

Experimental study and computational simulation of interaction between Gelatin-Polysaccharide hydrogels and skin tissue cells for wound healing purposes

Amir Mohammad Danesh Pajoo¹ / Vahidi, Bahman^{*,†} / Khanmohammadi, Mehdi^{‡,¶}

1- MSc, Department of Medical Technology and Tissue Engineering, Faculty of Life Science Engineering, School of Interdisciplinary Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

‡ -Corresponding Author, PhD, Associate professor, Department of Medical Technology and Tissue Engineering, Faculty of Life Science Engineering, School of Interdisciplinary Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran;

‡- PhD, Biomaterials Group, Materials Design Division, Faculty of Materials Science and Engineering, Warsaw University of Technology, Warsaw, Poland

¶-Skull Base Research Center, The Five Senses Health Institute, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

ARTICLE INFO

DOI: <https://doi.org/10.22041/ijbme.2025.2049953.1947>

Received: 6-1-2025

Revised: 17-3-2025

Accepted: 6-4-2025

KEYWORDS

wound dressing
Polysaccharide
Computational simulation
Wound healing
injectable hydrogels

ABSTRACT

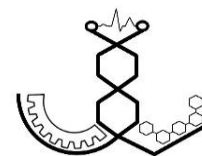
Biomimetic hydrogels have been developed to fabricate multifunctional microenvironments for cell culture and tissue fabrication. In the current study, different compositions of gelatin (GA) and carboxymethylcellulose (CMC) synthesized via electrostatic interaction. To increase the interaction between these components phenol moieties were substituted on the backbone of GA (GelaPH) and CMC (CMCPH) via carbodiimide-mediated condensation reaction, and then subjected to enzymatic cross-linking in the presence of horseradish peroxidase and calcium peroxide as an electron donor to create a stable hybrid microenvironment for cell encapsulation and tissue engineering. The gelation time and swelling ration, mechanical strength of hydrogels reduced with increasing CMCPH content. On the other hand mechanical propertise like loss modulus (G'), storage modulus (G'') and compression strength increased by the incorporation of CMC. Computational simulation was performed using the finite element method, and the rate of oxygen transfer to the skin, which is a determining factor in wound healing, was investigated to find the optimal concentration of calcium peroxide. Results show that although, samples with higher concentration of CMCPH had lower percentage of cell viability, they had shorten period of healing procedure. Computational study shows that the exitance of calcium peroxide could bring oxygen releasing properties in syntheiszed hydrogels. The hydrogel including 1mg of CaO₂ has the highest oxygen releasing proprieties in comparison with other hydrogels, however, the formation of oxygen bubbles decreases the mechanical strength of the hydrogel. Thus, the hydrogel with 0.5mg of CaO₂ is considered as the optimum concentration of calcium peroxide in hydrogels . Overall, the results suggest that the optimum hybrid hydrogel can provide a superior biological microenvironment for fibroblasts in three-dimensional skin tissue engineering.

***Corresponding Author**

Address Department of Medical Technology and Tissue Engineering, Faculty of Life Science Engineering, School of Interdisciplinary Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

E-Mail bahman.vahidi@ut.ac.ir





بررسی آزمایشگاهی و شبیه سازی محاسباتی برهمکنش هیدروژل های ژلاتین -

کربوکسی متیل سلولز و سلول های پوست در جهت ترمیم زخم

دانش پژوه، امیرمحمد^۱ / وحیدی، بهمن^{۳*} / خان محمدی، مهدی^۵

۱- کارشناسی ارشد مهندسی پزشکی - مهندسی بافت، گروه فناوری پزشکی و مهندسی بافت، دانشکده مهندسی علوم زیستی، دانشکدگان علوم و فناوری های میان رشته ای، دانشگاه تهران

۲- دپارتمان ارتوپدی، جراحی ترومایی و پزشکی توانبخشی، دانشگاه پزشکی گریفسوالد، گریفسوالد، آلمان

۳- دانشیار، گروه فناوری پزشکی و مهندسی بافت، دانشکده مهندسی علوم زیستی، دانشکدگان علوم و فناوری های میان رشته ای، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴- گروه بیومواد، بخش طراحی مواد، دانشکده علوم و مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی وارشو، لهستان

۵- مرکز تحقیقات پایه جمجمه، موسسه سلامت حواس پنج گانه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

مشخصات مقاله

شناسه ی دیجیتال: <https://doi.org/10.22041/ijbme.2025.2049953.1947>

پذیرش: ۱۴۰۴/۱/۱۷

بازنگری: ۱۴۰۳/۱۲/۲۷

ثبت در سامانه: ۱۴۰۳/۱۰/۱۷

واژه های کلیدی	چکیده
زخم پوش پلی ساکارید شبیه سازی محاسباتی ترمیم زخم هیدروژل های تزریق پذیر	ترمیم زخم یکی از مسائل مهم در پزشکی بازساختی می باشد. زخم پوش ها از ابزارهای مورد استفاده در این بستر می باشند. زخم پوش های سنتی توانایی زیست سازگاری مناسب و نیز برهم کنش مورد نیاز برای ترمیم زخم را دارا نیستند. لذا نیاز است تا زخم پوش های نوین با خاصیت اکسیژن رسانی مناسب سنتز شوند. هدف این تحقیق، سنتز و بررسی خواص و ویژگی های فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی هیدروژل ژلاتین/ کربوکسی متیل سلولز کراس لینک شده توسط آنزیم پروکساداز و شبیه سازی نرخ انتقال جرم از هیدروژل به سطح پوست می باشد. سنتز این هیدروژل توسط اتصال دو عامل ژلاتین و کربوکسی متیل سلولز به وسیله فنول دار کردن آن ها انجام شد و این دو پلیمر با نسبت های متفاوت برای سنتز هیدروژل به کار گرفته شدند. با افزودن مقادیر مختلفی از کربوکسی متیل سلولز به ژلاتین، نتایج مختلفی در تست های میزان تورم، زمان ژل شدن، خواص رئولوژی و استحکام فشاری مورد بررسی قرار گرفت. زنده مانگی سلول، ترشح کلاژن و چسبندگی سلول توسط سلول های فیبروبلاست 3T3 مورد ارزیابی قرار گرفت. شبیه سازی محاسباتی با استفاده از روش اجزای محدود انجام گرفت و نرخ انتقال اکسیژن به پوست که عاملی تعیین کننده در بهبود زخم می باشد، در یافتن غلظت بهینه ی کلسیوم پراکساید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایشگاهی به دست آمده نشان داد که نمونه با ترکیب ۷۰ درصد کربوکسی متیل سلولز و ۳۰ درصد ژلاتین بیشترین توانایی در ترمیم زخم را دارد. نتایج شبیه سازی نشان داد که بیشترین میزان اکسیژن رسانی در لایه ی اپیدرم پوست در حالت طبیعی اکسیژن رسانی در بدن $30 \times 10^{-15} \text{ mol/m}^3$ است. این درحالی است که در هیدروژلی با کمترین میزان اکسیژن رسانی (در غلظت کلسیوم پراکساید 0.1 mg) این عدد $8 \times 10^{-2} \text{ mol/m}^3$ به دست آمد. این اختلاف چشم گیر نشان از تاثیرگذاری قابل توجه این نوع هیدروژل در زمینه اکسیژن رسانی و در نهایت ترمیم زخم دارد.

*نویسنده ی مسئول

گروه فناوری پزشکی و مهندسی بافت، دانشکده مهندسی علوم زیستی، دانشکدگان علوم و فناوری های میان رشته ای، دانشگاه تهران، تهران، ایران

نشانی

bahman.vahidi@ut.ac.ir

پست الکترونیک



۱- مقدمه

پلیمرهای آبدوست در دهه‌های گذشته به دلیل کاربردهایشان در حوزه‌های بین‌رشته‌ای مختلف، توجه بسیاری را به خصوص در زمینه‌های مهندسی بافت و دارورسانی به خود جلب کرده‌اند. فناوری مبتنی بر نانوذرات نیز حوزه مورد توجهی در صنایع زیست‌پزشکی، دارویی، آرایشی و بهداشتی و صنایع غذایی است. به این ترتیب، نانوذرات در زمینه‌هایی مانند رهایش مواد هدفمند، تثبیت امولسیون، تصویربرداری در مقیاس مولکولی برای کاربردهای تشخیصی و تقویت مواد، مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۱]. پلی‌ساکاریدها گروهی از پلیمرهای آبدوست با منشأ طبیعی و زیست سازگار هستند که در سیستم‌های پلیمری مبتنی بر آب و به‌طور خاص در فناوری نانو استفاده می‌شوند که عمدتاً به دلیل خواص مطلوب آن‌ها در سیستم‌های بیولوژیکی از جمله زیست تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری و سمیت کم است [۲].

زخم به هر گونه گسستگی در انسجام لایه‌های پوست شامل اپیدرم، درم، زیرجلد و یا بافت‌های زیرپوستی گفته می‌شود که می‌تواند در اثر عوامل فیزیکی مانند برش جراحی، ضربه، فشار و اصابت گلوله و یا عوامل شیمیایی نظیر سوختگی با اسید ایجاد شود [۳]. فرآیند ترمیم زخم به فاز هموستاز، فاز التهاب، فاز تکثیر و در نهایت فاز بازسازی تقسیم بندی می‌شود. زخم‌ها بر اساس زمان بهبودی به دو نوع حاد و مزمن تقسیم می‌شوند. زخم‌های حاد جراحاتی هستند که به‌طور کامل، با کم‌ترین جای زخم و در مدت تقریباً ۱۲-۸ هفته بهبود می‌یابند [۴]. زخم‌های مزمن، زخم‌هایی هستند که روند درمانی آن‌ها در اثر عواملی مانند دیابت، عدم خون‌رسانی مناسب، فشار موضعی و ... متوقف و مرحله التهابی ترمیم زخم طولانی شده است (بیش از چهار هفته). با وجود پیشرفت‌های عمده در ترمیم زخم، کماکان تلاش در جهت یافتن روش‌های موثر در درمان زخم‌ها در کوتاه‌ترین زمان ممکن و با کم‌ترین عارضه ادامه دارد [۵].

بهبود زخم فرآیند پیچیده و پویایی است که تسریع و ارتقای آن نیاز به آماده‌سازی یک محیط مناسب دارد. زخم‌پوش یکی از مهم‌ترین عوامل خارجی مؤثر در فرآیند بهبود زخم است. با پیشرفت تکنولوژی، بیش از ۱۰۰۰ نوع از زخم‌پوش‌های مدرن توسعه یافته‌اند. زخم‌پوش‌ها بر پایه مواد طبیعی و سنتزی ساخته می‌شوند. زخم‌پوش‌های مدرن علاوه بر نقش پوششی و محافظتی، با بستر زخم تعاملات شیمیایی و فیزیکی دارند. آن‌ها حامل آنتی‌بیوتیک‌ها، داروها و نانوذرات بوده و در حفظ رطوبت

و یا رطوبت‌دهی در محل زخم نقش مهمی دارند که تمامی این عوامل می‌تواند فرآیند بهبود زخم را تسهیل نماید [۶]. هیدروژل‌ها متشکل از پلیمرهای جاذب هستند که قابلیت حل در آب را دارند. کاربرد آن‌ها در زمینه‌های مختلف از جمله پزشکی، گسترده‌ای از مطالعات را در نیم قرن گذشته دارا بوده و یکی از مواردی است که هنوز در حال رشد است. این علاقه‌مندی به هیدروژل‌ها عمدتاً به دلیل زیست سازگاری بالای آن‌ها می‌باشد. هیدروژل‌ها دارای حالت نرم و الاستیک می‌باشند که می‌توانند تحریک مکانیکی بافت اطراف زمانی که در داخل بدن کاشته می‌شوند را به حداقل برسانند. این در حالی است که به دلیل کشش بین سطحی کم حاصل از مایعات بیولوژیکی و بافت‌های اطراف، جذب پروتئین و چسبندگی سلولی را به کمترین میزان می‌رسانند. در طول سال‌های گذشته، بخش بزرگی از کار در زمینه پزشکی، پیرامون کاربردهایی مانند حامل‌هایی برای رها سازی ریز مولکولهای فعال زیستی به کار گرفته شدند [۷]. هیدروژل‌ها ساختار سه بعدی پلیمری هستند که در آب متورم می‌شوند و به‌طور عمده از کوپلیمر پلیمرهای آبدوست تشکیل شده‌اند. به دلیل اتصالات عرضی شیمیایی یا فیزیکی، هیدروژل‌ها در آب نامحلول هستند. در هیدروژل‌ها، اتصالات عرضی باعث ایجاد ساختار شبکه‌ای و یکنواخت می‌شود و خاصیت تزریق‌پذیری را به هیدروژل می‌دهد. زیرا شبکه سه بعدی موجود در هیدروژل مزیت جذب مقدار زیادی آب را دارد که برای تشکیل یک داربست بسیار مناسب است [8,9].

اخیراً شبیه‌سازی هیدروژل‌ها به میزان زیادی مورد توجه قرار گرفته است. در حوزه ترمیم زخم، شبیه‌سازی جریان الکتریکی برای تحریک بافت برای ترمیم خود یک امر نوین در این حوزه محسوب می‌شود. کولکرنی و همکاران بر روی ترمیم زخم به وسیله هیدروژل‌های پایه سیلک و ژلاتین که به وسیله پالس‌های الکتریکی باعث بازسازی پوست می‌شوند، تحقیقاتی را انجام دادند که پیش از سنتز هیدروژل‌ها میدان الکتریکی حاصل از الکترودها به وسیله نرم افزار کامسول شبیه سازی شد [10]. نوآوری این پژوهش اتصال پروتئین ژلاتین و پلی ساکارید کربوکسی متیل سلولز بوسیله آنزیم هورس رادیش پراکسیداز و شبیه سازی اکسیژن رسانی این داربست ها به اپیدرم پوست می‌باشد. اثربخشی همزمان استحکام مکانیکی همراه با زیست سازگاری داربست‌ها با تست‌های رئولوژی، حیوانی، سلولی و آزمون‌های فیزیکو شیمیایی به اثبات رسید. همچنین، برای اولین بار از کلسیم پر اکساید به عنوان الکترون دهنده در اتصال داربست‌هایی با اتصال آنزیمی استفاده

آمیخته با کربوکسی متیل سلولز می باشد. مواد مصرفی مورد استفاده در سنتز هیدروژل و تست ها و نیز میزان ماده مصرفی در هر نمونه به ترتیب در جدول های ۱ و ۲ آورده شده اند.

جدول (۱) مواد مصرفی مورد استفاده در سنتز هیدروژل و تست ها.

نام ماده	شرکت سازنده
Gelatin	Merck
CMC	Merck
EDC	Merck
NHS	Merck
CaO ₂	Merck
Horseradish Peroxidase	Merck
Ethanol(96%)	Sigma
FBS	Sigam
DMSO	Merck
DMEM:F12	Gibco
L-glutamine	Sigma
Trypsin-EDTA	Gibco

2-1-2- تهیه ی داربست هیدروژلی:

برای تهیه ی داربست هیدروژلی، مقادیر مختلفی از کربوکسی متیل سلولز تایرامین دار شده و ژلاتین تایرامین دار شده به همراه آنزیم پراکسیداز مخلوط می شوند و در نهایت محلول کلسیوم پراکساید به صورت قطره قطره به محلول پلیمری اضافه می شود [12].

نمونه شماره ۱ حاصل از اختلاط ۵۰۰ میکرولیتر ژلاتین تایرامین دار شده^۴، به همراه ۵۰ میکرولیتر کلسیوم پراکساید^۵ و ۵۰ میکرولیتر پراکسیداز^۶ می باشد. نمونه شماره ۲ حاصل از اختلاط ۳۵۰ میکرولیتر ژلاتین تایرامین دار شده و ۱۵۰ میکرولیتر کربوکسی متیل سلولز تایرامین دار شده، به همراه ۵۰ میکرولیتر کلسیوم پراکساید و ۵۰ میکرولیتر پراکسیداز می باشد. نمونه شماره ۳ حاصل از اختلاط ۲۰۰ میکرولیتر ژلاتین تایرامین دار شده و ۳۰۰ میکرولیتر کربوکسی متیل سلولز تایرامین دار شده، به همراه ۵۰ میکرولیتر کلسیوم پراکساید و ۵۰ میکرولیتر پراکسیداز می باشد. نمونه ی شماره ۴ حاصل از اختلاط ۵۰۰ میکرولیتر کربوکسی متیل سلولز تایرامین دار شده، به همراه ۵۰ میکرولیتر کلسیوم پراکساید و ۵۰ میکرولیتر پراکسیداز می باشد. در سنتز تمام نمونه ها، نسبت HRP^۷ به CaO، یک به یک تعیین شده است و این بدین علت است که کلسیوم پراکساید در مجاورت آب به H₂O₂ تبدیل می شود و این عامل در نسبت های بالاتر باعث سمیت سلولی می شود [13]. در تشکیل هیدروژل، HRP گروه های فنولی را

شد که علاوه بر افزایش پایداری داربست، با افزایش اکسیژن رسانی باعث تحریک اپیدرم برای رگ زایی و بهبود در زمان کوتاه تر می شود. این فرآیند به وسیله ی شبیه سازی محاسباتی به روش اجزای محدود از طریق به نمایش گذاشتن نرخ انتقال اکسیژن از هیدروژل کربوکسی متیل سلولز/ژلاتین به سطح پوست و مقایسه ی نتایج در هیدروژل های مختلف با سطح مقطع های متفاوت نشان داده می شود.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- روش های ساخت:

1-1-2- تایرامین دار کردن ژلاتین و کربوکسی متیل سلولز:

یک گرم پودر ژلاتین/کربوکسی متیل سلولز در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر با پی اچ ۶ ریخته شد و بر روی استیر به مدت ۴ ساعت با ۴۰۰ rpm در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مخلوط شد. در مرحله بعد ۰/۳ گرم تیرامین هیدروکلراید به محلول مرحله قبل اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه به هم خورد. ۰/۲ گرم NHS^۱ به محلول اضافه شد و هم خوردن به مدت ۲۰ دقیقه ادامه پیدا کرد. ۰/۳ گرم EDC^۲ به محلول اضافه شد و به مدت یک روز این هم زدن ادامه پیدا کرد. قابل ذکر است که pH در تمامی مراحل تنظیم شد. به منظور جمع آوری رسوب و شست و شوی ژلاتین اصلاح شده، محلول به دست آمده در pH=2 و با اضافه کردن ۰/۸۳۵ میلی لیتر HCL^۳ ۶ مولار در ۵ میلی لیتر آب هم زده شد. سپس محلول ۹۰ درصد اتانول، ۱۰ درصد HCL به حجم ۳۰۰ میلی لیتر به درون بشر ۵۰۰ میلی لیتر منتقل و هم زده شد تا ماده ای سفید رنگ از محلول پلیمری رسوب کند. این رسوب سفید رنگ با فیلتر جدا و حذف شد. سپس خشک کردن رسوب سفید رنگ انجام و داخل ۳۰۰ میلی لیتر محلول تهیه شده (۸۰ درصد اتانول و ۲۰ درصد HCL) انداخته شد. سپس، رسوب سفید رنگ را جدا نموده و جذب آن در ۲۷۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. اگر جذبی حاصل نشد، محلول عاری از تیرامین بوده و شست و شو کامل است. اگر جذب حاصل شد، رسوب را ۲ مرتبه با اتانول ۹۹ درصد شست و شو داده و در دمای اتاق گذاشته می شود تا خشک شود [11]. علت تایرامین دار کردن ژلاتین، افزایش استحکام مکانیکی این پروتئین در هنگام تشکیل ژل به علت کاهش تخریب پذیری و ماندگاری داربست تا روز ۱۴، چه در حالت استفاده به صورت صد درصدی از ماده، چه در حالت درهم

^۵ Calcium peroxide

^۶ peroxidase

^۷ horseradish peroxidase

^۱ N-Hydroxysuccinimide

^۲ 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide

^۳ Hydrochloric acid

^۴ Gelatin-tyramine

۷۲ ساعت) از محلول بیرون آورده شدند و پس از خشک شدن، توسط کاغذ صافی، آب سطحی آن‌ها خارج شده و وزن گردیدند. برای به‌دست آوردن میزان آب جذب شده از فرمول زیر استفاده شد [17]:

$$PBS\ Absorption(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_s} \quad (1)$$

در این رابطه، W_s وزن هیدروژل پس از جذب PBS و W_d وزن هیدروژل در حالت خشک می‌باشد.

۲-۲-۴- زمان تشکیل ژل:

در این آزمون، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول پلیمری درون خانه های ول ریخته شد و پس از آن ۵۰ میکرولیتر HRP و ۵۰ میکرولیتر کلسیم پراکساید در حالی که محلول به‌وسیله‌ی مگنتی در حال هم خوردن بود، به آن اضافه شدند و این لحظه به‌عنوان لحظه شروع ثبت شد و زمانی که مگنت از چرخش ایستاد، به‌عنوان لحظه پایان تشکیل هیدروژل ثبت شد [18]. این تست از آن جهت دارای اهمیت است که در صورت تشکیل ژل در زمان‌های کم و یا به‌صورت درجا، امکان استفاده به‌صورت قابل تزریق در محل جراحی در مطالعات حیوانی وجود دارد.

۲-۲-۵- تخریب پذیری هیدروژل:

برای بررسی وزن از دست رفته‌ی هیدروژل‌ها، با وزن اولیه M_i نمونه‌ها داخل ۱۰ میلی‌لیتر PBS قرار گرفتند و سپس داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استقرار یافتند. سپس در بازه‌های زمانی ۱، ۳ و ۵ روز، از انکوباتور خارج شده و پس از خشک شدن، وزن گردیدند (M_f). درصد وزن از دست رفته با رابطه‌ی زیر محاسبه شد [19]:

$$Mass\ Loss(\%) = \frac{M_f - M_i}{M_i} \times 100 \quad (2)$$

۲-۲-۶- زنده مانی و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست بر روی هیدروژل:

در این آزمون، از سلول‌های فیبروبلاست موشی NIH 3T3 برای سمیت‌سنجی غیرمستقیم MTT^8 استفاده شد. ابتدا برای استریل کردن، نمونه‌ها توسط اتانول ۷۰٪ و PBS و آب مقطر شسته شدند. سپس در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند و در فاصله‌های زمانی ۱ و ۳ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای عصاره‌گیری، ۰.۲ گرم از هر ۳ گروه هیدروژل قبل از انجماد خشک می‌شود و روی هر کدام از آن‌ها ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر ریخته می‌شود و پس از ۲۴ ساعت، عصاره (محلولی شامل ژلاتین، کربوکسی متیل سلولز، آنزیم و کلسیم

اکسید می‌کند که باعث تشکیل رادیکال‌های آزاد می‌شود. این رادیکال‌های آزاد می‌توانند حلقه‌های آروماتیک در دو پلیمر را به‌وسیله جفت کردن باندهای C-C و C-O و در حضور H_2O_2 به‌عنوان الکترون دهنده، ایجاد کنند.

جدول (2) میزان ماده مصرفی در هر نمونه.

کلسیم پراکساید (μL)	پراکساید یز (μL)	کربوکسی متیل سلولز تایرامین دار شده (%)	ژلاتین تایرامین دار شده (%)	ماده/نمونه
50	50	0	۱۰۰	1
50	50	30	70	2
50	50	60	40	3
50	50	100	0	4

۲-۲-۲- مشخصه یابی هیدروژل سنتز شده:

۲-۲-۱- آنالیز میزان فنول موجود به‌وسیله‌ی طیف‌سنجی فرابنفش (UV): برای محاسبه‌ی میزان فنول موجود در ژلاتین و کربوکسی متیل سلولز، جذب این مواد در طول موج ۲۷۵ نانومتر [14]، اندازه‌گیری شد. میزان فنول محاسبه شده با استفاده از نمودار کالیبراسیون تیرامین انجام شد.

۲-۲-۲- آزمون رئولوژی:

خواص ویسکوالاستیک هیدروژل‌ها با آزمون‌های نرخ بسامد و نرخ فرکانس به‌وسیله‌ی رئومتر با سه تکرار آزمایش، مورد ارزیابی قرار گرفت. هیدروژل‌ها توسط دیسکی به قطر ۲۵ میلی‌متر و ضخامت ۱ میلی‌متر، برش داده شدند. در تست رئومتر، هیدروژل‌ها روی صفحه‌ای به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فرکانس 1 rad/s قرار گرفتند. سپس تنش از ۰.۵٪ تا ۱۵۰٪ افزایش یافت. تست فرکانس هم در تنش ۱٪ و در بازه فرکانس ۰.۵ rad/s تا ۱۵۰ rad/s انجام شد و کرنش از ۱٪ تا ۱۰۰٪ افزایش یافت [16, ۱۵].

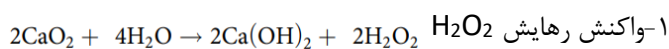
۲-۲-۳- آزمون تورم هیدروژل:

هیدروژل‌ها در تماس با آب، آن را جذب خود می‌نمایند و متورم می‌شوند. این خاصیت به‌دلیل آن است که هیدروژل‌ها دارای گروه‌های جانبی آب دوست می‌باشند و با برهم‌کنش بین مولکول‌های آب و هیدروژل، متورم می‌شوند. در این تست، ابتدا وزن خشک هیدروژل‌ها اندازه‌گیری شده و سپس نمونه‌ها در PBS و داخل انکوباتور و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. هیدروژل‌ها در فواصل زمانی مختلفی (۱۲، ۲۴، ۴۸ و

⁸ 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide

اجزا^{۱۶} و مطالعه در حالت ساکن^{۱۷} قرار دارد. این شبیه سازی شامل دو جزء استوانه و مکعب می باشد که به ترتیب شبیه ساز هیدروژل و اپیدرم می باشند. ابعاد اپیدرم $20\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ و هیدروژل دارای شعاع 2.5 mm و ارتفاع 5 mm می باشند (شکل ۱-الف) که این ابعاد طبق داده های تجربی و آزمایشگاهی فرض شدند [23].

در این مطالعه، هیدروژل ها داخل پلیت های ۲۴ خانه سنتز شده اند که پس از ژل شدن، شکل ظرف را به خود گرفتند. مدل های ایجاد شده دارای دو ورودی^{۱۸} و دو خروجی^{۱۹} می باشند. ورودی ها، دو قاعده استوانه و خروجی ها قاعده زیرین استوانه و وجوه جانبی اپیدرم می باشند. ونگ و همکاران [۲۴] دریافتند که جریان اکسیژن در بدن تک جهته^{۲۰} می باشد. به همین دلیل، جهت جریان اکسیژن در بدن از چپ به راست فرض شده است. یکی از عوامل مهم در ترمیم زخم، رساندن اکسیژن به لایه مورد جراحی می باشد که روند ترمیم زخم را تسریع می بخشد. در این شبیه سازی، اکسیژن حاصل از واکنش کلسیوم پراکساید با آب به نمایش گذاشته شده است. طبق واکنش های (۱) و (۲) اکسیژن در هیدروژل تولید می شود [۳۳]:



۲-۲-۹- معادلات حاکم بر شبیه سازی:

به منظور انتشار اکسیژن در اپیدرم و هیدروژل از معادلات زیر به عنوان معادلات حاکم بر شبیه سازی استفاده شده است [22] و [21]:

$$\nabla \cdot J_i + u \cdot \nabla C_i = R_i \quad (11)$$

$$J_i = -D_i \nabla C_i \quad (12)$$

که در این روابط، D_i ضریب انتقال اکسیژن و C_i غلظت مولی اکسیژن می باشد. نرخ غلظت اکسیژن بر حسب زمان $\left(\frac{\text{mol}}{\text{m}^3 \cdot \text{s}}\right)$ توسط R_i تعریف شده است. همینطور J_i مرتبط به فلاکس اکسیژن درون هیدروژل و اپیدرم می باشد. در معادلات زیر فاکتورهای $C_{0,i}$ و C_0 مربوط به غلظت اولیه اکسیژن در اپیدرم و هیدروژل می باشد [20].

$$-n \cdot J_i = 0 \quad (13)$$

$$C_0 = C_{0,i} \quad (14)$$

$$n \cdot D_i \nabla C_i = 0 \quad (15)$$

پراکساید) از محیط کشت خارج می شود. در روز بعد، عصاره و محیط کشت به نسبت ۱:۱۰ مخلوط شده و ۱۹۰ میکرولیتر از این محلول و ۱۰ میکرولیتر از FBS^۹ به داخل سلول ها اضافه می شود. پس از پایان ۲۴ ساعت، محیط کشت (RPMI) را خارج کرده و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت جدید اضافه می شود. سپس در محیط تاریک، ۱۰ میکرولیتر رنگ MTT^{۱۰} به چاهک اضافه می شود و ۴ ساعت داخل انکوباتور قرار داده می شود. سپس، آن را خارج کرده و ۵۰ میکرولیتر DMSO^{۱۱} روی آن ریخته و ۱۰ دقیقه داخل انکوباتور قرار داده می شود و جذب آن در ۵۷۰ نانومتر خوانده می شود. درصد زنده مانی سلول از رابطه زیر به دست می آید [20]:

$$\text{میزان زنده مانی سلول (\%)} = \frac{OD_{\text{samples}}}{OD_{\text{control}}} \times 100 \quad (3)$$

۲-۲-۷- بررسی ماکروسکوپی ترمیم زخم در رت^{۱۲}:

در این آزمون، بر روی ۲۴ رت که شامل ۳ گروه آزمایش و ۱ گروه کنترل بود، زخم هایی به قطر ۸ میلی متر ایجاد شد. بررسی ماکروسکوپی و مانیتورینگ این زخم ها از تزریق هیدروژل های سنتز شده بر روی رت ها در روز های ۱ و ۷ و ۱۴ مورد ارزیابی قرار گرفت. قبل از انجام عمل جراحی بر روی رت ها، کتامین و زایلازین به میزان ۰/۱ میلی لیتر به رت ها تزریق شد. درصد ترمیم زخم به وسیله ی رابطه زیر محاسبه گردید [21]:

$$\text{Wound enclosure (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Wound area at the given time}}{\text{Original wound area}}\right) \times 100 \quad (4)$$

تمام رت ها برای بایوپسی و برداشت بافت از آنها به وسیله ی فورمالین قربانی شدند. پس از برداشت بافت ها، آن ها در پارافورمالدهید^{۱۳} ۴ درصد قرار گرفته و به تدریج توسط اتانول ۹۵٪ خشک شدند و در انتها در داخل پارافین قرار گرفتند. ضخامت تمام بافت های جدا شده ۶ میکرومتر بوده و تست رنگ آمیزی آن ها به وسیله ی آزمون H&E^{۱۴} و MT^{۱۵} انجام پذیرفت [22]

۲-۲-۸- شبیه سازی محاسباتی انتقال اکسیژن از هیدروژل

ژلاتین/کربوکسی متیل سلولز به پوست:

در این پژوهش، شبیه سازی میزان انتقال غلظت اکسیژن به سطح اپیدرم انجام شده است و مدل ها توانایی پیش بینی میزان اکسیژن آزاد شده در غلظت های مختلف کلسیوم پراکساید به بافت هدف را دارند. فیزیک شبیه سازی در حالت انتقال غلظت

¹⁵ masson's trichrome
¹⁶ Transport of Concentrated Species

¹⁷ Stationary

¹⁸ In flow

¹⁹ Out flow

²⁰ Monodirectional

⁹ Fetal bovine serum

¹¹ Dimethyl sulfoxide

¹² Rat

¹³ paraformaldehyde

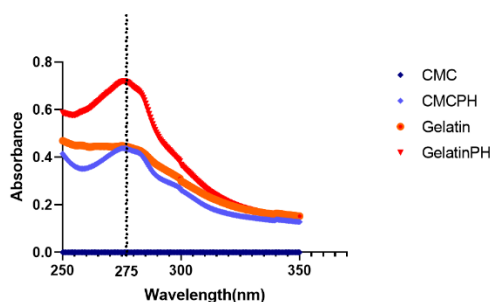
¹⁴ hematoxylin-eosin

۱۰۵۲۳ و اجزای لبه ۵۲۳ محاسبه شد. با وجود درصد بسیار جزئی تفاوت نتایج در این مش‌بندی با حالت قبل و هزینه محاسباتی مناسب با توجه به افزایش ۱۰۷٪ المان‌ها، از این حالت برای محاسبات انتشار اکسیژن در اپیدرم استفاده شده است (شکل ۱-د).

۳- یافته‌ها و بحث

1-3 آنالیز میزان فنول موجود به‌وسیله‌ی طیف‌سنجی فرابنفش (UV):

میزان فنول کراس لینک شده توسط واکنش کاهش امینی در طول موج ۲۷۵ نانومتر که پیک مشخص کننده گروه فنولیک می‌باشد، اندازه‌گیری شد. همچنین، میزان فنول کراس لینک شده در ژلاتین و کربوکسی متیل سلولز با استفاده از نمودار کالبراسیون تایرامین و هیدروکسی فنیل پروپیونیک اسید محاسبه شد [۲۵]. میزان فنول موجود در این دو پلیمر حاصل از اختلاف مقادیر جذب شده‌ی آن‌ها در حالت تایرامین‌دار شده و حالت نرمال به‌دست آمد. میزان فنول در ژلاتین 263×10^{-4} مول فنول به ازای هر گرم ژلاتین تایرامین‌دار شده، محاسبه شد. همچنین، میزان فنول در کربوکسی متیل سلولز 19×10^{-3} مول فنول به ازای هر گرم کربوکسی متیل سلولز تایرامین‌دار شده، محاسبه شد. ترکیب این دو پلیمر به منظور ساخت داربستی تخریب‌پذیر و در عین حال زیست سازگار جهت استفاده در بافت پوست مورد استفاده قرار گرفت. این هیدروژل با استفاده از کراس لینک آنزیمی هورس رادیش پراکسیداز و کلسیوم پراکساید به‌عنوان الکترون دهنده سنتز شد. نحوه‌ی به‌دست آوردن میزان فنول جذب شده، به‌وسیله‌ی به‌دست آوردن معادله خط تایرامین (۳ بار تکرار) و نمودار جذب (شکل ۲). GelatinPH و CMCPH در ۲۷۵ نانومتر به‌دست آمد (شکل ۲).

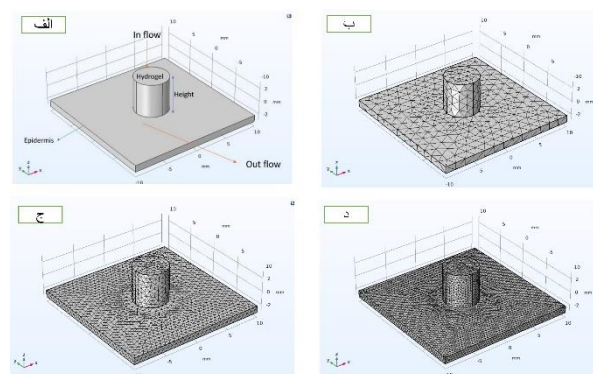


شکل ۲) میزان فنول جذب شده توسط تست UV.

ورودی (C_0) به‌عنوان غلظت اولیه اکسیژن در نظر گرفته شده است که از $0/68 \frac{mol}{m^3}$ تا $1/34 \frac{mol}{m^3}$ قابل تغییر است [23]. این نکته قابل ذکر است که ابرهاردت و همکاران [24] نشان دادند که نرخ انتشار اکسیژن به صورت تک جهته می‌باشد.

۲-۱۰-۲ روش حل محاسباتی:

برای شبیه‌سازی انتشار اکسیژن از اپیدرمیس از نرم‌افزار کامسول چند فیزیکی از مود انتقال گونه‌های رقیق شده در حالت وابسته به زمان استفاده شده است.



شکل ۱) الف) هندسه هیدروژل در نرم‌افزار کامسول با در نظر گرفتن پلیت‌های ۲۴ خانه؛ ب) مش‌بندی مدل در حالت ریزتر (ج) مش‌بندی مدل در حالت بسیار ریزتر (د) مش‌بندی مدل در حالت ریزترین.

در این شبیه‌سازی به‌منظور تایید صحت نتایج به‌دست آمده، شرایط استقلال حل از شبکه محاسباتی برای یکی از داربست‌ها ($CaO_2 = 1 \frac{mg}{ml}$) بررسی شد. در ابتدا سایز المان‌ها در حالت ریز قرار گرفت. در این حالت تعداد اجزای دامنه ۱۹۳۸، اجزای مرز ۱۱۸۰ و اجزای لبه ۱۴۸ محاسبه شد.

با تغییر سایز اجزا به ریزتر، تعداد اجزای دامنه ۴۰۶۹، اجزای مرز ۲۳۰۸ و اجزای لبه ۲۰۰ محاسبه شد. (شکل ۱-ب). در این حالت با در نظر گرفتن یک نقطه از نمودار رهایش اکسیژن در اپیدرم، اختلاف بین این حالت از سایز اجزا و حالت قبلی ۹ درصد محاسبه شد. با تغییر سایز اجزا به خیلی ریزتر، تعداد اجزای دامنه ۱۹۰۳۳، اجزای مرز ۵۱۸۶ و اجزای لبه ۳۱۶ محاسبه شد (شکل ۱-ج). در این حالت با در نظر گرفتن یک نقطه از نمودار رهایش اکسیژن در اپیدرم، اختلاف بین حالت ریز تر و خیلی ریزتر، ۰/۰۱ محاسبه شد که نشان دقت بالای محاسبات و هم‌گرایی مناسب می‌باشد. برای کاهش درصد خطا و بررسی استقلال از شبکه محاسباتی، یک مرحله دیگر سایز اجزا کوچکتر شدند و در حالت ریزترین، شاهد اختلاف ناچیزی با حالت قبل بودیم، تعداد اجزای دامنه ۳۹۵۲۰، اجزای مرز

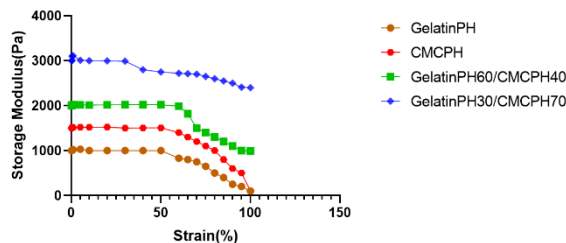
۳-۲ آزمون رئولوژی:

در این تست هیدروژل ها در محدوده ویسکوالاستیک خطی، در محدوده کرنش ۰/۰۱ تا ۱۰۰ درصد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، مورد آزمون قرار گرفتند. استوجکو و همکاران [۲۶] نشان دادند که هیدروژل هایی که مدول ذخیره سازی (G') و مدول از دست رفته (G'') در آن ها بیش از ۱۸۰۰ پاسکال است، استحکام مکانیکی بالایی از خود نشان می دهند. همان طور که از شکل های ۳ و ۴ قابل مشاهده است، در هر دو هیدروژلی که شامل کربوکسی متیل سلولز و ژلاتین هستند، مدول های G' و G'' بیش از ۱۸۰۰ Pa می باشد که نشان از استحکام بالای این زخم پوش ها دارد. در شکل های ۳ و ۴، CMCPH و GelaPH به ترتیب کمترین مدول ذخیره سازی (G') و مدول از دست رفته (G'') را دارند. با اضافه شدن این دو پلیمر به هم، هر دو مدول افزایش یافت که افزایش G' و G'' به علت وقوع تبادل الکترواستاتیکی میان اجزا می باشد [۲۷].

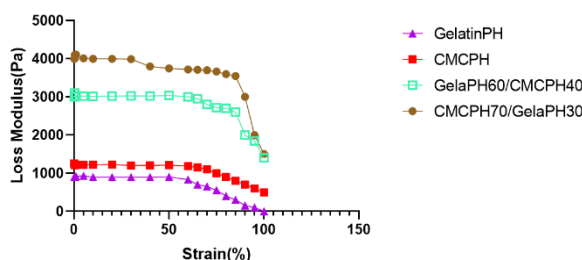
CMCPH70GelaPH30 نسبت به دیگر پلیمرها ثبات بیشتری از خود نشان داد. قابل مشاهده است که با افزایش ۵۰ درصدی GelaPH، شاهد کاهش در G' و G'' هستیم. موضوع قابل بحث دیگر، نسبت بین G' و G'' است که با $\tan \delta$ نشان داده می شود [۲۸]. در هیدروژل های سنتز شده، این نسبت کوچکتر از ۱ است که نشان دهندهی خاصیت الاستیک در هیدروژل های سنتز شده است. درجهی کراس لینک شدن، میزان غلظت CMCPH و GelaPH و نواحی کراس لینک نشده، همه از روی رفتار G' قابل مشاهده است. هرچه قدر این پارامتر بزرگتر باشد، هیدروژل سفت تر و مستحکم تر است و قابلیت استقامت در برابر نیروی های بیشتر را دارد [۲۹]. در شکل های ۵ و ۶ قابل مشاهده است که با افزایش میزان CMCPH به بیش از ۶۰٪، شاهد افزایش G' و G'' همراه با افزایش فرکانس هستیم. CMCPH و GelaPH در فرکانس های کم، به علت کمبود تبادلات الکترواستاتیکی، ثبات کمتری از خود نشان دادند. این مشاهدات هم سویی مدول ذخیره سازی (G') و مدول از دست رفته (G'') گزارش می شود که نشان از نقش موثر HRP در تبادلات الکترواستاتیکی و افزایش وزن مولکولی دارد [۲۹].

در ارتباط با لزجت، همان طور که از شکل ۵ مشخص است، GelaPH کمترین میزان لزجت را دارد که با افزایش میزان CMCPH، حرکت زنجیره های پلیمری محدود شده و با تشکیل زنجیره های جدید، لزجت افزایش یافته است. همچنین، در شکل ۷ مشخص است که با افزایش کرنش، همواره میزان مدول از دست رفته از مدول ذخیره شده کمتر بوده است ($G'' < G'$) و در کرنش های بالای ۶۰٪ شاهد تلاقی نمودارهای G' و G''

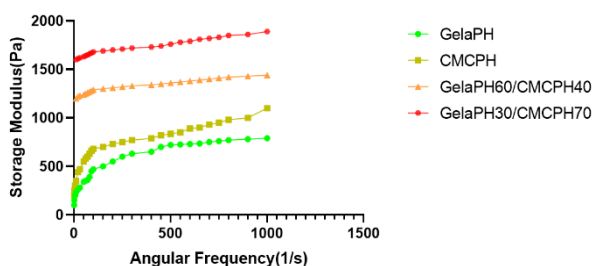
هستیم که این نقطه تلاقی با افزودن CMCPH به GelaPH در عدد های بالاتری اتفاق می افتد که نشان از استحکام مکانیکی بالاتر هیدروژل دارد. این روند در شکل ۸ نیز ادامه دارد. با این تفاوت که با افزایش فرکانس، میزان G' و G'' هر دو افزایش می یابد. اما تلاقی این نمودارها مشاهده نشد.



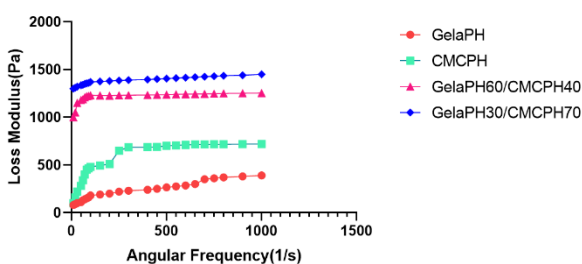
شکل ۳) مدول ذخیره شده بر حسب کرنش.



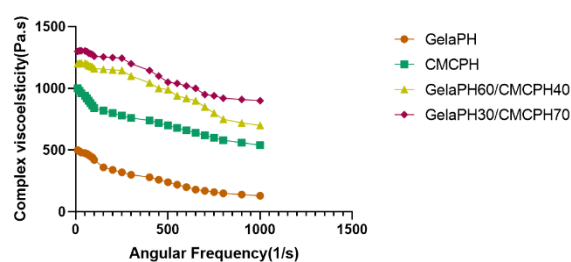
شکل ۴) مدول از دست رفته بر حسب کرنش.



شکل ۵) مدول ذخیره شده بر حسب فرکانس.

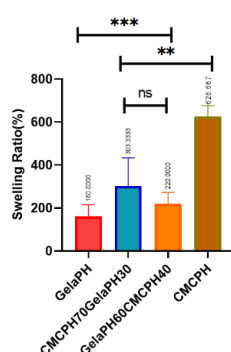


شکل ۶) مدول از دست رفته بر حسب فرکانس.

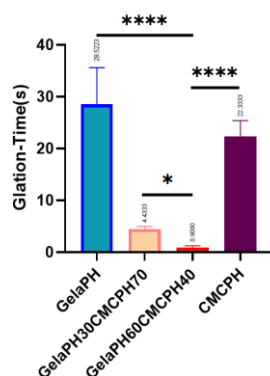


شکل ۷) ویسکوزیته بر حسب فرکانس.

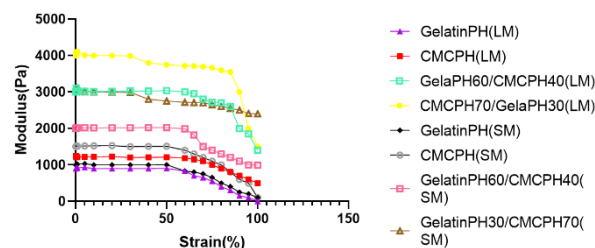
زمان ژل شدن این هیدروژل نسبت به سایر هیدروژل‌ها بیشتر است. زمان ژل شدن CMCPH، ۲۲ ثانیه اندازه گیری شد. کاهش لزجت باعث کاهش برهم کنش هیدروژل‌ها با HRP و در نتیجه کاهش کراس لینک شدن می‌شود. کاهش زمان ژل شدن در هیدروژل‌های CMCPH70/GelaPH30 و CMCPH40/GelaPH60 به‌علت افزودن ژلاتین فنول به نمونه‌ها است که باعث برهم‌کنش گروه‌های فنولی دو پلیمر می‌شود و نیز با افزودن دو پلیمر تایرامین‌دار شده به هم، لزجت هیدروژل حاصل، به‌دلیل برهم‌کنش گروه‌های فنولی با هم به‌وسیله‌ی HRP و افزایش میزان کراس لینک شدن، کاهش یافته است. این بررسی نشان می‌دهد که هیدروژل‌های سنتزی CMCPH70/GelaPH30 و CMCPH40/GelaPH60 به دلیل تشکیل در زمانی کمتر از ۵ ثانیه ($t < 5s$) شرایط بسیار مناسبی برای استفاده در مصارف انبوه را دارا می‌باشند و امکان استفاده در درمان زخم‌های دیابتی را نیز دارند [۳۰]. همچنین در دو نمونه CMCPH70/GelaPH30 و CMCPH40/GelaPH60، به‌علت تشکیل ژل، در کمتر از ۵ ثانیه ($t < 5s$) توانایی سنتز به‌صورت درجا در هنگام ایجاد مدل زخم در حیوان را ایجاد می‌کند.



شکل ۹) میزان تورم هیدروژل.



شکل ۱۰) زمان ژل شدن هیدروژل.



شکل ۸) مقایسه مدول از دست رفته با ذخیره شده برحسب.

۳-۳ میزان تورم

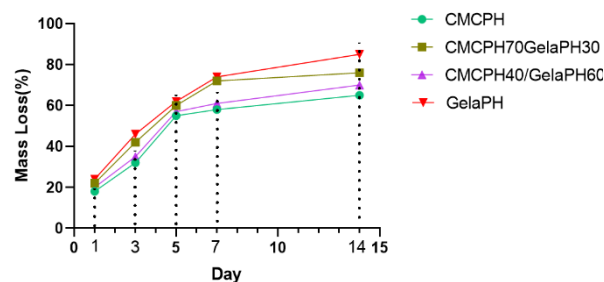
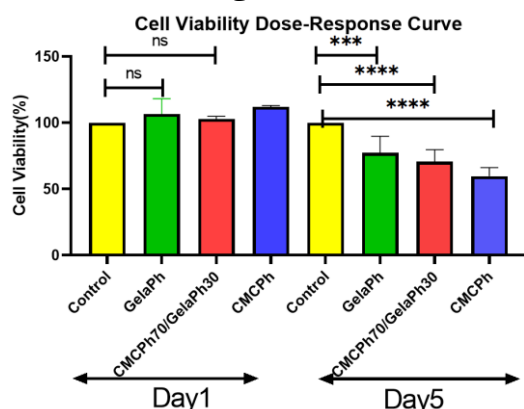
همان‌گونه که در شکل ۹ قابل مشاهده است، به‌دلیل ساختار مکانیکی نامتعادل و غیرپایدار و وزن مولکولی پایین در GelaPH، کمترین میزان تورم و جذب آب به‌علت داشتن گروه‌های آمینی و هیدروکسیلی، قابل مشاهده است. در سمت مقابل، CMCPH به‌دلیل دارا بودن گروه‌های گلوکوپایرانوز در سه سمت این پلیمر و وزن مولکولی بالا، دارای خواص مکانیکی خوب و نیز دارای بیشترین میزان جذب آب است. هر دو هیدروژل CMCPH70/GelaPH30 و CMCPH40/GelaPH60 جذب آب پایین‌تر از CMCPH و بالاتر از GelaPH را دارند. در هیدروژل‌هایی که مخلوطی از دو پلیمر وجود دارد، به‌دلیل شکل گرفتن پیوند هیدروژنی و نیروی الکترواستاتیکی، این هیدروژل‌ها افزایش تعداد گروه‌های عاملی آب دوست نسبت به ژلاتین تایرامین‌دار شده را دارا هستند که این امر به‌علت کراس لینک آنزیمی در پلیمرها می‌باشد. در نمونه CMCPH70/GelaPH30، افزایش قابلیت تورم و میزان جذب آب، در مقایسه با CMCPH40/GelaPH60 وجود دارد و این موضوع به‌این علت است که کربوکسی متیل سلولز تایرامین‌دار شده دارای لزجت بالایی است و پس از اضافه شدن ژلاتین تایرامین‌دار شده، این لزجت به‌دلیل ایجاد نیروی الکترواستاتیکی افزایش می‌یابد. با وجود اختلاف ناچیز ($P < 0.05$) میان جذب آب دو هیدروژلی که حاصل از مخلوط دو پلیمر است، هیدروژل CMCPH40/GelaPH60 به‌دلیل وجود لزجت کمتر، قدرت جذب آب کمتری از خود نشان داد. هر چه میزان تورم و جذب آب بیشتر باشد، امکان تبادل مواد غذایی به سلول‌ها و نیز جذب آگزودا و مواد زائد و انتقال آن به خارج از سلول بیشتر است که با افزایش عامل CMCPH این امر افزایش می‌یابد.

۴-۳ بررسی زمان ژل شدن نمونه‌ها:

آزمون زمان ژل شدن در دمای اتاق و در حضور HRP و CaO انجام شد. همان‌طور که از شکل ۱۰ قابل مشاهده است، در GelatinPH به‌دلیل پایین بودن لزجت و وجود گروه‌های فنول،

۳-۵ تخریب پذیری هیدروژل ها:

یکی از مهمترین ویژگی های داربست سنتز شده، تخریب پذیری آن برای جایگزینی با زمینه ی خارج سلولی ترشح شده به وسیله ی سلول با نرخ مناسب ترمیم بافت می باشد. لازم است که یک داربست با گذشت زمان در شرایط فیزیولوژیک با رشد سلول های محیطی و ترشح سلول های تجزیه شده، امکان جایگزینی بافت جدید به وسیله ی زمینه ی خارج سلولی تولیدی بدن را فراهم نماید. بیشترین میزان تخریب برای نمونه GelaPH به دلیل وجود گروه های هیدروفیلیک و در نتیجه حالیت بالا در آب می باشد. همچنین، نمونه CMCPH به دلیل وجود گروه های کربوکسیل، دارای کمترین میزان تخریب است. با افزایش زمان (تعداد روزها)، روند تخریب افزایشی می شود. تخریب پذیری با افزودن CMCPH به GelaPH، در روز سوم در نمونه CMCPH40/GelaPH60 از ۴۲٪ به ۲۶٪ کاهش یافت که نشان از اثرگذاری پیوندهای کوالانسی در روند کاهشی تخریب پذیری می باشد. در روز پنجم، تفاوت چشم گیری در میزان تخریب پذیری در نمونه های CMCPH70GelaPH30 و CMCPH40GelaPH60 دیده نشد ($P>0.002$). به طور کلی می توان گفت که با افزایش درصد CMCPH در نمونه ها، درصد تخریب تا روز پنجم کاهش یافت. به علاوه، در روزهای هفتم و چهاردهم این روند ادامه یافت (شکل ۱۱). میزان تخریب نمونه GelaPH در روز چهاردهم، ۸۲٪ گزارش شد. این درحالی است که این عدد در نمونه CMCPH70GelaPH30، ۷۰٪ به دست آمد. نرخ تخریب هیدروژل ژلاتین و کربوکسی متیل سلولز در مقالات در پایان ۱۴ رو، ۵۰٪-۸۰٪ و ۶۰٪-۹۰٪ به ترتیب گزارش شده است [31,32].



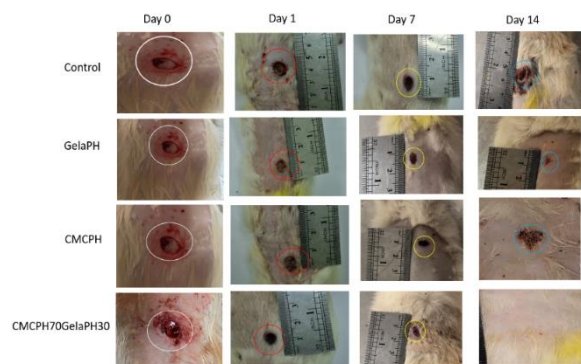
شکل ۱۱) تخریب هیدروژل ها در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۴.

شکل ۱۲) درصد زنده مانی سلول ها پس از عصاره گیری هیدروژل ها و اضافه کردن آن ها به سلول های فیبروبلاست در روزهای ۱ و ۵.

۳-۶ ارزیابی زنده مانی و تکثیر سلول های فیبروبلاست بر روی هیدروژل:

تست MTT برای سنجش سمیت هیدروژل ها بر روی سلول های فیبروبلاست 3T3 کشت داده شده براساس فعالیت میتوکندری

شده/کربوکسی متیل سلولز تایرامین دار شده، می‌توانند به‌عنوان یک محیط بیولوژیکی مناسب برای ترمیم زخم باشند.



شکل ۱۳) نمایش ماکروسکوپی ترمیم زخم پس از گذشت ۱۴ روز.

3-8 بررسی ترمیم زخم به‌وسیله‌ی رنگ آمیزی H&E:

در بررسی رنگ‌آمیزی H & E تشخیص لایه‌ی اپیدرم و درم بریده شده و ویژگی‌های آن‌ها همانند پاپیلای اپیدرم^{۲۳} و مرزهای آن میسر شد. لایه‌های کرنیوم^{۲۴} و پایه‌ای در شکل ۱۴ مشخص است. همان‌گونه که از این شکل قابل مشاهده است، در روزهای ۷ و ۱۴ اجزایی همانند فولیکول‌های مویی، غده‌های چربی و عرق، ماهیچه راست کننده مو^{۲۵} و مویرگ‌ها به‌خوبی شکل گرفته‌اند. این در حالی است که در گروه کنترل، اپیدرم ناکامل همراه با لایه‌های نامنظم از پاپیلای اپیدرم و کرنیوم مشاهده شد. در گروه‌های CMCPH و GelaPH در روزهای مشابه با CMCPH70GelaPH30 همچنان شاهد سلول‌های التهابی، بافت گرانوله و کلاژن‌ریزی پراکنده هستیم. همچنین، در گروه کنترل تجمع‌ی از سلول‌های التهابی و در برخی از نواحی، فولیکول‌های مو بدون هیچ غده‌ی مو و چربی مشاهده شد. در هیدروژل CMCPH70-GelaPH30 شاهد تکثیر سلول‌های فیبروبلاست و افزایش ضخامت لایه‌ی اپیدرم هستیم. به‌علاوه، در این گروه، تشکیل لایه‌ی اپیدرم شل و رها و نیز بازسازی فولیکول‌های مو و غده‌های چربی و عرق رویت شد که نشان از بازسازی پوست دارد. همچنین، در نمونه CMCPH70GelaPH30 کاهش بافت گرانوله و درجه‌ی التهاب قابل مشاهده است. افزایش تعداد سلول‌های مایوفیبروبلاست^{۲۶} در مطالعه H&E در بافتی که توسط هیدروژل CMCPH70GelaPH30 تیمار شده است، فاکتور مهم دیگری است که روند ترمیم زخم را تسریع می‌بخشد. این روند ترمیم زخم قابل قیاس با زخم پوش‌هایی با پایه کربوکسی متیل سلولز

3-7 بررسی ماکروسکوپی ترمیم زخم:

تاثیر عملکرد زخم پوش‌های هیدروژلی بر روی ترمیم زخم، در این آزمون حیوانی بررسی شد. زخم پوش‌های هیدروژلی CMCPH، GelaPH و CMCPH70/GelaPH30 یک بستر شفاف و با دوام که همانند بخیه برای زخم عمل می‌کند را فراهم کردند. این بدان معنی است که در این هیدروژل‌ها پیوندهای فنولی به‌همراه کراس‌لینک هرسرادیس پراکسدادیز^{۲۲} به اندازه کافی توانایی دارند که به عنوان ابزاری برای ترمیم زخم در مهندسی بافت و کاربردهای بازساختی استفاده شوند. در این مشاهدات محل‌های زخم فقط یک‌بار توسط هیدروژل‌ها آغشته شد و تعویض پانسمان صورت نگرفت تا تاثیر این داربست‌ها بر روی زخم به‌صورت یک‌پارچه مشخص شود. در طول بررسی ترمیم زخم، این پیچ‌های هیدروژلی در محل‌های زخم قابل مشاهده بودند و فرآیند ترمیم زخم و بازسازی لایه‌ی پوستی جدید و تعویض لایه پوستی جراح‌دار شده همراه با از بین رفتن داربست‌ها قابل رویت است. همان‌طور که از شکل ۱۳ مشخص است، در شرایط کنترل و بدون اعمال زخم پوش، خون‌ریزی و عفونت در طی مراحل ترمیم زخم مشاهده شد؛ در حالی که هیچ‌گونه عفونت و التهاب در زخم‌هایی که با هیدروژل‌ها آغشته شده بودند، مشاهده نشد. عکس‌هایی که در طول ترمیم زخم گرفته شده‌اند، نشان می‌دهد که در گروه CMCPH70/GelaPH30 هیچ‌گونه لبه و ناصافی بین محل زخم و بافت اطراف مشاهده نشد که این امر حاکی از عملکرد بهتر این زخم‌پوش در فرآیند بازسازی بافت در مقایسه با سایر زخم پوش‌ها است. به‌صورت خاص، پس از انجام محاسبات عددی در ترمیم زخم، این واقعیت قابل بیان است که گروه CMCPH70/GelaPH30 بیشترین میزان بسته شدن زخم را در میان زخم پوش‌ها دارد. این امر در حالی است که بسته شدن زخم در گروه کنترل پس از ۱۴ روز، $3\% \pm 68$ است. گروه CMCPH70/GelaPH30 بالاترین میزان بسته شدن زخم با اندازه $1\% \pm 98$ پس از روز ۱۴ را از خود نشان داد. پتیل و همکاران [۳۱] ادعا کردند که زخم پوش‌هایی که توانایی ترمیم زخم را در زمان‌های زیر ۲۰ روز دارا می‌باشند، قابلیت استفاده در مطالعات بالینی را دارند. با توجه به مطالعات ماکروسکوپی، در این تحقیق می‌توان ادعان نمود که هیدروژل سنتزی CMCPH70/GelaPH30 توانایی استفاده بر روی مطالعات کلینیکی را دارد. به‌طور خلاصه می‌توان بیان نمود که هیدروژل‌های بر پایه‌ی ژلاتین تایرامین‌دار

²⁵ Arrector Pili Muscle

²⁶ Mayofibroblast

²² Horseradish peroxidase

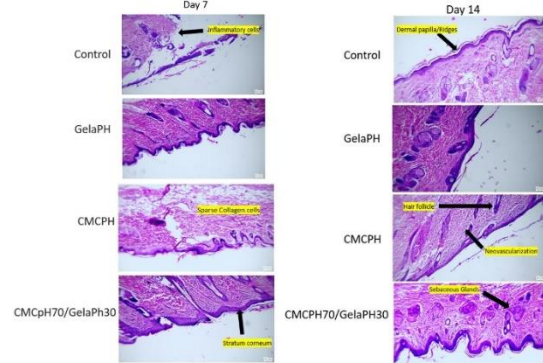
²³ Epiderm

²⁴ Corneum Stratum

۳-۱۰ شبیه سازی اکسیژن رسانی از هیدروژل به لایه ی اپیدرم پوست برای ترمیم زخم:

در این شبیه سازی، هیدروژل به صورت استوانه و به شعاع ۲.۵ میلی متر و ارتفاع ۵ میلی متر و نرخ انتشار اکسیژن در هیدروژل $(\frac{mol}{m^3.s})$ 10^{-9} و در اپیدرم $(\frac{mol}{m^3.s})$ 2.56×10^{-10} و غلظت اولیه اکسیژن در هیدروژل $\frac{mol}{m^3}$ 0.7 اندازه گیری شد. به علاوه، سطح مقطع در سه شعاع مختلف ترسیم شد و رهایش اکسیژن در هندسه های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۱۶-الف بیشترین رهایش اکسیژن با میزان $\frac{mol}{m^3}$ 1.36 در فصل مشترک هیدروژل و اپیدرم و شکل ۱۶-د کمترین میزان رهایش اکسیژن به میزان $\frac{mol}{m^3}$ 0.068 را دارا می باشد. همان طور که قابل مشاهده است، با افزایش غلظت کلسیوم پراکساید از ۰/۱ تا ۱ میلی گرم، رهایش اکسیژن به اپیدرم افزایش یافته است که نشان دهنده ی ترمیم زخم در مدت زمان کوتاه تر می باشد. در هر چهار شکل، گرادیان غلظت اکسیژن در سطح اپیدرم به نمایش گذاشته شده است. این اختلاف گرادیان غلظت اکسیژن در مرزهای اپیدرم در نمونه های با کلسیوم پراکساید ۱ میلی گرم (۱۶-ب)، شامل بیشترین مقدار (۱.۱ مول بر متر مکعب) و در نمونه ای با ۰.۱ میلی گرم کلسیوم پراکساید (۱۶-د) شامل کمترین مقدار (۰.۸ مول بر متر مکعب) می باشد. شکل ۱۸-ه) نشان دهنده اکسیژن رسانی به اپیدرم، بدون دخالت هیدروژل ژلاتین/کربوکسی متیل سلولز است که این میزان از اکسیژن تفاوت معناداری با حالت هایی که هیدروژل مداخله کرده است، دارد. در این بررسی، غلظت کلسیوم پراکساید به میزان $1 < CaO_2 < 0.1$ میلی گرم بر مترمکعب فرض شده است. همین طور که ابرهاردت و همکاران نشان دادند [34]، علی رغم افزایش اکسیژن رسانی با افزایش غلظت کلسیوم پراکساید، در نمونه هایی که شامل بیش از $\frac{mg}{mol}$ 0.5 کلسیوم پراکساید است، کاهش استحکام مکانیکی به دلیل ایجاد حباب های اکسیژن در نمونه ایجاد شده است. لذا میزان بهینه ی کلسیوم پراکساید به کار رفته در نمونه $\frac{mg}{mol}$ 0.5 می باشد. بر اساس گزارشات به دست آمده، هموگلوبین و سلول های قرمز که حامل اکسیژن هستند، توانایی اکسیژن رسانی به محل های زخم را دارند [35] و بدین منظور، هرچه غلظت اکسیژن در محل بیشتر باشد، ترمیم زخم در مدت زمان کوتاه تری انجام می پذیرد [36]. در این راستا، نمونه ای با میزان کلسیوم پراکساید $\frac{mg}{mol}$ 1 دارای سریع ترین میزان ترمیم زخم می باشد. ولی میزان بهینه ی کلسیوم پراکساید به دلیل وجود استحکام مکانیکی مناسب، نمونه ای با میزان کلسیوم پراکساید $\frac{mg}{mol}$ 0.5 است. کمترین میزان اکسیژن رسانی در میان هیدروژل به میزان 8×10^{-2} مول بر

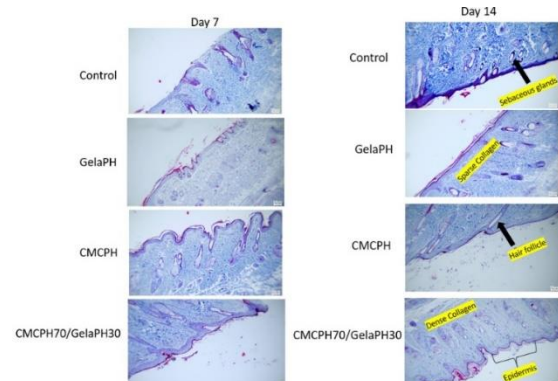
است که در طی بازه ۱۲ الی ۱۴ روز ترمیم زخم صورت می گیرد. چن و همکاران با استفاده از زخم پوش کربوکسی متیل سلولزی/کیتوسان بارگذاری شده با ملاتونین توانستند در طی ۱۲ روز به ترمیم کامل دست یابند [32].



شکل ۱۴) رنگ آمیزی H&E در روز های ۷ و ۱۴ در بافت های بایوپسی شده.

3-9 بررسی ترمیم زخم به وسیله ی رنگ آمیزی MT:

یکی از عوامل مهم در ترمیم زخم، رگ زایی است که به میزان زیادی در ترمیم زخم موثر است. همان گونه که از شکل ۱۵ مشخص است، در گروه CMCPH70/GelaPH30 میزان ایجاد عروق و رگ زایی بیشتر از سایر گروه ها است. رنگ سنجی MT نشان می دهد که گروه های کنترل و GelaPH بافت پراکنده از کلاژن را دارا هستند. در نقاط لبه ای و کناری زخم ها که با CMCPH70/GelaPH30 تریب شدند، بافت کلاژن پراکنده تر مشاهده شد. اما در نواحی مرکزی بافت های بایوپسی شده، فیبرهای کلاژنی متراکم تر حاصل شدند که این مشاهده هم سو با نتایج حاصل از رنگ آمیزی بافت توسط پنیل و همکاران می باشد [31]. به طور خلاصه می توان گفت هیدروژل های متشکل از ترکیب دو پلیمر CMCPH و GelaPH می توانند با کمک به سلول های اپیتلیال و فیبروبلاست و اندوتلیال و آزاد کردن مولکول های بیواکتیو به ترمیم بافت کمک کنند.



شکل ۱۵) رنگ آمیزی MT در روز های ۷ و ۱۴ در بافت های بایوپسی شده.

به‌دست آمده حاکی از آن است که هیدروژل Gela30/CMC70 بهترین نمونه‌ی سنتزی به‌علت نرخ بالای زنده‌مانی سلولی (سلول‌های فیبروبلاست) (شکل ۱۲)، استحکام مکانیکی مناسب (شکل‌های ۳-۸)، میزان جذب بالای آب (شکل ۹)، ژل شوندگی درجا (شکل ۱۰)، سریع‌ترین ترمیم لایه‌ی اپیدرم در ناحیه زخم در مدت زمان ۱۴ روز (شکل ۱۳)، تشکیل غدد فولیکا و عرق به‌صورت کامل و تشکیل لایه کلاژنی یک‌پارچه می‌باشد (شکل‌های ۱۴-۱۶). از طرف دیگر، طبق داده‌های به‌دست آمده از شبیه‌سازی، نمونه‌ی هیدروژلی که شامل 0.5 g کلسیوم پراکساید بوده است، توانایی رهایش بیشترین میزان اکسیژن $1.34 \frac{mol}{m^3}$ (شکل ۱۶-الف) در فاصله ۱ میلی‌متری از سطح هیدروژل را دارا است. پس می‌توان این نتیجه را گرفت که با سنتز هیدروژلی با میزان ۷۰ درصد کربوکسی متیل سلولز تایرامین‌دار شده، ۳۰ درصد ژلاتین تایرامین‌دار شده و ۰.۵ گرم کلسیوم پراکساید، داربستی با بیشترین میزان اثربخشی در ارتباط با ترمیم زخم انتظار می‌رود. برای دستیابی به بهترین هندسه ممکن برای سنتز هیدروژل ها، سطح مقطع هیدروژل تغییر کرده (شکل ۱۸) و شعاع آن ۱ و ۵ میلی‌متر و غلظت کلسیوم پراکساید $0.5 \frac{mg}{ml}$ در نظر گرفته شد. دلیل در نظر گرفتن این اعداد به‌عنوان سطح مقطع، آن بود که در صورت سنتز هیدروژل‌ها در پلیت‌های ۹۶ و ۴ خانه‌ای، سطح مقطعی با شعاع ۱ و ۵ میلی‌متر حاصل می‌شد (شکل ۱۸). با توجه به نمودارهای ترسیم شده حاصل از سطح مقطع‌های متفاوت با غلظت یکسان $0.5 \frac{mg}{ml}$ کلسیوم پراکساید به‌عنوان مناسب‌ترین غلظت، این حقیقت آشکار شد که در تمام نمونه‌ها و به‌طور یکسان در فاصله ۱ میلی‌متری از سطح هیدروژل، بیشترین میزان اکسیژن‌رسانی به‌میزان $0.68 \frac{mol}{m^3}$ مشاهده شد. تفاوت در هندسه، صرفاً باعث تمایز در روند صعودی اکسیژن‌رسانی از سطح هیدروژل تا فاصله ۱ میلی‌متری از آن و سپس روند نزولی اکسیژن‌رسانی از فاصله ۱ میلی‌متری تا انتهای هیدروژل در سطح مقطع‌هایی با شعاع ۲.۵ و ۵ میلی‌متر می‌شود که این روند در هیدروژل با سطح مقطع ۵ میلی‌متر، به‌صورت شدیدتر می‌باشد. اما در هیدروژل‌های سنتزی با شعاع ۱ میلی‌متر، با وجود مشابه بودن میزان غلظت اکسیژن تا فاصله ۱ میلی‌متری، در بحث میزان اکسیژن رها شده در اپیدرمیس، کاهش غلظت $(0.126 \frac{mol}{m^3})$ مشاهده شد. به‌طور کلی می‌توان گفت که با تغییر سطح مقطع از ۲.۵ به ۵ میلی‌متر، اکسیژن‌رسانی روند ثابتی را طی می‌کند. اما در صورت کاهش سطح مقطع به ۱ میلی‌متر، میزان اکسیژن رها شده در لایه اپیدرمیس کاهش می‌یابد.

مترمکعب و در حالت نرمال و بدون اعمال هیدروژل $\frac{mol}{m^3}$ 30×10^{-5} محاسبه شده است که این نتایج نشان از تاثیرگذار یقابل ملاحظه‌ی هیدروژل سنتزی دارد. همچنین، شکل ۱۶ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت کلسیوم پراکساید، میزان رهایش اکسیژن افزایش می‌یابد و در ۱ میلی‌متری از سطح هیدروژل، میزان رهایش اکسیژن در تمام هیدروژل‌ها به بیشترین مقدار خود می‌رسد. نمونه‌ای که دارای ۱ میلی‌گرم کلسیوم پراکساید است، دارای بالاترین میزان رهایش اکسیژن به میزان $1.34 \frac{mol}{m^3}$ در فاصله ۱ میلی‌متری از سطح هیدروژل است و نمونه‌ای که دارای ۰.۱ میلی‌گرم کلسیوم پراکساید است، با رهایش به‌میزان ۰.۰۷ مول بر متر مکعب در فاصله ۱ میلی‌متری از سطح هیدروژل، کمترین میزان رهایش اکسیژن را از خود نشان داد. این نتایج نشان از آن دارد که وجود هیدروژل ژلاتین/ کربوکسی متیل سلولز که وسیله کلسیوم پراکساید کراس لینک شده است، گزینه مناسبی برای ترمیم زخم به‌دلیل اکسیژن‌رسانی مناسب می‌باشد.

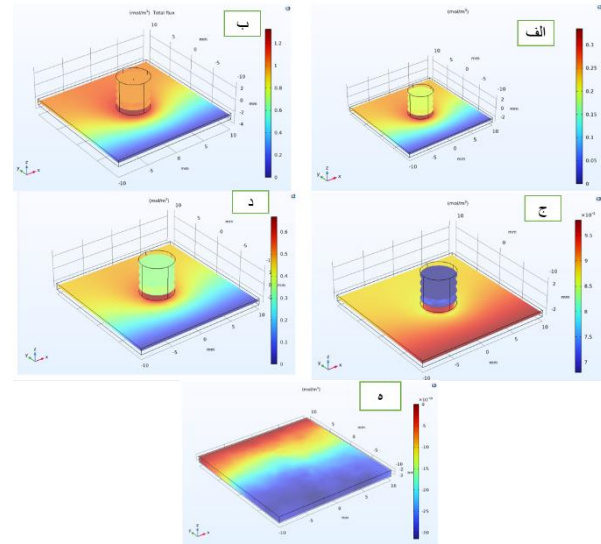
۳-۱۰-۱ ارتباط خروجی‌های شبیه‌سازی با نتایج آزمایشگاهی:

شکل ۱۶ نشان می‌دهد که به‌دلیل تک‌جهته بودن شار اکسیژن در بدن، با حرکت از نواحی چپ به راست، گرادینان اکسیژن کاهش می‌یابد. با افزایش غلظت کلسیوم پراکساید، میزان اکسیژن رهایش یافته به اپیدرم از $9/5 \times 10^{-2} \frac{mol}{m^3}$ در غلظت ۰.۱ میلی‌گرم به $1.2 \frac{mol}{m^3}$ در غلظت ۱ میلی‌گرم در همان ناحیه، نشان از اهمیت وجود عامل اکسیژن‌ساز یعنی کلسیوم پراکساید در داربست هیدروژلی دارد. با مقایسه شکل ۱۶-ب) با سایر داده‌های شبیه‌سازی به‌علت اختلاف قابل توجه میزان اکسیژن رهایش شده در بدن $(10^{-15} \frac{mol}{m^3})$ ، می‌توان اذعان داشت که فرآیند ترمیم زخم در پوست، بدون دخالت داربست هیدروژلی بسیار طولانی و زمان‌بر خواهد بود. همچنین با توجه به شکل ۱۷ در فاصله ۱ میلی‌متری از سطح هیدروژل شاهد بیشترین میزان اکسیژن رها شده در هر ۴ مدل شبیه‌سازی شده هستیم که با قرار گرفتن ناحیه اپیدرم مجروح شده در این فاصله، انتظار موثرترین میزان اثربخشی هیدروژل سنتزی در جهت شار اکسیژن در بدن، با حرکت از نواحی چپ به راست وجود دارد. با افزایش غلظت کلسیوم پراکساید، تغییر میزان اکسیژن رهایش یافته به اپیدرم از $9/5 \times 10^{-2} \frac{mol}{m^3}$ در غلظت ۰.۱ میلی‌گرم به $1.2 \frac{mol}{m^3}$ در غلظت ۱ میلی‌گرم در همان ناحیه، نشان‌دهنده‌ی اهمیت وجود عامل اکسیژن‌ساز یعنی کلسیوم پراکساید در داربست هیدروژلی می‌باشد. داده‌های آزمایشگاهی

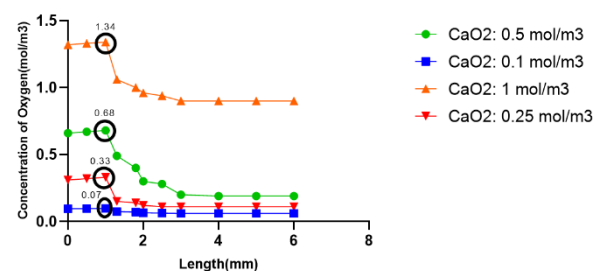
به وسیله الکترون دهنده (کلسیوم پراکساید) و کراس لینکر آنزیمی (آنزیم هورس رادیش پراکساید)، ترکیب شدند و هیدروژل هایی با چهار درصد مختلف حاصل شد. تایر امین دار شدن پلی ساکارید و پروتئین توسط آزمون UV بررسی شد. سپس استحکام مکانیکی هیدروژل ها توسط آزمون رئولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت و برای بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی هیدروژل، آزمون های میزان تورم و زمان ژل شدن در هیدروژل ها، مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه، برای اثبات زیست سازگاری این هیدروژل ها، تست MTT بر روی سلول های فیبروبلاست موشی مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور بررسی اثر پذیری این هیدروژل ها، این بیومواد بر روی رت های آزمایشگاهی قرار گرفتند و اثربخشی آن ها به وسیله بررسی ماکروسکوپی و رنگ آمیزی های MT و H&E انجام گرفت. در نهایت، به منظور اثبات اکسیژن رسانی مناسب این هیدروژل و در نتیجه، تاثیر آن بر روی تسریع ترمیم زخم ایجاد شده بر روی اپیدرم، شبیه سازی به وسیله نرم افزار کامسول صورت گرفت.

بر اساس آزمون های انجام شده، هیدروژل CMCPH70_GELAPH30 بهینه ترین نمونه در تمام تست ها بود. تست UV در طول موج ۲۷۵ نانومتر پیک مشخصه فنول را هم در ژلاتین و هم در کربوکسی متیل تایر امین دار شده به ترتیب به میزان 263×10^{-4} و 19×10^{-3} مول فنول به ازای هر گرم از ماده ها ایجاد کرد که این میزان برای انجام کراس لینکینگ به صورت آنزیمی مناسب است [36]. بر اساس آزمون رئولوژی با افزودن دو پلیمر به هم، هم G' و هم G'' افزایش یافت که حاکی از افزایش خواص مکانیکی با اضافه شدن CMCPH دارد.

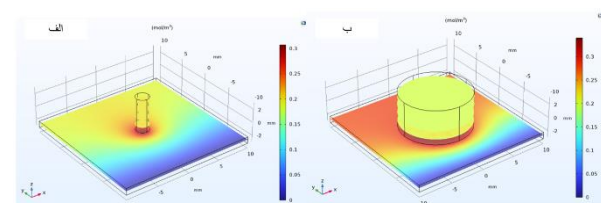
بررسی های صورت گرفته از تست زمان ژل شدن در نمونه ها حاکی این واقعیت است که گروه CMCPH60-GelaPH40 کمترین زمان ژل شدن با ۹ ثانیه و GelatinPH بیشترین زمان ژل شدن با ۲۸ ثانیه را از خود نشان دادند. این در حالی است که هیدروژل های پایه ژلاتینی مطابق یافته های پژوهش های پیشین، به زمان بیشتری برای ژل شدن نیاز دارند که این ویژگی برای هیدروژل های تزریق پذیر مناسب نیست [38]. ارزیابی زنده مانگی در سلول های فیبروبلاست گویای این واقعیت است که در روز اول تمام نمونه ها زنده مانگی بالایی از خود نشان دادند و حتی تکثیر و رشد سلول ها نیز مشاهده شد (نرخ زنده مانگی ۱۰۰ درصد). اما در روز پنجم، این روند کاهش یافت و در نمونه CMCPH به میزان ۵۳٪ و GelaPH به میزان ۶۸٪ به ترتیب کمترین و



شکل ۱۶) شبیه سازی رهایش اکسیژن از کلسیوم پراکساید در غلظت های الف) ۱ میلی گرم ب) ۰.۵ میلی گرم ج) ۰.۲۵ میلی گرم د) ۰.۱ میلی گرم ه) بدون قرار دادن هیدروژل.



شکل ۱۷) غلظت اکسیژن در هیدروژل ها بر حسب فاصله از سطح بالایی هیدروژل.



شکل ۱۸) غلظت اکسیژن آزاد در هیدروژل ها بر حسب فاصله از سطح بالایی هیدروژل در دو سطح مقطع متفاوت: الف) ۲.۵ میلی متر ب) ۵ میلی متر.

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه، ابتدا ژلاتین و کربوکسی متیل سلولز تایر امین دار شدند. سپس از درصدهای مختلفی از این دو پلی ساکارید

نسبت به سایر زخم‌پوش‌های سنتزی دارد. زیرا در کنار ژلاتین که پلی‌ساکاریدی با خاصیت ضد التهابی و زیست‌سازگاری مناسب است [39]، کربوکسی متیل سلولز وجود دارد که ضعف ژلاتین یعنی استحکام مکانیکی ضعیف را پوشش می‌دهد [40,41]. لذا این داربست در کنار کمک به مهاجرت سلول‌های فیبروبلاست برای ترمیم زخم، خاصیت پایداری بالا را دارد. به علاوه، عامل اکسیژن رسان یعنی کلسیوم پراکساید فرآیند ترمیم زخم را تسریع کرده و این زخم‌پوش را به داربستی منحصر به فرد برای ترمیم زخم تبدیل می‌کند. بیوراکتورهای پوستی پتانسیل بسیار مناسبی برای شبیه‌سازی محیط زخم در بدن را فراهم می‌کنند که امید است در مطالعات آتی از آن‌ها برای استخراج داده‌هایی برای کمک به ساخت داربست هیدروژلی با خواص مطلوب‌تر، استفاده شود. همچنین، در این مطالعه، داربست‌های هیدروژلی عاری از سلول‌های فیبروبلاست بر روی پوست رت‌های آزمایشگاهی قرار گرفت. در مطالعات آتی با در نظر گرفتن شرایط زنده‌مانی سلول، استفاده از داربست‌های هیدروژلی حاوی سلول می‌تواند به روند ترمیم زخم در مطالعات حیوانی کمک شایانی کند. به‌علاوه، در این مطالعه، نرخ انتشار اکسیژن در اپیدرم به‌صورت یکنواخت و همگن فرض شده است و نیز شرایط مرزی همانند فاصله قرارگیری زخم‌پوش از طرفین اپیدرم چشم‌پوشی شده است. در مدل‌های محاسباتی آتی پیشنهاد می‌شود که هیدروژل‌ها به جای هندسه استوانه‌ای، به‌صورت نیمکره نیز در نظر گرفته شوند تا نتایج حاصل از هندسه‌های متفاوت محاسبه شود. در نهایت قابل ذکر است که در مطالعات آتی می‌توان با تطبیق داده‌های حاصل از بیوراکتور پوستی، هیدروژل‌های حاوی سلول فیبروبلاست و محاسبات شبیه‌سازی، دید جامعی در خصوص طراحی زخم‌پوش‌های تخریب‌پذیر به‌دست آورد.

۵- مراجع

- [1] A. Aravamudhan, D. M. Ramos, A. A. Nada, and S. G. Kumbar, "Natural polymers: polysaccharides and their derivatives for biomedical applications," in *Natural and synthetic biomedical polymers*: Elsevier, 2014, pp. 67-89.
- [2] F. Abedini, M. Ebrahimi, A. H. Roozbehani, A. J. Domb, and H. Hosseinkhani, "Overview on natural hydrophilic polysaccharide polymers in drug delivery," *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 29, no. 10, pp. 2564-2573, 2018.
- [3] M. P. Rowan et al., "Burn wound healing and treatment: review and advancements," *Critical care*, vol. 19, pp. 1-12, 2015.
- [4] R. F. Diegelmann and M. C. Evans, "Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing," *Front biosci*, vol. 9, no. 1, pp. 283-289, 2004.
- [5] S. Saeed and M. Martins-Green, "Animal models for the study of acute cutaneous wound healing," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 31, no. 1, pp. 6-16, 2023.
- [6] J. Lei et al., "The wound dressings and their applications in wound healing and management," *Health Science Journal*, vol. 13, no. 4, pp. 1-8, 2019.

بیشترین نرخ زنده‌مانی سلول‌ها مشاهده شدند. بررسی‌های ماکروسکوپی در ترمیم زخم نشان دادند که پس از گذشت ۱۴ روز، در نمونه CMCPH70_GelaPH30 به‌میزان $98 \pm 1\%$ ترمیم زخم به‌طور نسبتاً کامل صورت گرفت. این در حالی است که در میزان بسته شدن ناحیه زخم در گروه کنترل، به‌میزان $68 \pm 3\%$ انجام گرفته بود. این درصد از بسته شدن زخم در مقایسه با هیدروژل‌های پایه سلولزی، برتری قابل توجهی دارد. زیرا درصد به‌هم رسیدن لبه‌های زخم در مطالعات پیشین تا روز ۱۴ کمتر از ۹۰٪ بوده است. رنگ آمیزی های H&E و MT نشان دادند که فولیکول‌های مو، غدد عرق، رگ‌زایی و بافتی با کلاژن‌های متراکم در هیدروژل CMCPH70_GelaPH30 تشکیل شده است. اما نمونه‌ی کنترل، عاری از هرگونه رگ‌زایی است و غدد عرق و بافت کلاژن تشکیل شده نیز نامتراکم بوده است. شبیه‌سازی محاسباتی نشان داد که نمونه‌ای که دارای یک میلی‌گرم CaO_2 است، بالاترین میزان رهایش اکسیژن به اپیدرم را با 1.36 مول بر مترمکعب دارد. اما به‌دلیل تشکیل حباب‌های اکسیژن در غلظت‌هایی بالاتر از 0.5 میلی‌گرم، استحکام داربست کاهش می‌یابد. لذا بهینه غلظت CaO_2 در 0.5 میلی‌گرم بر مول و با میزان اکسیژن رسانی 0.68 مول بر متر مکعب به‌دست آمده است. شایان ذکر است که غلظت کلسیوم پراکساید در بازه‌ی مشخصی ($0.1\text{mg} < \text{CaO}_2 < 1\text{mg}$) صورت پذیرفته است. با شبیه‌سازی انجام شده مشخص شد که بیشترین میزان اکسیژن رسانی در اپیدرم بدون دخالت هرگونه هیدروژلی 30×10^{-15} مول بر مترمکعب اندازه‌گیری شد. این درحالی است که در هیدروژلی با کمترین میزان اکسیژن‌رسانی (غلظت کلسیوم پراکساید 0.1 میلی‌گرم)، این عدد 8×10^{-2} مول بر متر مکعب است. این اختلاف چشم‌گیر نشان از تاثیرگذاری قابل توجه هیدروژل‌ها در زمینه‌ی اکسیژن‌رسانی و در نهایت ترمیم زخم دارد. این نکته قابل ذکر است که با تغییر شعاع سطح مقطع به‌میزان 5 میلی‌متر، تغییر محسوسی در میزان اکسیژن رسانی به اپیدرمیس ایجاد نشد. ولی با کاهش سطح مقطع به شعاع 1 میلی‌متر، غلظت اکسیژن رها شده در اپیدرمیس کاهش یافت. بنابراین، از این نتیجه استنباط می‌شود که با سنتر هیدروژل در پلیت‌های 24 یا 4 خانه، تغییری در روند اکسیژن رسانی و در نهایت ترمیم زخم مشاهده نشد. اما با سنتر هیدروژل در پلیت‌های 96 خانه، میزان اکسیژن رسانی کاهش یافته و در نتیجه ترمیم زخم طولانی‌تری خواهیم داشت. در نهایت می‌توان گفت که زخم‌پوش ژلاتین-کربوکسی متیل سلولزی با الکترون دهنده کلسیوم پراکساید برتری قابل توجهی

- mediated generation of hyperthermia and highly toxic reactive oxygen species," *Acs Nano*, vol. 13, no. 12, pp. 14013-14023, 2019.
- [2v] F. Rahimi *et al.*, "Gelatin-based hydrogel functionalized with taurine moieties for in vivo skin tissue regeneration," *Bio-Design and Manufacturing*, vol. 6, no. 3, pp. 284-297, 2023.
- [2A] G. Stojkov, Z. Niyazov, F. Picchioni, and R. K. Bose, "Relationship between structure and rheology of hydrogels for various applications," *Gels*, vol. 7, no. 4, p. 255, 2021.
- [2⁹] H. Jafari *et al.*, "An injectable, self-healing, 3D printable, double network co-enzymatically crosslinked hydrogel using marine poly- and oligo-saccharides for wound healing application," *Applied Materials Today*, vol. 29, p. 101581, 2022.
- [۳۰] Y. Chen *et al.*, "Glucose-triggered in situ forming keratin hydrogel for the treatment of diabetic wounds," *Acta biomaterialia*, vol. 125, pp. 208-218, 2021.
- [31] Sethi, Sapna, and Swati Thakur. "Synthesis and characterization of nanocomposite chitosan-gelatin hydrogel loaded with ZnO and its application in photocatalytic dye degradation." *Materials Today: Proceedings* 78 (2023): 815-824.
- [32] Milošević, Ksenija, et al. "Eco-Friendly g-C₃N₄/Carboxymethyl Cellulose/Alginate Composite Hydrogels for Simultaneous Photocatalytic Degradation of Organic Dye Pollutants." *International Journal of Molecular Sciences* 25.14 (2024): 7896.
- [33] Chen, K., C. Tong, P. Cong, Y. Liu, X. Shi, X. Liu, J. Zhang, R. Zou, K. Xiao and Y. Ni (2021). "Injectable melatonin-loaded carboxymethyl chitosan (CMCS)-based hydrogel accelerates wound healing by reducing inflammation and promoting angiogenesis and collagen deposition." *Journal of Materials Science & Technology* 63: 236-245.
- [34] J. Zhang, R. Zhou, C. Xiang, Q. Jia, H. Wu, and H. Yang, "Huangbai liniment accelerated wound healing by activating Nrf2 signaling in diabetes," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2020, 2020.
- [35] W. Li, S. Wang, D. Zhong, Z. Du, and M. Zhou, "A bioactive living hydrogel: photosynthetic bacteria mediated hypoxia elimination and bacteria-killing to promote infected wound healing," *Advanced Therapeutics*, vol. 4, no. 1, p. 2000107, 2021.
- [36] P. Atienza-Roca *et al.*, "Visible light mediated PVA-tyramine hydrogels for covalent incorporation and tailorable release of functional growth factors," *Biomaterials Science*, vol. 8, no. 18, pp. 5005-5019, 2020.
- [37] S. Kwon *et al.*, "In vivo vocal fold augmentation using an injectable polyethylene glycol hydrogel based on click chemistry," *Biomaterials Science*, vol. 9, no. 1, pp. 108-115, 2021.
- [38] Y. Li, J. Rodrigues, and H. Tomás, "Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications," *Chemical Society Reviews*, vol. 41, no. 6, pp. 2193-2221, 2012.
- [39] Y. Wang and D. Shi, "In vitro and in vivo evaluations of nanofibrous nanocomposite based on carboxymethyl cellulose/polycaprolactone/cobalt-doped hydroxyapatite as the wound dressing materials," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 15, no. 11, p. 104270, 2022.
- [40] T. Li, M. Sun, and S. Wu, "State-of-the-art review of electrospun gelatin-based nanofiber dressings for wound healing applications," *Nanomaterials*, vol. 12, no. 5, p. 784, 2022.
- [41] J. Shen *et al.*, "Light emitting CMC-CHO based self-healing hydrogel with injectability for in vivo wound repairing applications," *Carbohydrate Polymers*, vol. 281, p. 119052, 2022.
- [7] Z. Xu, S. Han, Z. Gu, and J. Wu, "Advances and impact of antioxidant hydrogel in chronic wound healing," *Advanced healthcare materials*, vol. 9, no. 5, p. 1901502, 2020.
- [8] L. Zhang *et al.*, "A systematic review and meta-analysis of clinical effectiveness and safety of hydrogel dressings in the management of skin wounds," *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, vol. 7, p. 342, 2019.
- [9] H. Hu and F.-J. Xu, "Rational design and latest advances of polysaccharide-based hydrogels for wound healing," *Biomaterials science*, vol. 8, no. 8, pp. 2084-2101, 2020.
- [10] Kulkarni G, Guha Ray P, Sunka KC, Dixit K, Dhar D, Chakrabarti R, et al. Investigating the Effect of Polypyrrole-Gelatin/Silk Fibroin Hydrogel Mediated Pulsed Electrical Stimulation for Skin Regeneration. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2024;16(42):56762-76.
- [11] X. Xie, L. T. Tolley, T. X. Truong, H. D. Tolley, P. B. Farnsworth, and M. L. Lee, "Dual-wavelength light-emitting diode-based ultraviolet absorption detector for nano-flow capillary liquid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 1523, pp. 242-247, 2017.
- [12] X. Xu, F. A. Jerca, K. Van Hecke, V. V. Jerca, and R. Hoogenboom, "High compression strength single network hydrogels with pillar [5] arene junction points," *Materials Horizons*, vol. 7, no. 2, pp. 566-573, 2020.
- [13] T. Cui, Y. Wu, C. Ni, Y. Sun, and J. Cheng, "Rheology and texture analysis of gelatin/dialdehyde starch hydrogel carriers for curcumin controlled release," *Carbohydrate Polymers*, vol. 283, p. 119154, 2022.
- [14] N. Richbourg *et al.*, "Precise control of synthetic hydrogel network structure via linear, independent synthesis-swelling relationships," *Science Advances*, vol. 7, no. 7, p. eabe3245, 2021.
- [15] C. Zhou *et al.*, "Gradual hydrogel degradation for programable repairing full-thickness skin defect wound," *Chemical Engineering Journal*, vol. 450, p. 138200, 2022.
- [16] T. T. Nguyễn, J. Ratanavaraporn, and S. Yodmuang, "Alginate-silk fibroin Bioink: A printable hydrogel for tissue engineering," in *2019 12th Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON)*, 2019, pp. 1-4: IEEE.
- [17] M. Bahadoran, A. Shamloo, and Y. D. Nokoarani, "Development of a polyvinyl alcohol/sodium alginate hydrogel-based scaffold incorporating bFGF-encapsulated microspheres for accelerated wound healing," *Scientific reports*, vol. 10, no. 1, p. 7342, 2020.
- [18] H. Suo *et al.*, "Correction to "injectable and pH-sensitive hyaluronic acid-based hydrogels with on-demand release of antimicrobial peptides for infected wound healing"," *Biomacromolecules*, vol. 22, no. 12, pp. 5400-5400, 2021.
- [19] Y. Hacham *et al.*, "Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size," *Development*, vol. 138, no. 5, pp. 839-848, 2011.
- [20] R. K. Wang, "Directional blood flow imaging in volumetric optical microangiography achieved by digital frequency modulation," *Optics letters*, vol. 33, no. 16, pp. 1878-1880, 2008.
- [۲1] M. Sun *et al.*, "A flexible and wearable epidermal ethanol biofuel cell for on-body and real-time bioenergy harvesting from human sweat," *Nano Energy*, vol. 86, p. 106061, 2021.
- [۲2] S. Schreml *et al.*, "Luminescent dual sensors reveal extracellular pH-gradients and hypoxia on chronic wounds that disrupt epidermal repair," *Theranostics*, vol. 4, no. 7, p. 721, 2014.
- [2۳] X. Chen *et al.*, "In vivo real-time imaging of cutaneous hemoglobin concentration, oxygen saturation, scattering properties, melanin content, and epidermal thickness with visible spatially modulated light," *Biomedical optics express*, vol. 8, no. 12, pp. 5468-5482, 2017.
- [2۴] L. Figueiredo *et al.*, "Assessing glucose and oxygen diffusion in hydrogels for the rational design of 3D stem cell scaffolds in regenerative medicine," *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, vol. 12, no. 5, pp. 1238-1246, 2018.
- [2۵] P. Qing, T.-Q. Chai, H.-M. Ding, C.-H. Zhao, and J. Hu, "Effect of electroacupuncture combined with rehabilitation training on neurological function and expression of neuronal growth associated protein 43 and synaptophysin in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion injury," *Acupuncture Research*, vol. 41, no. 4, pp. 314-320, 2016.
- [2۶] H. Wu, L. Liu, L. Song, M. Ma, N. Gu, and Y. Zhang, "Enhanced tumor synergistic therapy by injectable magnetic hydrogel