ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2022;11(1):e31

Journal of Police Medicine

ORIGINAL ARTICLE OPEN ACCESS

The Effectiveness of Chitosan Wound Dressing in the Form of a Film Compared to Its Hydrogel on Burn Wound Healing in the Male Wistar Rat Model

Seyed Amin Mousavinezhad[1] PhD Candidate, **Nasser Harzandi**[1*] PhD, **Azam Marjani**[2] PhD, **Parvaneh Jafari**[3] PhD

[1] Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
[2] Department of Chemistry, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.
[3] Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.

ABSTRACT

AIMS: Modern wound dressings are made and used in the form of foam, film, hydrocolloid, and hydrogel. This research aimed to compare the effectiveness of chitosan in the form of film and hydrogel on burn wounds in an animal model.

MATERIALS AND METHODS: The present study is an experimental intervention type among the Wistar male rat model, which was conducted in the Islamic Azad University of Karaj, Iran in the winter of 2020. The dressing was prepared in the form of film and hydrogel based on chitosan. 36 rats were divided into three groups: negative control, hydrogel, and film. After wound formation on days 3, 7, 14, and 21, healing was investigated by histological and molecular methods. The results were analyzed using SPSS21 as well as non-parametric tests.

FINDINGS: 36 male Wistar rats weighing 200 to 250 grams were tested and the results showed that the percentage of wound healing was the same in the groups until the third day, and on the 7th and 14th days in the film group respectively, 56.55±3.16 and 76.66±4.04 percent and in the hydrogel group it was 60.66±2.51 and 88.33±2.08 percent which showed a significant difference (p-value =0.002) compared to the negative control group (20.55±2.81 and 50.33±5.85 percent). In the histological examination, 100% of the film group and 66.7% of the hydrogel group had moderate and complete epithelium on the fourteenth day; the healing process by examining the collagen matrix and angiogenesis also showed a better effect of chitosan in both forms of intervention. Better control of inflammation in the film group compared to other groups was evident in the examination of inflammatory cells. In the molecular study, an increase in IL-8 gene expression as a factor involved in causing inflammation was observed in both film and hydrogel groups until the third day, and a decrease on other days; there was no significant difference in the expression of IL-10 gene, which inhibits inflammation, between the two forms of film and hydrogel (p-value=0.07), although there was a significant difference with the negative control.

CONCLUSION: Considering the ease of application and maintenance of the film form and better control of inflammation, it seems that the film form is preferable to the hydrogel.

KEYWORDS: Burn; Hydrogel; Chitosan; Rat

How to cite this article:

Mousavinezhad SA, Harzandi N, Marjani A, Jafari P. *The Effectiveness of Chitosan Wound Dressing in the Form of a Film Compared to Its Hydrogel on Burn Wound Healing in the Male Wistar Rat Model*. J Police Med. 2022;11(1):e31.

***Correspondence:**

Address: Amirul Mominin University Complex (AS), the intersection of Mozen and Esteghlal Blvd., Rajaee Shahr, Karaj, Iran,
Postal Code: 3149968111
Tel: +982634418143
Mail: nasharzan@gmail.com

Article History:

Received: 23/05/2022
Accepted: 09/08/2022
ePublished: 01/10/2022

Copyright © 2022, Journal of Police Medicine | This open access article is licensed under a *Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License*

INTRODUCTION

… [1-5]. Wound healing is a dynamic and complex process, and its purpose is to regenerate the skin as the first barrier to the body's immunity. Ignoring it in military operations and injuries that occur to ordinary people can cause irreparable damage, such as coma and even death [6]. Therefore, researchers are looking for a suitable method for faster wound healing with the least side effects. … [7]. In 1962, as a result of studies and research by Winter et al. [8], it was found that creating a moist surface on the wound significantly affects the healing process. … [9, 10]. Making dressings that, while maintaining the optimal conditions of wounds, do not need to be changed continuously and are easy to use are among the research priorities in designing and manufacturing wound dressings [11]. New wound dressings include foam, film, hydrocolloid, and hydrogel.

AIM(s)

This study aimed to investigate the effectiveness of chitosan wound dressing in the form of a film compared to its commercial form in the form of a hydrogel on burn wound healing in a male Wistar rat model, considering the better structure and effectiveness of each and considering ease of operation and easier portability can be used in police missions.

RESEARCH TYPE

The present study is an experimental intervention study with a control group.

RESEARCH SOCIETY, PLACE & TIME

This study was conducted at the Islamic Azad University of Karaj in Iran in the summer of 2021.

SAMPLING METHOD AND NUMBER

36 male Wistar rats aged four weeks weighing 200-250 grams were purchased from Royan Jahad University Research Institute. The sample volume was calculated based on three daily repetitions and 12 samples in each group. After two weeks of adaptation, the rats were randomly divided into three groups (n=12), including the negative control group (dressing with sterile gas), the control group (dressing with chitoHeal hydrogel), and the test group (dressing with chitosan film).

USED DEVICES & MATERIALS

To carry out this study, the desired chitosan-based dressing was made in the form of a film. To make the intended film, a solution (w/v) of 10% chitosan with an average molecular weight manufactured by Sigma Aldrich Company was prepared in distilled water. It was placed on a heater with a magnetic stirrer for half an hour, and the temperature did not exceed thirty degrees Celsius. 50 ml of distilled water was added to it and the pH of the solution was brought to about four by adding glacial acetic acid. The resulting solution was placed on a heater with a magnetic stirrer for 2 hours at a temperature of 29 degrees and then placed in an ultrasonic bath for half an hour to ensure the complete dissolution of chitosan; then it was poured into a plate and placed at room temperature to dry; after drying, the thickness of the resulting film was measured using a digital micrometer and to check the structure and uniformity of the mixture, the resulting membrane was imaged with the use of SEM electron microscope. The uniformity and thickness of the film can be seen in **Figure 1**. … [12-17].

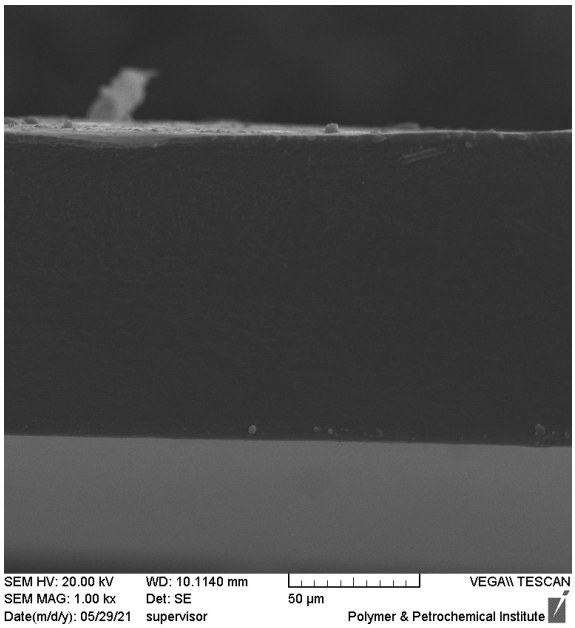


Figure 1) SEM electron imaging of chitosan film

METHOD

Rats were anesthetized with the combined anesthetic of ketamine 80 mg/kg and xylazine 10 mg/kg [18], and a burn wound was created by a metal plate heated to about 300 degrees Celsius by a flame without external pressure. Before dressing, the wound was washed with sterile physiological serum. After wound debridement, the rats were treated with appropriate dressing according to the grouping and type of intervention. Before use, the chitosan film was immersed in 0.1 molar solution for 30 seconds; after drying, it was washed with sterile distilled water and fixed on the wound with hypoallergenic glue. Burn treatment and the dressing was done only once on the same zero-day. The transparent healing process was evaluated by measuring the area and percentage of wound

healing. For this purpose, after anesthetizing the rats on specific days, the dimensions of the wound were determined using calipers and the percentage of recovery was calculated. On days 3, 7, 14, and 21, three rats from each group were randomly selected, they were killed with ketamine and xylazine anesthesia by cutting the cervical spinal, and the death of the rats was confirmed by taking blood from the heart; after examining the appearance of the wound and measuring the wound surface, a tissue sample was taken from the wound. One part of the tissue was placed in 10% formalin for histological tests, and the second part was kept at -20 degrees Celsius to check gene expression. In order to evaluate histology, samples were painted with hematoxylin and eosin after preparation and cutting; for this purpose, tissue samples were fixed in 10% formalin for 24 hours. First, the sample was dehydrated by placing in increasing percentages of alcohol, and then it was de-alcoholized with the help of different ratios of toluene-ethanol. After the preparation of paraffin blocks, slides of tissue sections with a thickness of 5 µm were prepared and painted with hematoxylin and eosin [19]. To quantify the qualitative variables and compare them, it was done as follows: lack of proliferation of epithelial cells 1, poor epithelial organization 2, incomplete epithelial organization 3, and medium and complete epithelial 4; organization and structure of the collagen matrix: minor zero, thin 1, medium rebuild 2, good and thick collagen 3, completed 4; angiogenesis: absence of zero, presence of congestion, bleeding and edema 1, hemorrhage and two veins in place 2, three to four veins and moderate edema 3, five to six vessels and mild edema 4; degree of inflammation: It was determined based on the number of inflammatory cells. On days 3, 7, 14, and 21, the expression of interleukins 8, 10, and Gapdh genes in skin samples was checked using the Real-time PCR method [20]. For this purpose, RNAs were first isolated from the skin tissue using the RNX-plus kit of Sinaclon Co. Then cDNA was made in this way that ten µl of RNA along with two µl of 5X buffer, 1 µl dNTP, 0.5 microliters of RT enzyme (Reverse Transcriptase), one microliter of primer, According to **table 1**, and 5.5 microliters of water in the final volume of 20 microliters, at a temperature of 25 degrees Celsius for 3 minutes to connect the primer, the temperature was set at 42°C for 1 hour for cDNA synthesis and 70°C for 5 minutes to inactivate the RT enzyme. In this part, an A100 personal PCR thermocycler was used.

A relative quantification method was used to check gene expression with the help of the House-Keeping gene, which was used in this research from Gapdh (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene and with the help of a Real-Time PCR machine. The expression level of genes was normalized with the expression of the Gapdh gene and was determined as (ΔCT= CT Gapdh-Ct target mRNA) ΔCT value. The multiplicity of expression compared to the control group was determined using R=2 -ΔΔCt [21]. The data obtained from Real-Time PCR was in the form of CT number, indicating the number of the cycle in which the multiplication starts exponentially and the graph ascends.

Table 1) Sequence of primers used in gene expression analysis

Primer Name	Sequence 5'→ 3' (10-50 bp)
IL10-F	CCTTGTCAGAAATGATCAAG
IL10-R	AGAGGGTCTTCAGCTTCTCTC
IL 8-F	CGTGGCTCTCTTGGCAGCCTTC
IL 8-R	TCCACAACCCTCTGCACCCAGTT
GAPDH-F	ATAGAAGGCTGGGGCTCAC
GAPDH-R	ATTCACGATGCCAAAGTTG

ETHICAL PERMISSION

This study has the ethics ID number IR.IAU.K.REC.1399.020 from the Research Ethics Committee of the Islamic Azad University of Karaj in Iran. All issues related to research ethics and animal rights were observed during the research.

STATISTICAL ANALYSIS

Data analysis was done using IBM SPSS 21 software with the use of the Kruskal Wallis Test and Mann-Whitney statistical tests. Statistical inference criterion $p \leq 0.05$ was considered significant.

FINDING by TEXT

Based on the clinical results, the burns of the rats were of the second-degree type. They were not injured due to the burns to the lower organs. After 21 days, wound healing was completed in all groups; in **Figure 2**, the wound healing process can be seen. Comparing the average percentage of wound healing on the third day between the groups, there was no significant difference between the groups (p value= 0.81), which indicated that the initial wound was the same (**Table 2**). With the passage of time and on the 7th and 14th days, the percentage of wound healing increased significantly in the two intervention groups compared to the negative control group (p value=0.002), This was despite the fact that no significant difference was observed between the two groups of chitosan film and chitoHeal hydrogel on the seventh day (p value=0.2) and the fourteenth day (p value=0.1). On the 21st day, the wound healing percentage was statistically the same in all groups (p value=0.1).

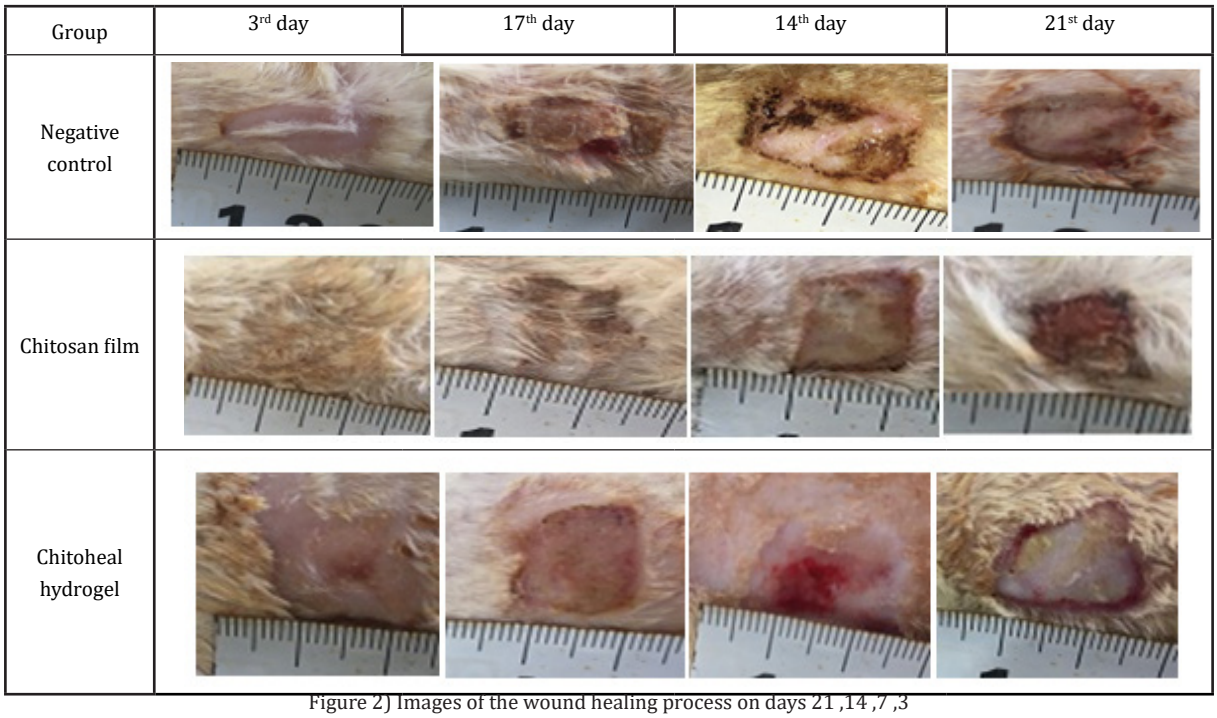


Figure 2) Images of the wound healing process on days 21 ,14 ,7 ,3

Table 2) Percentage of burn wound healing

Day	Chitoheal gel		Chitosan film		Negative control	
	mean	Standard deviation	mean	Standard deviation	mean	Standard deviation
3	9	1	10.01	1.01	9.23	0.67
7	60.66	2.51	56.55	3.16	20.55	2.81
14	88.33	2.08	76.66	4.04	50.33	5.85
21	97.66	2.51	96.93	2.72	96.33	3.78

1- HISTOLOGICAL RESULTS

The degree of epithelialization, angiogenesis, inflammation, and extracellular matrix were used to evaluate histology. The change process of these variables can be seen in Figure 3. In the negative control group on the third day, 66.7% of samples had weak epithelial organization, and 33.3% of samples had incomplete epithelial organization; on the seventh day, 33.3% of the samples of the negative control group had weak epithelial organization, and 66.7% of the samples had incomplete epithelial organization. On the 14th day, 33.3% of the samples had incomplete epithelial organization, 66.7% had medium and complete epithelium, and finally, on the 21st day, 100% had medium and complete epithelium (Table 3). In the hydrogel group, 33.3% had poor epithelial organization on the third day, 33.3% had incomplete epithelial organization, and 33.3% had moderate and complete epithelium. On the seventh day, 66.7% had incomplete epithelial organization, and 33.3% had medium and complete epithelium; on the 14th day, 33.3 had incomplete epithelial organization, and 66.7% of the samples had medium and complete epithelium; and on the 21st day, 100% were in the medium and complete epithelial group (Table 3). In the chitosan film group, on the third day, 33.3% were in the weak epithelial organization group and 66.7% in the incomplete epithelial organization group; on the seventh day, 100% were in an incomplete epithelial organization; on the fourteenth day, 100% of the samples were in the middle and complete epithelial row. By examining the results in the negative control group, 33.3% of the samples on the third day in terms of collagen structure and organization were immature with inflammatory tissue and 66.7% of the samples had a thin and inflammatory collagen structure, in this group on the seventh day, 66.7% of the samples had a thin collagen structure with an inflammatory tissue, 33.3% of the samples had moderate reconstruction in the organization and structure of the collagen matrix. On the 14th day, 100% of the samples were good and thick in terms of collagen, and on the 21st day, all the examined samples had complete organization and collagen structure. In the chitosan film group, in terms of the organization and structure of the collagen matrix, 66.7% of the samples on the third day had a thin and inflammatory collagen structure, and 33.3% had a collagen structure with moderate regeneration; On the seventh day, 33.3% of examined tissues had thin and inflammatory collagen structure, and 66.7% had organization and collagen structure with moderate regeneration. In examining tissues on the 14th day, 66.7% of the samples had good and

thick collagen organization, 33.3% of the samples had a completed collagen structure on this day, and of course, 100% of the samples had a completed collagen matrix structure and organization on the 21st day. In the hydrogel group, in terms of the structure and organization of the collagen matrix on the third day, 66.7% of the samples had a structure with moderate regeneration, and 33.3% of the samples had a good and thick collagen structure. On the seventh day, 100% of the samples had a good and thick collagen structure. Moreover, on the 14th day, 33.3% of the samples had a good and thick collagen matrix structure and organization, and the rest were in a completed state. 100% of samples had completed collagen structure and organization on day 21. In diagram 1, you can see the organization and structure of collagen in different groups. Regarding the amount of angiogenesis in the negative control, according to chart 2, 33.3% of the samples on the third day were in the absence of a vessel and 66.7% were in the presence of congestion, bleeding, and edema; On the seventh day, 33.3% of the samples in the category of the presence of congestion, bleeding and edema and 66.7% had a hemorrhage and two veins in the place, on the fourteenth day, 33.3% of the samples in the category of hemorrhage and two veins in the place, 66.7 The percentage of samples had 3 to 4 veins and moderate edema; On the 21st day, 100% were in category 5-6 of weak veins and edema. In the chitoHeal hydrogel group, on the third day, 100% were in the category of congestion, bleeding, and edema, on the seventh day, 33.3% of the samples were in the category of congestion, bleeding, and edema and 66.7% were in the category of hemorrhage and two vessels in place, on the fourteenth day, 33.3% of the samples were in the category of hemorrhage and two veins in the place, and 66.7% of the samples were in the category of 3 to 4 veins and moderate swelling. Moreover, finally, on the 21st day, 100% of the samples in groups 5-6 had weak veins and edema. In the examination of angiogenesis rate in the chitosan film group, 33.3% of the samples on the third day were in the absence category, and 66.7% were in the presence of congestion, bleeding, and edema category; on the seventh day, 33.3% of the samples were in the category of The presence of congestion, bleeding and edema, 66.7% in the category of hemorrhage and two veins in the place, and on the fourteenth day, 33.3% had a hemorrhage and two veins in the place, and 66.7% of the samples had three to four veins and moderate swelling. On the 21st day, 100% of the samples had five to six vessels and weak edema. In examining the results of the equality test of the average inflammation cells on different days in the hydrogel and control groups, there was no significant difference on different days (p value=0.42) and (p value=0.11). However, in the chitosan film group, it can be claimed that chitosan film reduced inflammation (**Figure 3**).

Table 3) The average amount of epithelialization in the samples

Day	Chitoheal		chitosan		Negative control	
	mean	Standard deviation	mean	Standard deviation	mean	Standard deviation
3	3	1	2.66	0.57	2.33	0.57
7	3.33	0.57	3	0.0	2.66	0.57
14	3.66	0.57	4	0.0	3.66	0.57
21	4	0.0	4	0.0	4	0.00

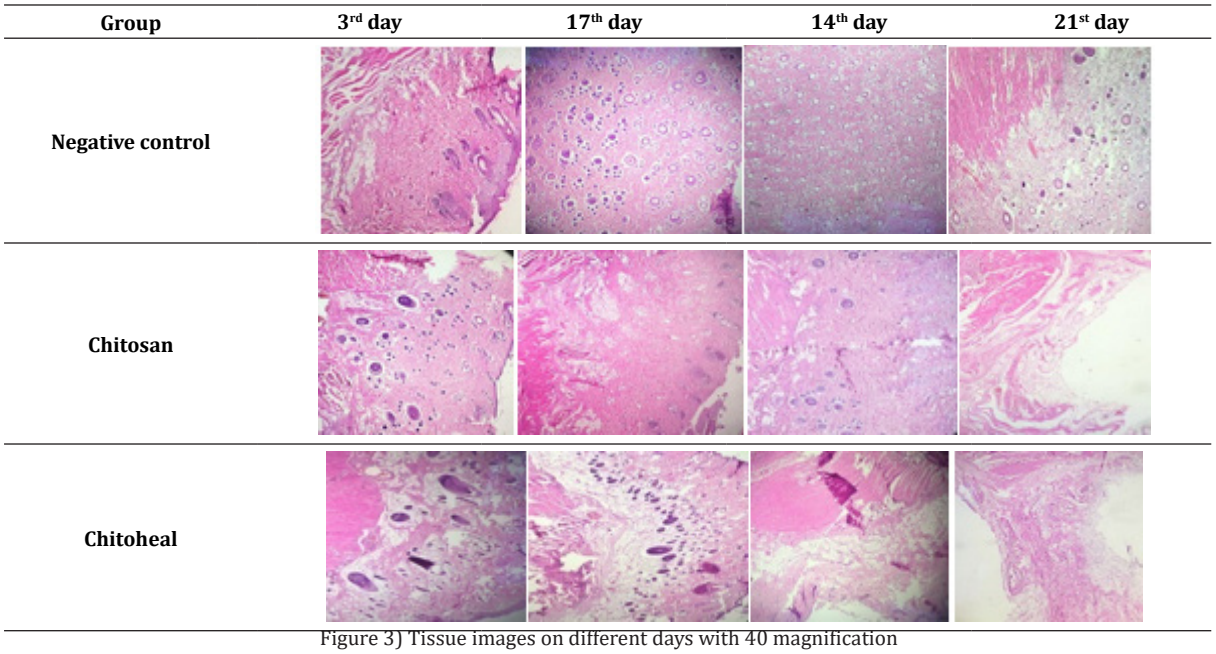


Figure 3) Tissue images on different days with 40 magnification

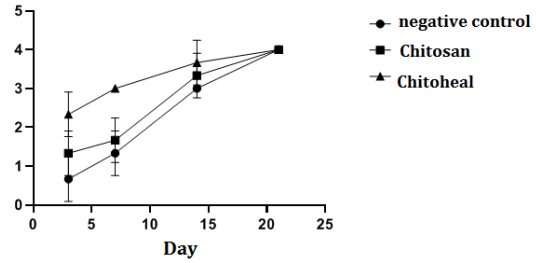


Chart 1) Structure and organization of collagen

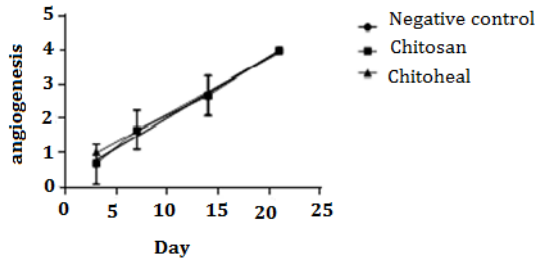


Chart 2) Angiogenesis

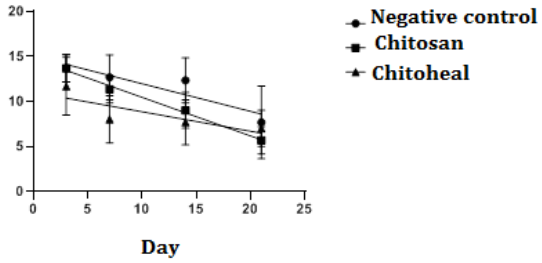


Chart 3) Number of inflammatory cells

2- MOLECULAR STUDY of GROUPS

Based on table 4 and chart 4, the level of interleukin eight gene expression was visible compared to the expression in the negative control. Numbers greater than one indicate an increase and less than that indicate a decrease in gene expression. In table 5 and chart 5, the results of interleukin 10 gene expression compared to the negative control can be seen. Numbers greater than one indicate increased expression compared to the negative control. By examining the level of IL-8 gene expression, a significant increase (p value=0.014) of gene expression was evident in the two groups of chitosan in the form of film and hydrogel compared to the negative control on the third day. Meanwhile, this difference was insignificant in the film and hydrogel groups (p value=0.40). On the seventh day, a significant decrease of interleukin eight was observed in both film and hydrogel groups (p value=0.03). Also, in the examination of the film and hydrogel forms on the seventh day (p value=0.10), the fourteenth day (p value=0.1), and the twenty-first day (p value=0.99), no significant difference was observed between the two groups. Based on the results, a significant increase in the expression of the interleukin ten genes was observed in the two groups of chitosan in the form of film and hydrogel compared to the control group on the third day (p value=0.003). In contrast, this difference between the two forms of the film and the hydrogel was not evident. There was no significant difference between the groups on the seventh day (p value=0.09) and the fourteenth day (p value=0.10). However, on the 21st day, a significant increase in the expression of the interleukin ten genes was seen in the chitosan and hydrogel film groups compared to the negative control (p value=0.04); no significant difference was observed between the two forms of film and hydrogel (p.value=0.07).

Table 4) Examining the expression of the interleukin 8 genes compared to the negative control

Day	Chitoheal		chitosan		Negative control	
	mean	Standard deviation	mean	Standard deviation	mean	Standard deviation
3	1.3*	0.17	2.03*	1.11	1	0
7	0.61**	0.10	1.74*	0.912	1	0
14	1.09	0.17	2.6*	0.98	1	0
21	1.13	0.41	1.07	0.305	1	0

*significant increase compared to negative control
**significant decrease compared to negative control

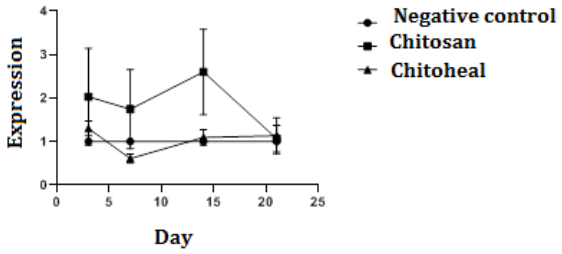


Chart 4) Interleukin 8 gene expression compared to the control group

Table 5) 10 Interleukin gene expression compared to negative control

Day	Chitoheal		chitosan		Negative control	
	mean	Standard deviation	mean	Standard deviation	mean	Standard deviation
3	3.68*	1.03	2.12*	0.80	1	0
7	0.58	0.24	1.61*	1.20	1	0
14	0.28**	0.25	1.35**	0.40	1	0
21	4.53*	0.83	5.26*	0.88	1	0

*Significant increase compared to the control group
**Significant difference between two groups of chitoheal and Chitosan

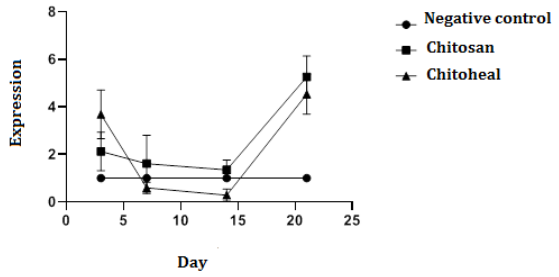


Chart 5) 10 Interleukin gene expression compared to negative control

MAIN COMPARISON to the SIMILAR STUDIES

Thakur reported in 2014 that hydrogel-based polymer dressings facilitate patient wound healing by accelerating and increasing epithelization. Therefore, the number of healed wounds with hydrogel dressings was 85%, and with traditional gauze dressings was 50% [21]. In the histological and molecular examination of inflammatory factors, the favorable effect of chitosan in both forms in controlling inflammation was evident compared to the negative control group; an active wound healing depends on the completion of the inflammatory phase after the injury and if the inflammatory phase is prolonged, it leads to the recurrence of the wound. The increase in the inflammation phase causes an increase in the level of MMPs such as collagenase and gelatinase, which increase MMPs cause damage to the tissue and disruption of the wound healing process. Based on this, the two forms of film and hydrogel do not significantly differ in controlling inflammation from a molecular point of view. However, a sizeable internal variance difference in the film group was seen in some factors, which indicates the different immunological reactions of the animals. However, with the statistical analysis of the number of inflammatory cells, the effect of the form of chitosan film was evaluated as more suitable than hydrogel. Burkatovskaya et al. used dressings impregnated with chitosan for therapeutic effects in wounds infected with Staphylococcus aureus in a mouse model in a 2008 study. In this study, it has been observed that using this dressing for three consecutive days accelerates wound healing compared to the control group; also, the mentioned dressing has reduced inflammation and created significant antimicrobial effects compared to the control group [22], which was consistent with the present study. By examining the degree of epithelialization and the structure and organization of collagen, the favorable effect of chitosan in both film and hydrogel forms was evident; in a way that it can be claimed that the healing time of the burn wound in two chitosan groups is less than the negative control group. In a review study in 2018, Liu et al. investigated the excellent effectiveness of chitosan on wound healing and emphasized its positive effect [23], which was consistent with the results of this study. ... [24].

LIMITATIONS

One of the biggest challenges for researchers at the time of conducting the study was the Corona pandemic; at the time of the study, many academic and research centers were closed due to health guidelines.

SUGGESTIONS

The presence of chitosan hydrogel and its film form to treat burns requires additional compounds such as antibiotics and similar compounds for greater effectiveness. It is suggested to make chitosan film with complementary compounds such as silver nanoparticles or probiotics and antibiotics in the form of a composite and check its effectiveness.

CONCLUSIONS

The use of chitosan in the form of film and hydrogel is not different. However, due to the film form's ease of use of the film form and better control of inflammation, and no need for continuous replacement, the chitosan film is better and more efficient in police missions.

CLINICAL & PRACTICAL TIPS in POLICE MEDICINE

New dressings in different forms can reduce the risks associated with possible injuries in the missions of Police personnel.

ACKNOWLEDGMENTS

The researchers of this study thank the laboratory experts of Valiasr Hospital for their cooperation in some stages of the project.

CONFLICT of INTEREST

The authors state that the present study has no conflict of interest.

FUNDING SOURCES

This study was supported by the Islamic Azad University of Karaj in Iran as a part of the Ph.D. thesis.

ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2022;11(1):e31

نشریه طب انتظامی

مقاله اصیل

دسترسی آزاد

اثربخشی زخم‌پوش کیتوزان به شکل فیلم در مقایسه با هیدورژل آن بر ترمیم زخم سوختگی در مدل رات نر نژاد ویستار

سید امین موسوی‌نژاد[1] PhD Candidate، ناصر هرزندی[1] PhD، اعظم مرجانی[2] PhD، پروانه جعفری[3] PhD

[1] گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
[2] گروه شیمی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.
[3] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران.

چکیده

اهداف: زخم پوش‌های نوین به شکل‌های فوم، فیلم، هیدروکلوئید و هیدروژل ساخته و مورد استفاده قرار می‌گیرند. هدف از این تحقیق مقایسهٔ اثربخشی کیتوزان به شکل فیلم و هیدروژل بر زخم ناشی از سوختگی در مدل حیوانی بود.

مواد و روش‌ها: مطالعهٔ حاضر از نوع مداخله‌ای تجربی در مدل حیوانی بود که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج در زمستان ۱۴۰۰ انجام شد. پانسمان به دو شکل فیلم و هیدروژل بر پایه کیتوزان تهیه شد. ۳۶ رات به سه گروه کنترل منفی، هیدروژل و فیلم تقسیم شدند. پس از ایجاد زخم در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ ترمیم با روش‌های بافت‌شناسی و مولکولی بررسی شدند. نتایج با کمک نرم افزار SPSS 21 و به کمک آزمون‌های ناپارامتری تجزیه و تحلیل شدند..

یافته‌ها: ۳۶ رات نر نژاد ویستار با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج نشان داد درصد ترمیم زخم تا روز سوم در گروه‌ها یکسان و در روزهای ۷ و ۱۴ به ترتیب در گروه فیلم ۵۶/۵۵±۳/۱۶ و ۷۶/۶۶±۴/۰۴ درصد و در گروه هیدروژل ۶۰/۶۶±۲/۵۱ و ۸۸/۳۳±۲/۰۸ درصد بود که در مقایسه با گروه کنترل منفی (۲۰/۵۵±۲/۸۱ و ۵۰/۳۳±۵/۸۵ درصد) اختلاف معنی‌داری (p-value=۰/۰۰۲) را نشان داد. در بررسی بافت‌شناسی، ۱۰۰٪ گروه فیلم و ۶۶/۷٪ گروه هیدروژل در روز چهاردهم دارای اپیتلیال متوسط و کامل بودند؛ روند ترمیم با بررسی ماتریس کلاژنی و رگزایی نیز مبین تأثیر بهتر کیتوزان در هر دو شکل مداخله بود. در بررسی سلول‌های التهابی، کنترل بهتر التهاب در گروه فیلم در مقایسه با سایر گروه‌ها مشهود بود. در بررسی مولکولی، افزایش بیان ژن IL-8 به عنوان فاکتور دخیل در ایجاد التهاب، در دو گروه فیلم و هیدروژل تا روز سوم و کاهش بیان آن در سایر روزها مشاهده شد؛ در بررسی بیان ژن IL-10 که عامل مهارکنندهٔ التهاب است بین دو شکل فیلم و هیدروژل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p-value=۰/۰۷) اگرچه با کنترل منفی اختلاف معنی‌داری داشتند.

نتیجه‌گیری: باتوجه به سهولت در بکارگیری و نگهداری شکل فیلم و کنترل بهتر التهاب، به نظر می‌رسد شکل فیلم بر هیدروژل ارجحیت داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: سوختگی، هیدروژل، کیتوزان، رات

نحوه استناد به مقاله:

Mousavinezhad SA, Harzandi N, Marjani A, Jafari P. *The Effectiveness of Chitosan Wound Dressing in the Form of a Film Compared to Its Hydrogel on Burn Wound Healing in the Male Wistar Rat Model.* J Police Med. 2022;11(1):e31.

نویسنده مسئول*:

آدرس پستی: کرج ، انتهای رجایی شهر ، تقاطع بلوار موذن و استقلال ، مجتمع دانشگاهی امیرالمومنین (ع)، کد پستی: ۳۱۴۹۹۶۸۱۱۱
تلفن: ۰۲۶۳۴۴۱۸۱۴۳
پست الکترونیکی: nasharzan@gmail.com

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۲
پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۱۸
انتشار: ۱۴۰۱/۰۷/۰۹

Copyright © 2022, 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. 2022;11(1):e31

مقدمه

سوختگی، نوعی زخم است که بر اثر گرما، جریان الکتریسیته، مواد شیمیایی، اصطکاک یا پرتو به وجود می‌آید. سوختگی‌ها در سه سطح، سوختگی سطحی یا درجه اول، سوختگی با ضخامت نسبی یا درجه دوم و سوختگی با ضخامت کامل یا درجه سوم طبقه‌بندی می‌شوند [۱]. سوختگی پس از حوادث ترافیکی، بیشترین تعداد مصدومین ناشی از حوادث را به خود اختصاص می‌دهد. در کشورهای در حال توسعه سالانه حدود ۲/۵ میلیون نفر دچار صدمات ناشی از سوختگی می‌شوند که در حدود ۴۰٪ از این مصدومان در بیمارستان بستری شده و حدود ۱۰٪ نیز در اثر صدمات ناشی از سوختگی فوت می‌کنند [۲]. سوختگی در مجروحین جنگی نیز بسیار شایع بوده و حدود ۳۰٪ مجروحین جنگ را شامل می‌شوند [۳]. عوامل مختلفی در روند درمان زخم دخیل هستند؛ بهبود زخم شامل هموستاز، التهاب، تشکیل بافت گرانوله و بازسازی است. این مراحل بهبود، متأثر از برخی عوامل فردی و خاص مانند تغذیه، سن بیمار، بیماری زمینه‌ای، اندازه، عمق و علت زخم است [۴].

ترمیم زخم یک پروسه دینامیک و پیچیده است و هدف از آن، بازسازی پوست به عنوان اولین سد ایمنی بدن است؛ در این پروسه، سلول‌های مختلفی ازجمله کراتینوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها، ماکروفاژها و پلاکت‌ها نقش دارند و هرگونه اختلال در آن سبب مزمن‌شدن زخم می‌شود [۵]. همچنین بی‌توجهی به آن چه در عملیات‌های نظامی و چه در آسیب‌هایی که برای مردم عادی رخ می‌دهد، می‌تواند آسیب‌های جبران‌ناپذیری نظیر اغما و حتی مرگ به همراه داشته باشد [۶]. بنابراین محققان به دنبال یافتن روش مناسبی برای بهبود سریع‌تر زخم با کم‌ترین عارضه جانبی هستند.

تا قبل ازقرن بیستم، چنین تصور می‌شد که زخم‌ها در صورتی که باز و خشک نگه داشته شوند، سریع‌تر بهبود می‌یابند. در واقع تا آن زمان زخم‌بندهای خشک، استاندارد مراقبت از زخم‌ها به شمار می‌آمدند [۷]؛ اما عملاً تأثیر چندانی در فرآیند التیام و بهبود زخم نداشتند. درسال ۱۹۶۲ میلادی، درنتیجه مطالعات و تحقیقات *Winter* و همکاران [۸]، معلوم شد که ایجاد سطحی مرطوب بر سطح زخم، فرآیند التیام وترمیم به صورت چشمگیری تحت تأثیر قرارمی‌گیرد؛ این کشف، روش‌های متداول موجود درمراقبت از زخم‌ها را متحول کرد و زمینه را برای استفاده از زخم‌بندهای مرطوب آماده ساخت. زخم‌بندهایی که با ایجاد و نگهداری سطحی مرطوب بر روی زخم، التیام آن را تسریع و بهینه می‌نمایند، امروزه به عنوان ابزار نوین در عرصه مراقبت از زخم‌ها شناخته شده‌اند [۹].

بر این اساس، یک زخم‌پوش مناسب باید در اطراف زخم یک محیط موضعی مرطوب ایجاد کند، انتقال‌دهندهٔ مناسب گازها، حذف‌کنندهٔ ترشحات بیش از حد زخم، محافظت‌کننده زخم در برابر عفونت و آلودگی‌ها، کاهنده نکروز سطح زخم، تحریک‌کنندهٔ فاکتورهای رشد، غیرآلرژیک، غیرسمی و سازگار با بدن، زیست‌تخریب‌پذیر وکمک‌کننده به کاهش درد زخم با قابلیت تعویض آسان و راحت باشد [۱۰]. در پانسمان زخم‌ها، درد حاصل از تعویض پانسمان‌ها کمتر از درد زخم اولیه نیست؛ بر این اساس ساخت پانسمان‌هایی که ضمن حفظ شرایط مطلوب زخم‌ها، نیاز به تعویض مستمر نداشته باشند و استفاده از آن آسان باشد از الویت‌های پژوهشی در طراحی و ساخت زخم‌پوش‌ها به حساب می‌آید [۱۱]. زخم‌پوش‌های نوین به اشکال فوم، فیلم، هیدروکلوئید و هیدروژل ساخته می‌شوند. زخم‌پوش‌های هیدروژل، شبکه سه‌بعدی از پلیمرهای آب‌دوست هستند که تا ۹۵ درصد قابلیت نگهداری آب را در خود دارند؛ این زخم‌پوش‌ها که از پیوندهای فیزیکی یا شیمیایی پلیمرهای آب‌دوست تشکیل شده‌اند، با ساختارهای آب‌دوست نامحلول، پتانسیل قابل توجهی برای جذب ترشحات زخم دارند و باعث انتشار اکسیژن شده و روند بهبود زخم را تسریع می‌کنند [۱۰].

زخم‌پوش‌های هیدروژلی به سبب تورم در اثر جذب ترشحات زخم، برای زخم‌هایی استفاده می‌شوند که ترشحات کم تا متوسط دارند این زخم‌پوش‌ها به دلیل سطح مرطوب و چسبندگی کم با زخم، به راحتی جدا می‌شوند. همچنین به دلیل داشتن استحکام مکانیکی ضعیف، در دست گرفتن آنها مشکل است که این موضوع بر پذیرش درمان توسط بیمار اثرگذار است [۱۲]. شکل فیلم زخم‌پوش، شفاف بوده و توانایی عبور اکسیژن، دی‌اکسید کربن و بخار آب را دارد. این نوع زخم‌پوش‌ها قابلیت دبریدمان خود به خودی زخم را داشته و از عبور باکتری‌ها جلوگیری می‌کند. این زخم‌پوش‌ها در ابتدا از نایلون و ترکیبات پلی‌اورتان ساخته شده بودند و به واسطه انعطاف‌پذیری بر روی زخم‌های کم‌ترشح استفاده می‌شدند [۱۳].

امروزه استفاده از ترکیبات زیست‌فعال که از مواد زیستی تشکیل می‌شوند، رو به افزایش است. زخم‌پوش‌های حاصل از این ترکیبات به واسطه زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری و غیرسمی بودن، مورد توجه محققان قرار گرفته شده‌اند. این ترکیبات از بافت‌های طبیعی یا منابع مصنوعی مانند کلاژن، اسیدهیالورونیک، آلژینات، الاستین و کیتوزان به‌دست می‌آیند [۱۳]. ازجمله ترکیبات زیست‌فعال، کیتوزان (پلی ۲-آمینو-۲ دئوکسی-D گلوکز) است که از داستیلاسیون کیتین به وجود می‌آید؛ کیتین یک پلی‌ساکارید کوپلیمر بوده که متشکل از واحدهای N-استیل- دی گلوکوز آمین و N-گلوکز آمین است و به اشکال تصادفی یا بلوکی در طول رشتهٔ بیوپلیمر توزیع شده‌اند. کیتوزان بعد از سلولز دومین بیوپلیمر فراوان در جهان است [۱۴]. پلیمر کیتوزان دارای ویژگی‌هایی همانند: زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، فعالیت ضدانعقادی،

ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2022;11(1):e31

ضدالتهابی و کنترل‌کننده عفونت است، همچنین N-استیل گلوکز آمین که یک جز مهم از بافت پوست است و برای بهبود زخم ضروری است، در ساختار کیتین وکیتوزان وجود دارد؛ گروه‌های آمین موجود در سطح غشا کیتوزان با گروه‌های اسیدی از اجزای خون، کمپلکس پلی الکترولیت تشکیل داده و سبب تسریع در انعقاد خون می‌شود [۱۵].

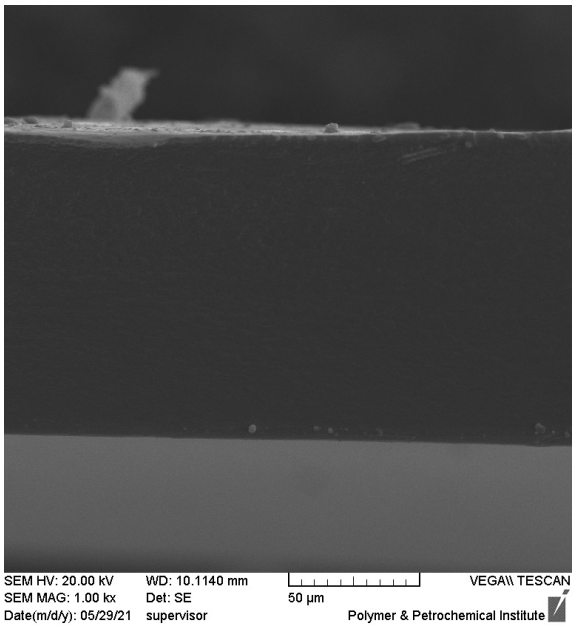
کیتوزان، گرانولاسیون زخم را افزایش می‌دهد به طوری که یک عامل محرک برای درمان زخم‌های باز و عمیق به حساب می‌آید. با توجه به ویژگی‌های هموستازی، ضد التهابی و ضدمیکروبی، کیتوزان می‌تواند روند بهبود زخم را افزایش دهد [۱۶]. هدف از این مطالعه، بررسی اثربخشی زخم‌پوش تهیه‌شده از کیتوزان به صورت فیلم در مقایسه با شکل تجاری آن به صورت هیدروژل بر ترمیم زخم سوختگی در مدل رات نر نژاد ویستار بود تا با توجه به ساختار و اثربخشی بهتر هر کدام و نیز با در نظر گرفتن سهولت کار و قابلیت حمل راحت‌تر، بتوان در مأموریت‌های پلیس مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر، یک مطالعه مداخله‌ای تجربی با گروه کنترل است که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج در تابستان ۱۴۰۰ انجام شد. برای انجام این مطالعه ابتدا پانسمان مورد نظر بر پایه کیتوزان به صورت فیلم ساخته شد. برای ساخت فیلم مورد نظر محلول (v/w) ۱۰٪ کیتوزان با وزن مولکولی متوسط ساخت شرکت سیگما آلدریچ، در آب مقطر تهیه شد، سپس به مدت نیم ساعت روی گرمکن با همزن مغناطیسی قرار داده شد و دمای گرمکن از سی درجه سلسیوس تجاوز نکرد. ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد و با افزودن اسید استیک گلاسیال، pH محلول به حدود ۴ رسانده شد، محلول حاصل به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۹ درجه بر روی گرمکن با همزن مغناطیسی و سپس نیم ساعت در حمام اولتراسونیک تمیار شد تا از انحلال کامل کیتوزان اطمینان حاصل شود؛ سپس در پلیت ریخته و در دمای اتاق قرار گرفته شد تا خشک شود؛ پس از خشک شدن ضخامت فیلم حاصل با استفاده از میکرومتر دیجیتال اندازه گیری شد و برای بررسی ساختار و یکنواختی مخلوط با کمک میکروسکوپ الکترونی SEM از غشای حاصل تصویربرداری شد در شکل ۱ ضمن می‌توان یکنواختی و ضخامت فیلم را مشاهده نمود.

ارزیابی بالینی اثربخشی بر بهبود زخم سوختگی

۳۶ سر رات نر نژاد ویستار با سن ۴ هفته و وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم از پژوهشگاه رویان جهاد دانشگاهی خریداری شد. حجم نمونه بر اساس سه بار تکرار در هر روز و در مجموع ۱۲ نمونه در هر گروه محاسبه شد. معیار خروج از مطالعه وجود زخم در پوست و وجود هر نوع علامت بیماری در رات‌ها در نظر گرفته شد. رات‌ها در شرایط یکسان و در قفسه‌های جدا با دسترسی آزاد به آب و غذا که دانه‌های تجاری و استاندارد (تهیه‌شده از پژوهشگاه رویان) بود با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۴±۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۴۰-۳۰ درصد [۱۷] در حیوان‌خانه دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج نگهداری شدند. پس از ۲ هفته سازگاری، رات‌ها به‌صورت تصادفی به سه گروه (n=۱۲) شامل گروه کنترل منفی (پانسمان با گاز استریل)، گروه شاهد (پانسمان با هیدروژل کیتوهیل) و گروه آزمون (پانسمان با فیلم کیتوزان) تقسیم شدند.



شکل ۱) تصویربرداری الکترونی SEM از فیلم کیتوزان

ایجاد زخم و تیمار

رات‌ها با داروی بیهوشی ترکیبی کتامین ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند [۱۸]. موی ناحیه پشت رات‌ها با کمک ماشین اصلاح تراشیده شد. ناحیه مورد نظر ضدعفونی شد و توسط صفحه‌ای فلزی به وزن ۵۰ گرم و به مساحت ۱ در ۱/۳ میلی‌متر که توسط شعله به دمای حدود ۳۰۰ درجه سلسیوس رسیده بود، بدون ایجاد فشار خارجی، زخم سوختگی ایجاد شد. قبل از پانسمان زخم با سرم فیزیولوژی استریل شستشو شد و پس از دبریدمان زخم براساس گروه‌بندی و نوع مداخله، رات‌ها با پانسمان مناسب تیمار شدند. فیلم کیتوزان قبل از استفاده در سود ۰/۱ مولار به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور شد پس از خشک شدن با آب مقطر استریل شستشو و با چسب ضد حساسیت بر روی زخم ثابت شد. اقدامات درمانی و پانسمان سوختگی تنها یک‌بار در همان روز صفر صورت گرفت.

اندازه گیری میزان انقباض زخم

روند ظاهری بهبود از طریق اندازه‌گیری مساحت و درصد بهبودی زخم ارزیابی شد. برای این منظور پس

ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2022;11(1):e31

از بیهوش کردن رت‌ها در روزهای مشخص، ابعاد زخم با استفاده از کولیس تعیین و درصد بهبودی براساس فرمول زیر محاسبه شد:

ارزیابی بافت‌شناسی

در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱، سه رات از هر گروه به صورت تصادفی انتخاب، با کتامین و زایلازین بیهوش با قطع نخاع گردنی رات‌ها کشته و با خونگیری از قلب، از مرگ رات‌ها اطمینان حاصل شد؛ پس از بررسی ظاهر زخم و اندازه‌گیری سطح زخم، نمونه بافتی از زخم گرفته شد. یک قسمت از بافت برای انجام آزمایشات بافت‌شناسی در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و قسمت دوم برای بررسی بیان ژن در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. به منظور ارزیابی بافت‌شناسی، نمونه‌ها پس از آماده‌سازی و برش به روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند؛ برای این منظور نمونه‌های بافتی در فرمالین ۱۰٪ به مدت ۲۴ ساعت فیکس شدند. به طور خلاصه ابتدا آب‌گیری از نمونه با قرارگیری در درصدهای فزاینده الکل انجام شد وسپس به کمک نسبت‌های مختلف اتانول- تولوئن، الکل‌زدایی شد. پس از تهیه بلوک‌های پارافین، اسلایدهایی از برش‌های بافتی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و با رنگ هماتوکسیلین وائوزین رنگ‌آمیزی شدند [۱۹]. برای کمی کردن متغیرهای کیفی و مقایسه آنها، این‌گونه اقدام شد: اپیتلیزاسیون: عدم تکثیر سلول‌های اپیتلیال ۱، سازمان اپیتلیال ضعیف ۲، سازمان اپیتلیال ناقص ۳ و اپیتلیال متوسط و کامل ۴؛ سازمان و ساختار ماتریس کلاژن: نابالغ صفر، نازک ۱، بازسازی متوسط ۲، کلاژن خوب و ضخیم ۳، تکمیل شده ۴؛ رگزایی: عدم وجود صفر، وجود احتقان و خونریزی و ادم ۱، هموراژ و دو رگ در محل ۲، سه تا چهار رگ و ورم متوسط ۳، پنج تا شش رگ و آدم خفیف ۴؛ درجه التهاب: بر اساس شمارش سلول‌های التهابی مشخص گردید.

بررسی بیان ژن

در روزهای ۳، ۷، ۱۴، ۲۱ بیان ژن‌های اینترلوکین‌های ۸، ۱۰ و ژن Gapdh در نمونه‌های پوستی با استفاده از روش PCR RealTime بررسی شد [۲۰]. برای این منظور ابتدا RNAها از بافت پوست به کمک کیت RNX-plus شرکت سیناکلون جدا شدند و در ادامه CDNA ساخته شد به این ترتیب که ۱۰ میکرولیتر از RNA به همراه ۲ میکرولیتر بافر 5X، ۱ میکرولیتر dNTP، ۰/۵ میکرولیترآنزیم RT(Transcriptase Reverse)، ۱ میکرولیتر پرایمر، بر اساس جدول ۱، و ۵/۵ میکرولیتر آب در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه برای اتصال پرایمر، دمای ۴۲ درجه سلسیوس مدت ۱ ساعت برای سنتز cDNA و دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه برای غیرفعال کردن آنزیم RT قرار داده شد. در این قسمت از دستگاه ترموسایکلر PCR پرسونال مدل A100 استفاده شد. برای بررسی میزان بیان ژن از روش Relative quantification با کمک ژن Keeping-House که در این تحقیق از ژن Gapdh (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) و با کمک دستگاه PCR Time Real بهره برده شد، استفاده گردید. میزان بیان ژن‌ها با بیان ژن Gapdh نرمال شد و به‌صورت (ΔCT=Ct – Gapdh CT (mRNA target ΔCT value مشخص گردید. میزان چند برابری بیان نسبت به گروه کنترل با استفاده از $R=2^{-\Delta\Delta Ct}$ تعیین شد [۲۱]. داده‌های حاصل از PCR Time Real به صورت عدد CT بود که نشان‌دهندهٔ شمارهٔ سیکلی است که در آن تکثیر به صورت نمایی شروع می‌گردد و نمودار صعودی می‌شود.

جدول ۱) سکانس پرایمرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژن‌ها

Primer Name	Sequence 5'→ 3' (10-50 bp)
IL10-F	CCTTGTCAGAAATGATCAAG
IL10-R	AGAGGGTCTTCAGCTTCTCTC
IL 8-F	CGTGGCTCTCTTGGCAGCCTTC
IL 8-R	TCCACAACCCTCTGCACCCAGTT
GAPDH-F	ATAGAAGGCTGGGGCTCAC
GAPDH-R	ATTCACGATGCCAAAGTTG

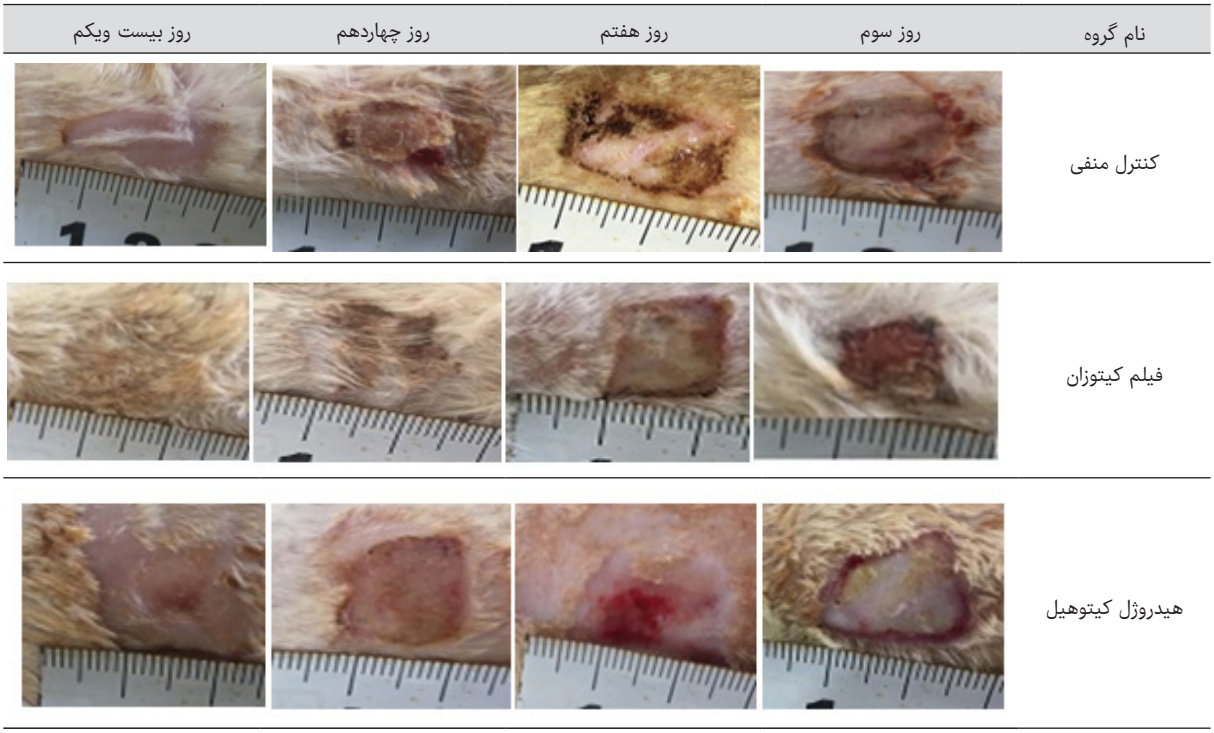
ملاحظات اخلاقی: این مطالعه دارای شناسه اخلاق به شمارهٔ 1399.020.REC.K.IAU.IR ازکمیته اخلاق تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج است. در طول پژوهش سعی شد تمامی امور مرتبط با اخلاق پژوهش و حقوق حیوانات رعایت شود.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: آنالیز داده‌های حاصله با استفاده از از نرم‌افزار SPSS IBM 21 با کمک آزمون‌های آماری Test Wallis Kruskal و Mann-Whitney صورت گرفت. معیار استنتاج آماری p≥۰/۰۵ معنادار درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

بر اساس نتایج بالینی زخم سوختگی رات‌ها از نوع درجه دوم بود. در اثر سوختگی اندام‌های زیرین، آسیب ندیده بودند. پس از ۲۱ روز به نظر می‌رسد ترمیم زخم در همهٔ گروه‌ها تکمیل شده بود، در شکل ۲ روند ترمیم زخم‌ها قابل مشاهده است. مقایسهٔ میانگین درصد ترمیم زخم در روز سوم بین گروه‌ها، اختلاف معناداری بین گروه‌ها وجود نداشت (p.value=۰/۸۱) که نشان‌دهندهٔ یکسان بودن زخم اولیه بود (جدول ۲). با گذشت زمان و در روزهای هفتم و چهاردهم، درصد ترمیم زخم در دو گروه مداخله نسبت به گروه کنترل منفی افزایش معناداری پیدا کرد (p.value=۰/۰۰۲)، این در حالی بود که بین دو گروه فیلم کیتوزان و هیدروژل کیتوهیل در روز هفتم (p.value=۰/۲) و روز چهاردهم (p.value=۰/۱) اختلاف معناداری مشاهده نشد. در روز ۲۱ از نظر آماری، درصد بهبود زخم در تمامی گروه‌ها یکسان بود (p.value=۰/۱).

ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2022;11(1):e31



شکل ۲) تصاویر روند ترمیم زخم در روزهای ۳، ۷، ۱۴، ۲۱

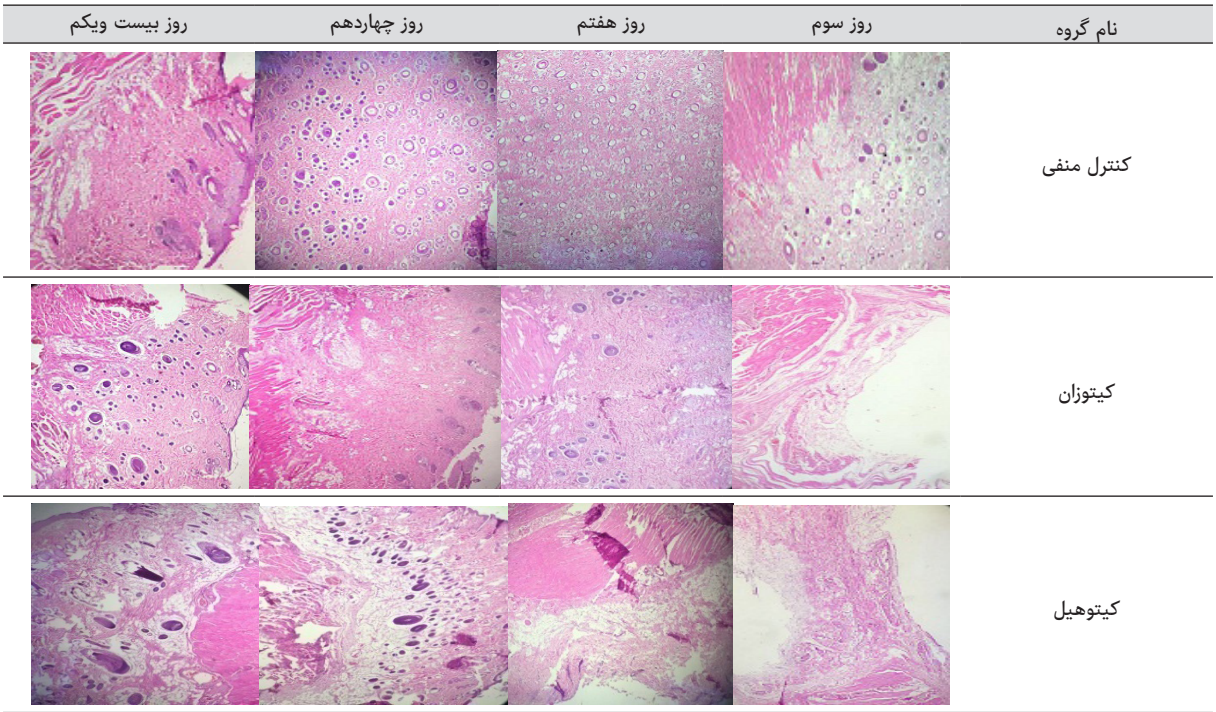
جدول ۲) درصد بهبودی زخم سوختگی

روز	هیدروژل کیتوهیل		فیلم کیتوزان		کنترل منفی	
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
۳	۹	۱	۱۰/۰۱	۱/۰۱	۹/۲۳	۰/۶۷
۷	*۶۰/۶۶	۲/۵۱	*۵۶/۵۵	۳/۱۶	۲۰/۵۵	۲/۸۱
۱۴	*۸۸/۳۳	۲/۰۸	*۷۶/۶۶	۴/۰۴	۵۰/۳۳	۵/۸۵
۲۱	۹۷/۶۶	۲/۵۱	۹۶/۹۳	۲/۷۲	۹۶/۳۳	۳/۷۸

* p<۰/۰۵

نتایج بافت‌شناسی

برای ارزیابی بافت‌شناسی از متغیرهایی مانند میزان اپیتلیال‌سازی، رگزایی، التهاب و ماتریس خارج سلولی بهره گرفته شد. روند تغییر این متغیرها در شکل ۳ قابل مشاهده است. در گروه کنترل منفی در روز سوم، ۶۶/۷ درصد نمونه‌ها دارای سازمان اپیتلیال ضعیف و ۳۳/۳ درصد از نمونه‌ها دارای سازمان اپیتلیال ناقص بودند؛ در روز هفتم



شکل ۳) تصاویر بافت در روزهای مختلف با بزرگنمایی ۴۰

ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2022;11(1):e31

۳۳/۳ درصد نمونه‌های گروه کنترل منفی دارای سازمان اپیتلیال ضعیف و ۶۶/۷ درصد از نمونه‌ها، سازمان اپیتلیال ناقص داشتند، در روز چهاردهم ۳۳/۳ درصد نمونه‌ها دارای سازمان اپیتلیال ناقص و ۶۶/۷ درصد، اپیتلیال متوسط و کامل بودند و در نهایت در روز بیست و یکم، ۱۰۰ درصد نمونه‌ها دارای اپیتلیال متوسط و کامل بودند (جدول ۳). در گروه هیدروژل، در روز سوم ۳۳/۳ درصد دارای سازمان اپیتلیال ضعیف، ۳۳/۳ درصد سازمان اپیتلیال ناقص و ۳۳/۳ درصد دارای اپیتلیال متوسط و کامل بودند، در روز هفتم ۶۶/۷ درصد دارای سازمان اپیتلیال ناقص و ۳۳/۳ درصد دارای اپیتلیال متوسط و کامل بودند، در روز چهاردهم ۳۳/۳ دارای سازمان اپیتلیال ناقص و ۶۶/۷ درصد نمونه‌ها دارای اپیتلیال متوسط و کامل بودند و در روز بیست و یکم ۱۰۰ درصد در گروه اپیتلیال متوسط و کامل قرار داشتند (جدول ۳).

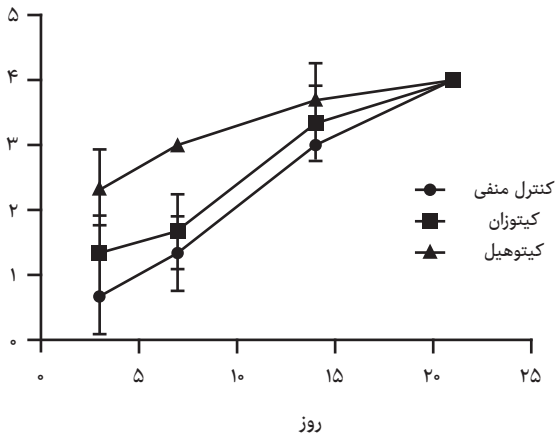
جدول ۳) میانگین میزان اپیتلیال‌سازی در نمونه‌ها

روز	کیتوهیل		کیتوزان		کنترل منفی	
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
۳	۳	۱	۲/۶۶	۰/۵۷	۲/۳۳	۰/۵۷
۷	۳/۳۳	۰/۵۷	۳	۰/۰	۲/۶۶	۰/۵۷
۱۴	۳/۶۶	۰/۵۷	۴	۰/۰	۳/۶۶	۰/۵۷
۲۱	۴	۰/۰	۴	۰/۰	۴	۰/۰۰

در گروه فیلم کیتوزان، در روز سوم ۳۳/۳ درصد در گروه سازمان اپیتلیال ضعیف و ۶۶/۷ درصد در گروه سازمان اپیتلیال ناقص، در روز هفتم ۱۰۰ درصد در سازمان اپیتلیال ناقص بودند؛ در روز چهاردهم ۱۰۰ درصد از نمونه‌ها در ردیف اپیتلیال متوسط و کامل قرار داشتند. با بررسی نتایج در گروه کنترل منفی ۳۳/۳ درصد نمونه‌ها در روز سوم از نظر ساختار و سازمان کلاژن، نابالغ با بافت التهابی و ۶۶/۷ درصد نمونه‌ها دارای ساختار کلاژنی نازک و التهابی بودند، در این گروه در روز هفتم ۶۶/۷ درصد نمونه‌ها دارای ساختار کلاژنی نازک با بافتی التهابی، ۳۳/۳ درصد نمونه‌ها دارای بازسازی متوسط در سازمان و ساختار ماتریس کلاژنی بودند. در روز چهاردهم ۱۰۰ درصد نمونه‌ها از نظر کلاژن، خوب و ضخیم بودند و در روز بیست و یکم همهٔ نمونه‌های بررسی‌شده دارای سازمان و ساختار کلاژنی تکمیل‌شده بودند.

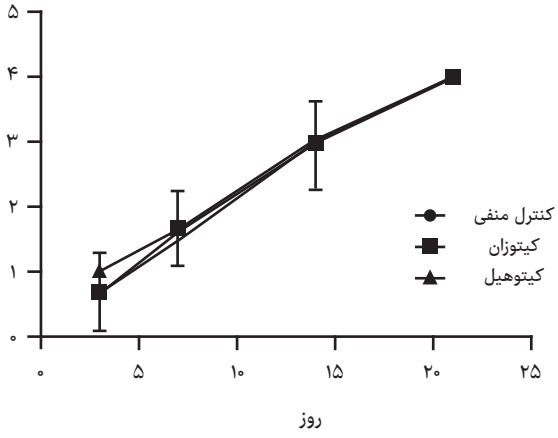
در گروه فیلم کیتوزان از نظر سازمان و ساختار ماتریس کلاژن، ۶۶/۷ درصد از نمونه‌ها در روز سوم دارای ساختار کلاژنی نازک و التهابی و ۳۳/۳ درصد دارای ساختار کلاژنی با بازسازی متوسط بودند؛ در روز هفتم ۳۳/۳ درصد بافت‌های بررسی‌شده دارای ساختار کلاژنی نازک و التهابی و ۶۶/۷ درصد دارای سازمان و ساختار کلاژنی با بازسازی متوسط بودند. در بررسی بافت‌ها در روز چهاردهم، ۶۶/۷ درصد نمونه‌ها دارای سازمان کلاژن خوب و ضخیم و ۳۳/۳ درصد نمونه‌ها در این روز ساختار کلاژنی تکمیل‌شده داشتند و البته ۱۰۰ درصد نمونه‌ها در روز بیست و یکم دارای ساختار و سازمان ماتریس کلاژنی تکمیل‌شده بودند.

در گروه هیدروژل از نظر ساختار و سازمان ماتریس کلاژن در روز سوم، ۶۶/۷ درصد نمونه‌ها دارای ساختاری با بازسازی متوسط و ۳۳/۳ درصد نمونه‌ها دارای ساختار کلاژن خوب و ضخیم بودند، در روز هفتم ۱۰۰ درصد نمونه‌ها دارای ساختار کلاژن خوب و ضخیم و در روز چهاردهم ۳۳/۳ درصد نمونه‌ها، ساختار و سازمان ماتریس کلاژنی خوب و ضخیم داشتند و مابقی در وضعیت تکمیل‌شده بودند. ۱۰۰ درصد نمونه‌ها در روز ۲۱ دارای ساختار و سازمان کلاژنی تکمیل‌شده بودند. در نمودار ۱ می‌توان روند سازمان و ساختار کلاژن را در گروه‌های مختلف مشاهده کرد.



نمودار ۱) ساختار و سازمان کلاژن

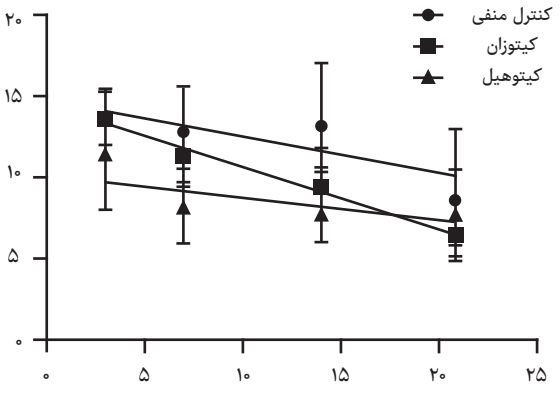
از نظر میزان رگزایی در کنترل منفی، با توجه به نمودار ۲، ۳۳/۳ درصد از نمونه‌ها در روز سوم در دستهٔ عدم وجود رگ و ۶۶/۷ درصد در گروه وجود احتقان و خونریزی و ادم قرار داشتند؛ ۳۳/۳ درصد نمونه‌ها در روز هفتم در دستهٔ وجود احتقان و خونریزی و ادم و ۶۶/۷ درصد هموراژ و ۲ رگ در محل داشتند، در روز چهاردهم ۳۳/۳ درصد از نمونه‌ها در دستهٔ هموراژ و ۲ رگ در محل، ۶۶/۷ درصد ازنمونه‌ها دارای ۳ تا ۴ رگ و ورم متوسط بودند؛ در روز بیست و یکم ۱۰۰ درصد در دستهٔ ۵ تا ۶ رگ و ادم ضعیف قرار داشتند.



نمودار ۲) رگزایی

در گروه هیدروژل کیتوهیل، در روز سوم ۱۰۰ درصد در دستهٔ وجود احتقان و خونریزی و ادم قرار داشتند، در روز هفتم ۳۳/۳ درصد از نمونه‌ها در دستهٔ وجود احتقان و خونریزی و ادم و ۶۶/۷ درصد در دستهٔ هموراژ و ۲ رگ در محل، در روز چهاردهم ۳۳/۳ درصد نمونه‌ها در دستهٔ هموراژ و ۲ رگ در محل و ۶۶/۷ درصد نمونه‌ها در دستهٔ ۳ تا ۴ رگ و ورم متوسط قرار داشتند و در نهایت در روز بیست و یکم، ۱۰۰ درصد نمونه‌ها در گروه ۵ تا ۶ رگ و ادم ضعیف بودند.

در بررسی میزان رگزایی در گروه فیلم کیتوزان، ۳۳/۳ درصد نمونه‌ها در روز سوم، در دستهٔ عدم وجود و ۶۶/۷ درصد در دستهٔ وجود احتقان و خونریزی و ادم قرار گرفتند، در روز هفتم، ۳۳/۳ درصد از نمونه‌ها در دستهٔ وجود احتقان و خونریزی و ادم، ۶۶/۷ درصد در دستهٔ هموراژ و دو رگ در محل و در روز چهاردهم ۳۳/۳ درصد دارای هموراژ و دو رگ در محل و ۶۶/۷ درصد نمونه‌ها دارای سه تا چهار رگ و ورم متوسط بودند و در روز بیست و یکم، ۱۰۰ درصد نمونه‌ها دارای پنج تا شش رگ و ادم ضعیف بودند. در بررسی نتایج آزمون برابری میانگین سلول‌های التهاب در روزهای مختلف در گروه‌های هیدروژل و کنترل، اختلاف معناداری در روزهای مختلف وجود نداشت (p.value=۰/۴۲) و (p.value=۰/۱۱) اما در گروه فیلم کیتوزان می‌توان ادعا کرد که فیلم کیتوزان سبب کاهش التهاب شد (نمودار ۳).



نمودار ۳) تعداد سلول‌های التهابی

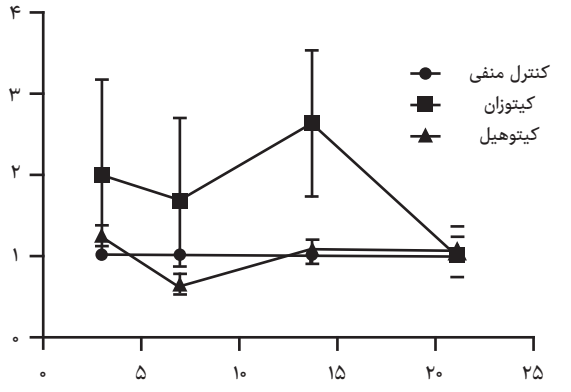
بررسی مولکولی گروه‌ها

بر اساس جدول ۴ و نمودار ۴، میزان بیان ژن اینترلوکین ۸ در مقایسه با بیان در کنترل منفی قابل مشاهده بود. اعداد بیشتر از یک، نشان دهندهٔ افزایش و کمتر از آن نشان دهندهٔ کاهش بیان ژن هستند. در جدول ۵ و نمودار ۵، می‌توان نتایج حاصل از بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در مقایسه با کنترل منفی را مشاهده کرد. اعداد بیشتر از یک، نشان‌دهندهٔ افزایش بیان نسبت به کنترل منفی هستند. با بررسی میزان بیان ژن IL-8، افزایش معنادار (p.value=۰/۰۱۴) بیان ژن در دو گروه کیتوزان به شکل فیلم و هیدروژل نسبت به کنترل منفی در روز سوم مشهود بود. این در حالی است که این اختلاف در دو گروه فیلم و هیدروژل معنادار نبود (p.value =۰/۴۰). در روز هفتم کاهش معنادار اینترلوکین ۸ در دو گروه فیلم و هیدروژل (p.value=۰/۰۳) مشاهده شد. همچنین در بررسی دو شکل فیلم و هیدروژل در روزهای هفتم (p.value=۰/۱۰)، چهاردهم (p.value=۰/۱) و روز بیست‌ویکم (p.value =۰/۹۹) اختلاف معناداری بین دو گروه مشاهده نشد. بر اساس نتایج حاصل، افزایش معناداری در بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در دوگروه کیتوزان به شکل فیلم و هیدروژل در مقایسه با گروه کنترل در روز سوم مشاهده گردید (p.value=۰/۰۰۳) این در حالی بود که این اختلاف بین دو شکل فیلم و هیدروژل مشهود نبود. در روز هفتم (p.value=۰/۰۹) و روز چهاردهم اختلاف معناداری بین گروه‌ها مشهود نبود (p.value=۰/۱۰) اما در روز بیست و یکم شاهد افزایش معنادار بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در دو گروه فیلم کیتوزان و هیدروژل نسبت به کنترل منفی بودیم (p.value=۰/۰۴)؛ بین دو شکل فیلم و هیدروژل اختلاف معناداری مشاهده نشد (p.value=۰/۰۷).

جدول ۴) بررسی بیان ژن اینترلوکین ۸ در مقایسه با کنترل منفی

روز	کیتوهیل		کیتوزان		کنترل منفی	
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
۳	*۱/۳	۰/۱۷	*۲/۰۳	۱/۱۱	۱	۰
۷	**۰/۶۱	۰/۱۰	*۱/۷۴	۰/۹۱۲	۱	۰
۱۴	۱/۰۹	۰/۱۷	*۲/۶	۰/۹۸	۱	۰
۲۱	۱/۱۳	۰/۴۱	۱/۰۷	۰/۳۰۵	۱	۰

*افزایش معنادار نسبت به کنترل منفی
**کاهش معنادار نسبت به کنترل منفی



نمودار ۴) میزان بیان ژن اینترلوکین ۸ در مقایسه با گروه کنترل

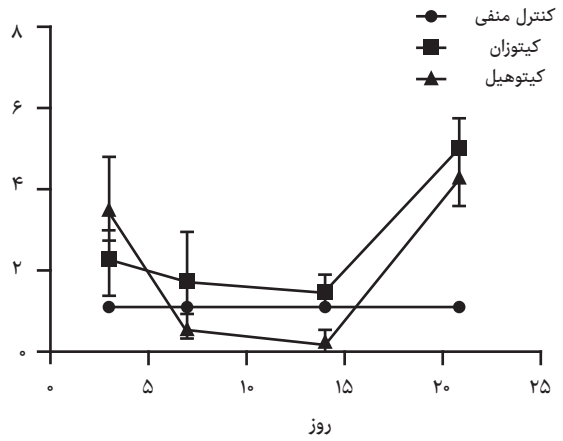
جدول ۵) میزان بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در مقایسه با کنترل منفی

روز	کیتوهیل		کیتوزان		کنترل منفی	
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
۳	*۳/۶۸	۱/۰۳	*۲/۱۲	۰/۸۰	۱	۰
۷	۰/۵۸	۰/۲۴	۱/۶۱	۱/۲۰	۱	۰
۱۴	**۰/۲۸	۰/۲۵	**۱/۳۵	۰/۴۰	۱	۰
۲۱	*۴/۵۳	۰/۸۳	*۵/۲۶	۰/۸۸	۱	۰

*افزایش معنادار نسبت به گروه کنترل

**اختلاف معنادار بین دو گروه کیتوهیل و کیتوزان

ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2022;11(1):e31



نمودار ۵) میزان بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در مقایسه با کنترل منفی

بحث

در این پژوهش زخم‌پوش تجاری کیتوزان به شکل هیدروژل با شکل فیلم آن، به منظور بهره‌گیری از زخم‌پوشی با قابلیت استفاده آسان‌تر و حمل راحت‌تر برای پانسمان زخم سوختگی، مقایسه شد؛ از این رو شکل فیلم کیتوزان را از دو منظر تأثیر بر بافت‌شناسی و تأثیر بر بیان ژن در روند ترمیم زخم سوختگی در رات نر نژاد ویستار با شکل هیدروژل تجاری کیتوزان مقایسه شد.

برای این بررسی ومقایسه ابتدا بر پشت رات‌ها زخم سوختگی درجه دو ایجاد شد؛ بررسی‌های بافت‌شناسی، بر اساس وسعت و عمق زخم ایجادشده، درجه دو بودن زخم را تأیید کردند. با بررسی نتایج ظاهری و ماکروسکوپی و با مقایسه درصد ترمیم زخم‌ها، به نظر می‌رسد کیتوزان در هر دو شکل هیدروژل وفیلم، تأثیر بهتری نسبت به کنترل منفی بر ترمیم زخم داشته بود و این در حالی بود که اختلاف معناداری بین دو شکل کیتوزان و فیلم و هیدروژل مشاهده نگردید. اگرچه به نظر می‌رسد به واسطه استحکام ضعیف ساختار هیدروژل، پذیرش و مقبولیت کمتری نسبت به شکل فیلم آن برای مصرفکنندگان داشته باشد [۱۲]. در سال ۲۰۱۴، *Thakur* گزارش کرده است که پانسمان‌های پلیمری مبتنی بر هیدروژل، بهبود زخم بیمار را با تسریع و افزایش اپیتلیوم‌سازی را تسهیل می‌کنند. از این‌رو تعداد زخم‌های بهبودیافته با پانسمان هیدروژلی، ۸۵ درصد و با پانسمان‌های گاز سنتی ۵۰ درصد بودند [۲۱].

در بررسی بافت‌شناسی و همچنین مولکولی فاکتورهای التهابی، تأثیر مطلوب کیتوزان در هر دو شکل در کنترل التهاب نسبت به گروه کنترل منفی مشهود بود؛ یک درمان زخم فعال، به تکمیل فاز التهابی پس از آسیب وابسته است و اگر فاز التهاب طولانی شود، منجر به عود مجدد زخم می‌شود. افزایش فاز التهاب سبب افزایش سطح MMPها همانند کلاژناز و ژلاتیناز می‌شود که افزایش MMPها سبب آسیب به بافت و اختلال در روند بهبود زخم می‌گردد.

بر این اساس دو شکل فیلم و هیدروژل در کنترل التهاب از نظر مولکولی اختلاف معناداری ندارند، اگرچه شاهد اختلاف واریانس داخلی زیاد در گروه فیلم در برخی فاکتورها بودیم و این مبین واکنش‌های ایمونولژیک متفاوت حیوانات است اما با این حال و با بررسی‌های آماری تعداد سلول‌های التهابی، تأثیر شکل فیلم کیتوزان نسبت به هیدروژل، مناسب‌تر ارزیابی شد. *Burkatovskaya* و همکاران در سال ۲۰۰۸ در مطالعه‌ای از پانسمان‌های آغشته به کیتوزان جهت اثرات درمانی در زخم‌های آلوده به استافیلوکوک اورئوس در مدل موش، استفاده کرده‌اند. در این مطالعه مشاهده شده است که استفاده ۳ روز متوالی از این پانسمان باعث تسریع بهبود زخم نسبت به گروه کنترل می‌شود؛ همچنین پانسمان مورد اشاره، باعث کاهش التهاب و ایجاد اثرات ضدمیکروبی معناداری نسبت به گروه کنترل شده است [۲۲] که با مطالعه حاضر همخوانی داشت.

با بررسی میزان اپیتلیال‌سازی و ساختار و سازمان کلاژن تأثیر مطلوب کیتوزان در دو شکل فیلم و هیدروژل مشهود بود، به نحوی که می‌توان ادعا کرد، زمان‌ترمیم زخم سوختگی در دو گروه کیتوزان نسبت به کنترل منفی کم‌تر است. *Liu* و همکاران در سال ۲۰۱۸ در یک مطالعه مروری، اثربخشی مطلوب کیتوزان بر التیام زخم را بررسی و بر تأثیر مثبت آن تأکید کرده‌اند [۲۳] که با نتایج این پژوهش همخوانی داشت.

یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های محققین در زمان انجام مطالعه، پاندمی کرونا بود؛ در زمان انجام مطالعه به واسطه رعایت شیوه‌نامه‌های بهداشتی بسیاری از مراکز دانشگاهی و تحقیقاتی تعطیل شده بودند. وجود هیدروژل کیتوزان و شکل فیلم آن برای درمان سوختگی برای اثر بخشی بیشتر نیاز به ترکیبات تکمیلی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات مشابه دارد؛ پیشنهاد می‌گردد فیلم کیتوزان با ترکیبات تکمیلی مانند نانو ذرات نقره یا پروبیوتیک‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت کامپوزیت ساخته و اثربخشی آن بررسی شود.

نتیجه‌گیری

استفاده از کیتوزان به شکل فیلم و هیدروژل تفاوتی ندارند اما با توجه به راحتی در کاربرد شکل فیلم و نیز کنترل بهتر التهاب و عدم نیاز به تعویض مستمر، به نظر می‌رسد شکل فیلم کیتوزان برای استفاده در مأموریت‌های پلیسی بهتر و کارامدتر باشد.

نکات بالینی و کاربردی در طب انتظامی: انتخاب تجهیزات و اقلام امدادی و درمانی سبک و قابل حمل با ویژگی سهولت در بکارگیری و اثربخشی بالا در مأموریت‌های پلیسی از اهمیت بالایی برخوردار است. پانسمان‌های نوین با اشکال مختلف می‌توانند خطرات مرتبط با جراحات احتمالی در مأموریت‌های کارکنان فراجا را کاهش دهد.

تشکر و قدردانی: محققان این تحقیق از کارشناسان آزمایشگاه بیمارستان حضرت ولی عصر (عج) فراجا به خاطر همکاری

در برخی مراحل طرح، کمال تشکر را دارند.

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

سهم نویسندگان: نویسنده اول، جمع‌آوری داده‌ها؛ نویسنده دوم، طراحی مطالعه؛ نویسنده سوم، ارائه ایده و نویسنده چهارم تجزیه و تحلیل داده‌ها را بر عهده داشت. همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله و بازنگری آن سهیم بوده و همه با تأیید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

منابع مالی: این مطالعه به عنوان قسمتی از رساله دکتری توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج پشتیبانی شد.

References

1. Black JM, Hawks JH. Medical surgical nursing: Clinical management for positive outcomes, 1st edition. Elsevier. India; Mumbai 2009. https://www.elsevier.com/books/medical-surgical-nursing-clinical-management-for-positive-outcomes-8e-2-vol-set-without-cd/black/978-81-312-2982-8
2. Daryabeigi R, Heidari M, Hosseini SA, Omranifar M. Comparison of healing time of the 2 degree burn wounds with two dressing methods of fundermol herbal ointment and 1% silver sulfadiazine cream. Iran J Nurs Midwifery Res. 2010;15(3):97-101. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3093171/#:~:text=The%20mean%20time%20of%20healing,standard%20deviation%20of%202.20%20days.
3. Sabzehchian M. The initial management of acute burns. J Mil Med. 2002;4 (3):203-12. [Persian]. https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?ID=29232
4. Masatoshi J,Hironobu Ihn,Yoshihiro M,Yoshihide A,Kenichi Y,Kunihiko T. Regulation of fibrogenic/fibrolytic genes by plateletderived growth factor C, a novel growth factor, in human dermal fibroblasts. J Cell Physiol. 2005;202(2):510-17. https://doi.org/10.1002/jcp.20154
5. Barrientos S, Stojadinovic O, S Golinko M, Brem H, Tomic-Canic M, Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen. 2008;16(5):585-601. https://doi.org/10.1111/j.1524-475x.2008.00410.x
6. Mahdavi R, Hassani M, Roostaie A, Khalili M, Haghbin Nazar Pa M. Design and manufacture of modified alginate spray as a new wound dressing to control bleeding and wound healing. J P Med. 2021;10(4):225-40. http://jpmed.ir/article-1-1035-en.html
7. Kannon GA, Garrett AB. Moist wound healing with occlusive dressings: a clinical review. Dermatol Surg. 1995;21(7):583-90. https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.1995.tb00511.x
8. Winter GD. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of theyoung domestic pig. Nature. 1962;193(4812):293. https://www.nature.com/articles/193293a0
9. Rajendran S. Advanced textiles for wound care. 2 ed. 2019. https://doi.org/10.1016/C2017-0-00217-3
10. Ruolan G, Wenzhong S, Hong Z, Zhuona W, Zhiyun M, Xiaoxia Z, Qing T, Ji D, Guifang D. The performance of a fly-larva shell-derived chitosan sponge as an absorbable surgical hemostatic agent. Biomaterials. 2010;31(6):1270-7. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.023
11. Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2014;32(6):1408-19. https://doi.org/10.1002/stem.1681
12. Trott A. Wounds and Lacerations. 4th ed. Saunders. Amazon. 2012:336p. https://www.amazon.com/Wounds-Lacerations-Emergency-Closure-Consult/dp/0323074189
13. Selvaraj D, Viswanadha VP,Elango S. Wound dressings–a review. J BioMed. 2015;5(4):24-8. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4662938/
14. Olivier G, Killian LH, Nicolas L, Christelle L.G-Ianotto, Mehdi S, et al. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. Protein Cell. 2017;8(9):644-61. https://doi.org/10.1007/s13238-017-0395-5
15. 15- Mizuno K, Yamamura K, Yano K, Osada T, Saeki S, Takimoto N, Sakurai T, Nimura Y. Effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on wound healing in genetically diabetic mice. J Biomed Mater Res A. 2003;64(1):177-81. https://doi.org/10.1002/jbm.a.10396
16. Yixiao D, Meihua C, Ju Q, Xuechun W, Sun H.K, Barrera J et al. Conformable hyaluronic acid hydrogel delivers adipose-derived stem cells and promotes regeneration of burn injury. Acta Biomaterialia J, 2020:108:56-66. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.03.040
17. Nasiry D, Khalatbary AR, Abdollahifar M-A, Amini A, Bayat M, Noori A, et al. Engraftment of bioengineered three- dimensional scaffold from human amniotic membrane-derived extracellular matrix accelerates ischemic diabetic wound healing. Arch Dermatol Res 2020;313(7):567-82. https://doi.org/10.1007/s00403-020-02137-3
18. Afzali F. Mirahmadi-Babaheydari F. Shojaei-Ghahrizjani S. Rahmati, B. Shahmoradi, M. Banitalebi-Dehkordi The effect of encapsulated umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in PRPCryogel on regeneration of grade-II burn

wounds. Regen Eng Transl Med. 2020:1-11. http://eprints.skums.ac.ir/8795/

19. Fischer A.H, Jacobson K.A, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. CSH Protoc.2008. https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986

20. Taherzadeh-Soureshjani P, Chehelgerdi.Algae M. Algae-meditated route to cuprous oxide (Cu2O) nanoparticle: differential expression profile of MALAT1 and GAS5 LncRNAs and cytotoxic effect in human breast cancer. Cancer Nanotechnol.2020;11(1):1-34. https://cancer-nano.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12645-020-00066-4

21. EsmaeelSharifiMohammadChehelgerdi, AliFatahian-Kelishadrokhi, FarshadYazdani-Nafchi, KoroshAshrafi-Dehkord. Comparison of therapeutic effects of encapsulated Mesenchymal stem cells in Aloe vera gel and Chitosan-based gel in healing of grade-II burn injuries. Regen Ther. 2021;18:30-7. https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.02.007

22. Thakur S, Govender PP, Mamo MA, Tamulevicius S, Thakur VK. Recent progress in gelatin hydrogel nanocomposites for water purification and beyond. Vacuum 2017;146: 396-408. https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2017.05.032

23. Marina Burkatovskaya, Ana P. Castano,Tatiana N. Demidova-Rice, George P. Tegos,, and Michael R. Hamblin. Effect of chitosan acetate bandage on wound healing in infected and noninfected wounds in mice. Wound Repair Regen. 2008;16(3):425–31. https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00382.x

24. He Liu, Chenyu Wang, Chen Li, Yanguo Qin, Zhonghan Wang, Fan Yang, Zuhao Li and Jincheng Wang. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. Royal Soc Chem J. 2018;8:7533-49. https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/ra/c7ra13510f