسیب‌های جبران‌ناپذیر آن، می‌توان با استفاده از اسپری معرفی‌شده در کمترین زمان، از خونریزی جلوگیری کرد.

تشکر و قدردانی: صمیمانه از همکاری و حمایت‌های همه‌جانبه مرکز تحقیقات ناجا به ویژه دکتر رضا محمدی و سرهنگ بهادرانی تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع: بدین وسیله نویسندگان مقاله تصریح می‌نمایند که هیچگونه تعارض منافعی در قبال مطالعه حاضر وجود ندارد.

سهم نویسندگان: رضا مهدوی و ملیکا حسنی، جمع آوری و تجزیه و تحلیل داده‌ها؛ مهدی خلیلی، ارائه ایده و طراحی مطالعه؛ معصومه حق‌بین، ارائه ایده و طراحی مطالعه؛ علی روستایی، تجزیه و تحلیل داده‌ها؛ همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله و بازنگری آن سهیم بودند و همه با تأیید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

منابع مالی: کلیه هزینه‌ها توسط مجری پرداخت گردیده است.

References

1- KC Dee, DA Puleo R. Bizios, an introduction to tissue-biomaterial interactions, Cell Mol. Biol. 2004;419-25.

2- A Falabella, R Kirsner. Wound healing, Basic & clinical dermatology, Taylor and Francis, Boca Raton, Florida, 2005. https://doi.org/10.1016/j.psychres.2020.112992. PMid:32302816 PMCid:PMC7151383

3- B. Jayesh. The history of wound care. Journal Am College Certified Wound Specialists. 2011;3:65-6.

4- M Simkhah, M Dehghan Esmatabadi, M Zeinoddini, N Pourmahdi. In Silico Design of a Hybrid Structure as Positive Control for Simultaneous Detection of 4 Pathogenic Agents by PCR Method. J Police Med. 2020;9(1):9-16. https://doi.org/10.3390/ijerph17062032. PMid:32204411 PMCid:PMC7143846

5- AS Halim, TL Khoo, SJM Yussof. Biologic and synthetic skin substitutes: an overview, Indian J Plastic Surgery: Official Publication of the Association of Plastic Surgeons of India 2010;43(Suppl 23) .https://doi.org/10.1007/s12264-020-00476-9. PMid:32096116 PMCid:PMC7056754

6- K Vowden, P Vowden. Wound dressings: principles and practice, surgery. Oxford. 2017;35(9):489-94..https://doi.org/10.1037/tra0000365. PMid:29733669 PMCid:PMC6222023

7- J Kucińska-Lipka, I Gubanska, H Janik. Bacterial cellulose in the field of wound healing and regenerative medicine of skin: recent trends and future prospectives. Polymer Bulletin 2015;72(9):2399-419. https://doi.org/10.1016/j.paid.2017.07.018

8- G Winter. Formation of the scab and the rate of epithelisation of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. 1962, J Wound Care 1995;4(8):366.

9- MG Dunn, CJ Doillon, RA Berg, RM Olson, FH Silver. Wound healing using a collagen matrix: effect of DC electrical stimulation. J Biomed Material Res. 1988;22(S13):191-206. https://doi.org/10.1016/j.ajp.2020.101951 PMid:32078949

10- J Klimentová, J Stulík. Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. Microbiol Res. 2015;170:1-9. https://doi.org/10.1016/j.ajp.2020.101989. PMid:32143142 PMCid:PMC7130010

11- M Ishihara, K Nakanishi, K Ono, M Sato, M Kikuchi, Y Saito, et al. Uenoyama, photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. Biomaterials. 2002;23(3):833-40. https://doi.org/10.52547/jrums.20.1.85

12- GD Mogoşanu, AM Grumezescu. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. Int J Pharmaceutic. 2014;463(2):127-36.

13- J Stana, Večslojne. Medicin matrice z modificiranim sproščanjem pentoksifilina za zdravljenje kronične venozne razjede, Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, 2018. https://doi.org/10.1192/bjp.bp.106.021857 PMid:17267935

14- O Catanzano, M Straccia, A Miro F, Ungaro, I Romano, G. Mazzarella, et al. Spray-by-spray in situ cross-linking alginate hydrogels delivering a tea tree oil microemulsion. Europ J Pharmaceutical Sci. 2015;66:20-8.

15- H Ueno, H Yamada, I Tanaka, N Kaba, M Matsuura, M Okumura, et al. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs, Biomaterials. 1999;20(15):1407-14.

16- A Sood, MS Granick, NL Tomaselli. Wound dressings and comparative effectiveness data, Advances in wound care. 2014;3(8):511-29.

17- A Sosnik. Alginate particles as platform for drug delivery by the oral route: state-of-the-art. Int Scholar Res Notic. 2014. https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.10.017. PMid:26500072

18- S Mohammadi, SS Shafiei, M Asadi-Eydivand, M Ardeshir, M Solati-Hashjin. Graphene oxide-enriched poly(ε-caprolactone) electrospun

nanocomposite scaffold for bone tissue engineering applications. J Bioactive Compat Polymer. 2017;32(3):325-42.
19- SI Jeong, MD Krebs, CA Bonino, JE Samorezov, SA Khan, E Alsberg. Electrospun chitosan–alginate nanofibers with in situ polyelectrolyte complexation for use as tissue engineering scaffolds. Tissue Eng Part. 2011;17(1-2):59-70.
20- DL Pavia, GM Lampman, GS Kriz, JA Vyvyan. Introduction to spectroscopy. Nelson Education; 2014.
21- R Imani, S Emami, S Faghihi. Nano-graphene oxide carboxylation for efficient bioconjugation applications: a quantitative optimization approach. J Nanoparticle Res. 2015;17(2):1.
22- E Jain, A Srivastava, A Kumar. Macroporous interpenetrating cryogel network of poly (acrylonitrile) and gelatin for biomedical applications. J Material Sci: Material Med. 2009;20(1):173-9.
23- A Blandino, M Macías. Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and CaCl2 concentration on gelation kinetics. J Biosci Bioeng. 1999;88(6):686-9.
24-TR Cuadros, AA Erices, JM Aguilera. Porous matrix of calcium alginate/gelatin with enhanced properties as scaffold for cell culture. J Mechanical Behav Biomed Material. 2015;46:331-42.
25- N Cao, X Chen, D Schreyer. Influence of calcium ions on cell survival and proliferation in the context of an alginate hydrogel. ISRN Chemical Eng. 2012
26- CJ Knill, JF Kennedy, J Mistry, M Miraftab, G Smart, MR Groocock, et al. Alginate fibers modified with unhydrolysed and hydrolysed chitosans for wound dressings. Carbohydr Polym. 2004;55(1):65-76.
27- S Opasanon, P Muangman, N Namviriyachote. Clinical effectiveness of alginate silver dressing in outpatient management of partial-thickness burns. Int Wound J. 2010;7(6):467-71.

این صفحه آگاهانه سفید گذاشته شده است