

بررسی مکانیسم رهایش نیترات نقره در پد هیدروژل بر پایه نانوسلولز جهت ترمیم سوختگی

چکیده

یکی از کاربردهای هیدروژل‌ها، استفاده از آن به‌عنوان پانسمان (زخم و سوختگی) می‌باشد. زیست‌سازگاری و عدم سمیت سلولی برای هیدروژل‌های مورد استفاده در زمینه پزشکی اهمیت ویژه‌ای دارد. مواد سلولزی می‌توانند داروها را بارگذاری کرده و در شرایط دمایی و یا pH سطح بدن در اثر فرآیندهای مختلف مانند انتشار، داروها را آزاد کنند. هدف از این مطالعه بررسی مکانیسم رهایش نیترات نقره در فیلم هیدروژل زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه نانوسلولز جهت ترمیم سوختگی بود. جهت تهیه فیلم هیدروژل، از نانوالیاف سلولزی و هیدروکسی اتیل سلولز با نسبت وزنی (۳ به ۱) و همچنین از سیتریک اسید به‌عنوان اتصال‌دهنده عرضی با مقادیر ۱۰ و ۲۰ درصد وزنی نسبت به بستر استفاده شد. سپس بارگذاری نیترات نقره به‌عنوان یک داروی ضد عفونی‌کننده به هیدروژل‌های تهیه‌شده انجام شد. نتایج رهایش دارو نشان داد که رابطه خطی بین میزان جذب و غلظت داروی مربوطه وجود دارد. در ساعات اولیه آزمایش، ۷۰ تا ۹۰ درصد از رهایش دارو مشاهده شد و سپس تا ۲۴ ساعت، دارو به آرامی از هیدروژل آزاد گردید. مدل‌سازی رهایش دارو، انتشار فیک را به‌عنوان مکانیسم غالب در تحویل دارو انتخاب کرد. آزمون عدم سمیت MTT، اثربخشی بالای کاتیونیزاسیون نانوسلولز را نشان داد و مؤید عدم سمیت هیدروژل‌های بر پایه مواد زیست‌سازگار بود. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که هیدروژل زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه نانوسلولز که حاوی نیترات نقره است، به‌عنوان یک محصول کاملاً مناسب و کاربردی جهت ترمیم سوختگی قابل استفاده می‌باشد.

واژگان کلیدی: هیدروژل، پانسمان سوختگی، نانوسلولز، نیترات نقره.

مهدی جنوبی^{*۱}

پیام مرادپور^{*۲}

علی اکبر تفنگچی کله بستی^۳

۱ دانشیار گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲ استادیار گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

مسئول مکاتبات:

pmoradpour@ut.ac.ir
mehdi.jonoobi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۲۴

مقدمه

هیدروژل‌ها دسته‌ای از مواد پلیمری با ساختار شبکه‌ای سه‌بعدی و دارای پیوندهای عرضی فیزیکی و یا شیمیایی هستند و به دلیل دارا بودن ویژگی‌های خاصی مانند حساسیت بالا به محیط فیزیولوژیکی، طبیعت آب-دوست، قدرت جذب آب و انعطاف‌پذیری مطلوب، برای

کاربردهای زیست‌پزشکی مانند حامل‌های دارو، بخیه‌های قابل جذب آب هیدروژل و به‌عنوان نیوپلاسم بسیار مناسب می‌باشند [۱،۲]. قابلیت جذب آب هیدروژل‌ها از گروه‌های عاملی آب‌دوست در زنجیرهای پلیمری شامل گروه‌های هیدروکسیل، کربوکسیل، آمین و سولفون ناشی می‌شود؛ درحالی‌که مقاومت آن‌ها در برابر انحلال به دلیل اتصالات

ورقه استفاده کرد. برای تهیه فیلم هیدروژل، ترکیبات پلیمری با ایجاد اتصال عرضی آب را به صورت فیزیکی در خود گیر می‌اندازند. این صفحات می‌توانند پس از تماس با زخم‌های چرکی حجم آب قابل توجهی را جذب و نگهداری کنند. پانسمان هیدروژل، هنگامی که به صورت ژل بی‌شکل بر روی زخم قرار می‌گیرد، نیاز به تعویض مکرر دارد و می‌بایست از یک پوشش ثانویه مانند گاز استفاده شود [۱۱]، درحالی‌که در پانسمان هیدروژل به شکل فیلم نیمه‌تراوای پلیمری، انتقال بخار آب کنترل‌شده و رطوبت در ناحیه سوختگی حفظ می‌شود و برای بهبود و درمان بیماران سوختگی در کوتاه‌ترین زمان دارای بیشترین اثربخشی می‌باشند [۱۲، ۱۳]. تنها نقطه ضعف هیدروژل‌ها پایداری مکانیکی ضعیف آن‌ها در حالت متورم می‌باشد. این ضعف با استفاده از هیدروژل‌های کامپوزیت یا هیبرید که از ترکیب بیش از یک پلیمر تهیه می‌شوند، جبران می‌شود.

توسعه مواد نوین زیست‌پزشکی از پلیمرهای طبیعی برای کاربردهای عملی و بالینی همواره موضوعی قابل توجه برای زیست‌شناسان و دانشمندان بوده است [۱۴]. هیدروژل‌ها به دلیل ماهیتی که دارند، می‌توانند در بسیاری از انواع سیستم‌های رهایش کنترل‌شده استفاده شوند. در ساخت هیدروژل‌ها از پلیمرهای طبیعی شامل پروتئین‌هایی مثل کلاژن و ژلاتین و پلی‌ساکاریدهایی مانند نشاسته، سلولز، آلژینات و آگاروز و همچنین از پلیمرهای مصنوعی با استفاده از روش‌های پلیمریزاسیون شیمیایی استفاده می‌شود [۱۵]. پلیمرها به علت دارا بودن مزایای بالقوه، در تهیه پانسمان با رهایش کنترل‌شده استفاده می‌شوند. داروهایی که رهایش کنترل‌شده دارند با آزادسازی دارو برای مدت طولانی، بدون نیاز به تغییر مکرر پانسمان، عملکرد دارو را طولانی‌تر می‌کنند [۱۶]. از مزایای رهایش کنترل‌شده دارو، توانایی حفظ غلظت دارو در حدی نسبتاً ثابت برای مدتی مشخص است. پلیمرهای سنتزی، نیمه سنتزی و طبیعی برای این منظور مفید هستند، زیرا آن‌ها می‌توانند با آزاد کردن تدریجی آنتی-بیوتیک‌ها، داروها، مواد ضدالتهابی و غیره از مصرف دوز بالا جلوگیری کنند [۱۷]. پس‌ازاینکه پلیمرها تأثیر مطلوب خود را اعمال کردند، می‌توانند به‌آسانی از سطح

عرضی بین زنجیرهای شبکه ایجاد می‌گردد [۳]. هیدروژل‌ها از لحاظ ظاهر فیزیکی به شکل‌های مختلفی از قبیل میکرو ذرات، نانو ذرات، پودر، پوشش‌ها، فیلم، غشا یا امولسیون وجود دارند. ظاهر فیزیکی هیدروژل‌ها به روش پلیمریزاسیون در فرآیند آماده‌سازی آن‌ها بستگی دارد [۴]. یکی از کاربردهای هیدروژل‌ها، استفاده از آن به عنوان پانسمان (زخم و سوختگی) می‌باشد. از آنجاکه محیط مرطوب روند درمان را تسریع می‌کند [۵]، هیدروژل‌ها گزینه مناسبی برای استفاده در پانسمان، به صورت فیلم یا بی‌شکل می‌باشند. هیدروژل‌هایی که به شکل فیلم تهیه می‌شوند از اتصالات عرضی قوی‌تر و استحکام بیشتری برخوردار بوده و به صورت مستقل بر روی زخم قرار می‌گیرند. با توجه به این‌که توانایی فراهم کردن محیط ضد باکتری، جلوگیری از محیط مرطوب در اطراف زخم، انتقال داروها به سطح پوست و همچنین اکسیژن‌رسانی به پوست برای کمک به بازسازی سلول‌ها و بافت‌ها، ممکن است تنها در یک نوع پانسمان زخم مشاهده نشود، لذا انواع مختلف پانسمان، برای کاربردهای مختلف ساخته شده‌اند [۶].

پانسمان‌های سوختگی به دودسته پانسمان‌های سنتی و مدرن تقسیم می‌شوند. پانسمان‌های سنتی معمولاً دارای یک‌لایه غیر چسبناک در ناحیه تماس با زخم به عنوان یک‌لایه جاذب در اطراف زخم می‌باشند [۷]. از جمله اشکالات مواد مرسوم ترمیم بافت پوستی نظیر گاز پانسمان، نفوذپذیری قوی آن‌ها می‌باشد که منجر به چسبندگی قوی مواد ترمیمی بر روی سطح زخم خشک‌شده و در نتیجه آسیب جدید در هنگام برداشتن پانسمان می‌شود. پانسمان زخم مدرن به منظور تسهیل عملکرد زخم توسعه یافته‌اند و بیشتر بر حفظ زخم از کم‌آبی و بهبود زخم متمرکز شده‌اند. پانسمان‌های مدرن به شکل فیلم، فوم، هیدروژل و هیدروکلوئید موجود می‌باشند. این پانسمان‌ها به عنوان یک مانع در مقابل نفوذ باکتری‌ها به محیط زخم عمل می‌کنند [۸، ۹، ۱۰].

پانسمان‌های هیدروژل، مواد آب‌دوست و نامحلول در آب با قابلیت جذب آب بالا هستند که از پلیمرهای مصنوعی مانند پلی وینیل پیرولیدین ساخته شده‌اند. هیدروژل‌ها را می‌توان به صورت ژل بی‌شکل و یا به شکل

نانوذرات و تشکیل شبکه مستحکم بوده است [۲۷]. همچنین در تحقیقی کاربرد فیلم‌های CNC در حمل طولانی مدت دارو مورد بررسی قرار گرفته و به‌طور کلی پایداری رهائش دارو را در طول دوره سه‌ماهه برای داروها نشان داد. در این تحقیق مکانیسم رهائش داروی ایندومتاسین از مدل تحت کنترل نفوذ پیروی کرده، درحالی‌که رهائش داروهای ایتراکانازول و بکلومتازون با حامل‌های CNF مشابه با داروی ایندومتاسین، سینتیک شبه درجه صفر را نشان داد [۱۴]. علیرغم این‌که نانوسولوز یک ماده زیستی منحصربه‌فرد با خواص مکانیکی و فیزیکی بالایی است، اما مطالعات کمی در مورد استفاده از نانوسولوزها در تهیه هیدروژل ترمیم سوختگی و بارگذاری و آزادسازی کنترل‌شده دارو صورت گرفته است. زیست-سازگاری توانایی یک ماده در پاسخ مناسب به میزبان در یک کاربرد خاص است. زیست‌سازگاری و عدم سمیت سلولی برای هیدروژل‌های مورد استفاده در زمینه پزشکی اهمیت ویژه دارد. پلیمرهای مورد استفاده به این منظور، می‌بایست در آزمون‌های سمیت سلولی تأیید شوند [۲۸]. لذا هدف از این مطالعه بررسی مکانیسم رهائش داروی نیترات نقره در فیلم هیدروژل زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه نانو سلولوز با قابلیت ترمیم سوختگی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نانوالیاف سلولزی (NFC)^۱ حاصل از فرآیند آسیاب کردن دیسکی با میانگین قطر الیاف ۳۸ نانومتر از شرکت Weidmann سوئیس تهیه گردید. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوالیاف سلولزی در شکل ۱ آمده است. هیدروکسی اتیل سلولز (HEC)^۲ با وزن مولکولی ۲۵۰ و گرانیوی ۸۰-۱۲۵ cm/s، پودر اسیدسیتریک (CA)^۳ به‌عنوان اتصال‌دهنده عرضی با وزن مولکولی ۱۹۲/۱۲ و خلوص ۹۹ درصد و همچنین ماده دارویی ضد عفونی‌کننده نیترات نقره با خلوص ۹۹/۸ درصد به‌صورت جامد برای بارگذاری در هیدروژل و ایجاد خاصیت ضد عفونی در پانسمان زخم از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شدند.

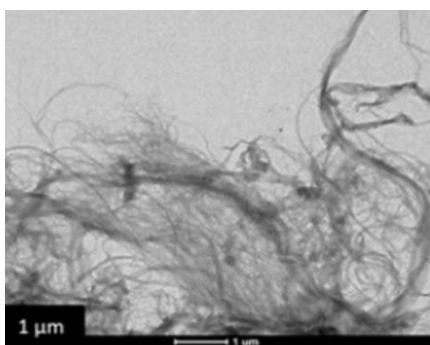
زخم برداشته شوند. امروزه بسیاری از محققین به طراحی و تولید مواد سلولزی برای مصارف پزشکی می‌پردازند [۱۸، ۱۹]. ارجحیت نانوسولوز نسبت به الیاف سلولزی، دارا بودن سطح تماس بیشتر و بالا بودن گروه‌های هیدروکسیل و اکشن‌پذیر و داشتن ساختار شبکه‌ای (مناسب برای بارگذاری دارو، جذب آب بیشتر و بهبود خواص مکانیکی) است [۱۸]. خواص فوق‌العاده فیزیکی و بیولوژیکی نانوسولوزها، به‌ویژه زیست سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری، پایداری، عدم سمیت، قابلیت دسترسی بالا و قیمت پایین مواد اولیه آن‌ها و خواص مکانیکی برجسته موجب جذابیت این مواد در مصارف پزشکی همچون ایمپلنت‌ها، داربست‌های مهندسی بافت، ساخت هیدروژل‌های مناسب در پانسمان زخم و ترمیم سوختگی، دارورسانی و کاربردهای قلبی - عروقی شده است [۲۰، ۲۱، ۲۲].

سلولز به‌عنوان یک کنترل‌کننده برای نرخ رهائش و غلظت دارو دارای سابقه طولانی بوده و سیستم‌های دارورسانی بررسی شده بر پایه نانوسولوز در سال‌های اخیر نتایج امیدوارکننده‌ای نشان داده‌اند. حامل‌های دارو بر پایه نانوسولوز، به سه صورت میکروسفرها، هیدروژل‌ها و غشاها (فیلم‌ها) با طیف گسترده‌ای از داروها بارگذاری و ارزیابی شده است [۲۳، ۲۴]. در سال‌های اخیر، سیستم‌های دارورسانی متعددی بر پایه مواد نانوسولوزی برای کاربردهای مختلف دارویی مورد استفاده قرار گرفته است. Trovatti و همکاران (۲۰۱۱)، غشای نانوسولوز باکتریایی را باهدف رهائش موضعی لیدوکائین مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که نرخ نفوذ لیدوکائین در غشای نانوسولوز باکتریایی نسبت به دو سیستم دیگر (ژل و محلول آب) به‌طور قابل توجهی پایین‌تر بود [۲۵]. همچنین تحقیقات نشان دادند که حامل‌های دارو به شکل جامد تشکیل شده از نانوسولوز، مولکول‌های دارو را به دام انداخته، سپس رهائش آن‌ها را تنظیم می‌کنند [۲۶]. مواد سلولزی می‌توانند داروها را بارگذاری کرده و در شرایط دمایی و یا pH سطح بدن یا در اثر فرآیند انتشار و غیره داروها را آزاد کنند. مطالعات انجام شده بر روی عملکرد هیدروژل‌ها به‌عنوان حامل داروی دوکسوروبیسین در شرایط آزمایشگاهی، رهائش طولانی‌مدت آن را با مکانیسم و سینتیک ویژه‌ای به نمایش گذاشت که ناشی از پراکندگی

¹ Nanofibrillated cellulose

² Hydroxyethyl Cellulose

³ Citric Acid



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوالیاف سلولزی

هیدروکسی اتیل سلولز با نسبت وزنی ۳ به ۱ و همچنین از اسیدسیتریک به عنوان اتصال دهنده عرضی با مقادیر ۱۰ و ۲۰ درصد وزنی نسبت به ماده زمینه پلیمری در ساخت هیدروژل با روش قالب گیری محلول استفاده شد. شکل ۲، تصویر ماکروسکوپی هیدروژل را با مقدار ۲۰ درصد وزنی سیتریک اسید در حالت خشک و مرطوب نشان می دهد.

تهیه هیدروژل با استفاده از اتصال دهنده عرضی سیتریک اسید

در این تحقیق، جهت تهیه هیدروژل مورد نیاز، از مقادیر بهینه و روش اجرایی بکار گرفته شده در پژوهش انجام شده توسط Motie و همکاران (۲۰۱۹) استفاده شد [۲۹]. بدین منظور از اختلاط نانوالیاف سلولزی و



ب



الف

شکل ۲- تصویر ماکروسکوپی هیدروژل با نسبت ۳ به ۱ از نانوسلولز به هیدروکسی اتیل سلولز و مقدار ۲۰٪ وزنی سیتریک اسید (الف) در حالت خشک و (ب) در حالت مرطوب

جذب دارو، نمونه ها در یک پتری دیش به مدت ۱۶ ساعت در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. هیدروژل بارگذاری شده به صورت خشک تا زمان استفاده در دسیکاتور نگهداری شد و مقداری داروی بارگذاری شده با توجه به غلظت محلول، قبل و بعد از بارگذاری تعیین شد.

رهایش دارو

برای تعیین رهایش دارو در آزمایشگاه (در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد) از ۲۰۰ ml محلول بافر فسفات سالین

بارگذاری دارو

ابتدا رطوبت هیدروژل با توجه به وزن خشک و تر آن که قبلاً ثبت شده بود، به دست آمد. سپس نمونه خشک شده در آون، در آب مقطر غوطه ور شده و با توزین مکرر هیدروژل اجازه داده شد که رطوبت آن به ۵۰٪ وزنی ظرفیت جذب رطوبت خود برسد [۳۰]. نمونه های هیدروژل، در محلول ۱۰٪ نیترات نقره با pH در حدود ۷/۴ در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بر روی یک همزن چرخشی با قابلیت کنترل دما و با سرعت چرخش ۲۰۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت بارگذاری شدند. پس از

آزادشده در زمان t از ضرب غلظت نمونه‌های آزمون رهایش در مقدار محلول رهایش $0/1$ نرمال PBS به دست آمد که M_t : مقدار تجمعی داروی آزادشده در زمان t می‌باشد. در نهایت با توجه به معادله ۲، نتیجه به صورت درصد تجمعی رهایش دارو (Z) به زمان بیان شد [۳۱].

$$Z = \frac{M_t}{M_{\infty}} \times 100 = \frac{V_r V_t + V_t \sum_{i=1}^{i=t-1} C_i}{M_{\infty}} \times 100 \quad (2)$$

M : مقدار تجمعی داروی آزادشده در زمان بی‌نهایت، M : مربوط به مقدار دارو در هیدروژل بعد از بارگذاری است. از معادله نیمه تجربی Rigner - Peppas (معادله ۳) برای مدل‌سازی داده‌های مربوط به آزادسازی استفاده شد [۳۲].

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = k^n \quad (3)$$

درصد لگاریتم تجمعی آزادسازی $[\log(M_t/M) \times 100]$ در محدوده ۵ تا ۶۰ درصد نسبت به لگاریتم زمان آزادسازی $[\log(t)]$ رسم شد. یک خط رگرسیون خطی به داده‌ها برازش داده شد و از شیب (n = توان انتشار) به عنوان شاخص برای مکانیسم آزادسازی استفاده شد. مکانیسم رهایش مقدار ضریب نمایی (n) در معادله نیمه تجربی $M_t/M = Kt^n$ توصیف می‌گردد. برای مقادیری از n که برابر با $0/45$ و $0/5$ در نمونه‌های استوانه‌ای و صفحه‌ای است؛ مکانیسم رهایش به‌عنوان نفوذ فیک^۲ تشریح می‌گردد. در این صورت کنترل رهایش دارو از طریق نفوذ صورت می‌گیرد.^۳ در حالی که مکانیسم رهایش با ضریب نمایی $0/89$ و 1 ، به ترتیب در نمونه‌های استوانه‌ای و صفحه‌ای، تحت تأثیر سیستم کنترل از طریق واکنشیدگی می‌باشد (جدول ۱).

(PBS) با pH برابر با $7/4$ به‌عنوان محیط رهایش استفاده شد. بدین منظور، هیدروژل بارگذاری شده از محلول بارگذاری خارج شده و به محیط آزادسازی PBS منتقل شد. از همزن چرخشی با سرعت چرخش 200 rpm استفاده شد و در زمان‌های مشخص، 1 ml از محیط آزادسازی برای اندازه‌گیری مقدار داروی موجود در آن نمونه برداری شد. برای ثابت نگه‌داشتن حجم محلول رهایش، به همان میزان که نمونه برداری در هر زمان انجام شد (1 ml)، محلول $0/1$ نرمال PBS به محیط رهایش اضافه شد. با استفاده از طیف‌سنجی مرئی/فرابنفش مقدار یون نقره موجود در محیط در هر زمان تعیین گردید. داده‌های استخراج شده از این دستگاه میزان جذب در طول موج معین را نشان می‌دهد. برای دستیابی به رابطه میان غلظت و میزان جذب، نیاز به یک منحنی کالیبراسیون می‌باشد؛ بنابراین میزان جذب در محلول‌هایی با غلظت معین دارو (در محدوده غلظت مورد استفاده در بارگذاری) توسط دستگاه اندازه‌گیری شد منحنی مقادیر مختلف جذب نسبت به غلظت‌های مشخص رسم شد. با برازش یک خط رگرسیون و به دست آوردن فرمول خط برازش داده شده، رابطه میان غلظت و میزان جذب تعیین شده و با عددگذاری میزان جذب در نمونه‌های آزمون رهایش، غلظت هر نمونه آزمونی به دست آمد. با توجه به اینکه جایگزین کردن مقدار نمونه آزمونی که در هر زمان از محلول خارج می‌شود با محلول PBS، موجب تغییر غلظت محیط رهایش می‌شود، غلظت تجمعی واقعی داروی آزادشده در هر زمان (C_{real}) با استفاده از معادله (۱) محاسبه می‌شود.

$$C_{real} = C_t + \frac{V_t}{V_r} \sum_{i=1}^{i=t-1} C_i \rightarrow C_{real} = V_r C_t + V_t \sum_{i=1}^{i=t-1} C_i \quad (1)$$

که C_t : غلظت تجمعی ظاهری داروی آزادشده در هر زمان، V_T : مقدار ماده نمونه برداری شده در هر زمان، V_r : مقدار کل محلول رهایش می‌باشند. مقدار تجمعی داروی

² Fickian diffusion

³ Diffusion-controlled drug release

⁴ Swelling-controlled system

¹ UV-vis spectrophotometer

جدول ۱- مکانیسم انتقال دارو

مکانیسم رهایش	ضریب نمایی	
	آزمونه صفحه‌ای	آزمونه استوانه‌ای
مدل رهایش هیگوجی: کنترل رهایش از طریق انتشار فیک صورت می‌گیرد.	n=۰/۵	n=۰/۴۵
ترکیب هر دو مدل انتشار و واکنشیدگی	۰/۵ < n > ۱	۰/۴۵ < n > ۰/۸۹
کنترل رهایش از طریق واکنشیدگی صورت می‌گیرد. رهایش دارو مستقل از زمان است.	n=۱	n=۰/۸۹

در هر خانه را به‌خوبی در ۱۰۰ میکرو لیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO) حل کرده و جذب نوری (OD)^۱ آن‌ها در ۲۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانشگر الیزا (ELISA Reader) خوانده شد. در نهایت برای بررسی درصد بقای سلول‌ها (P) در حضور هیدروژل از معادله ۴، استفاده شد:

$$P(\%) = \frac{OD_h}{OD_c} \times 100 \quad (4)$$

OD_h: میانگین جذب نوری خوانده‌شده برای نمونه در حضور هیدروژل، OD_c: میانگین جذب نوری خوانده‌شده برای نمونه کنترل می‌باشد.

نتایج و بحث

رهایش دارو

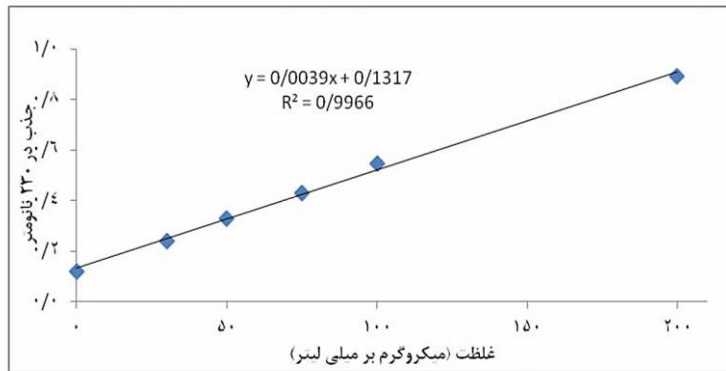
شکل ۳، منحنی کالیبراسیون جذب نیترات نقره را در PBS و در محدوده غلظت صفر تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی-لیتر در شش نقطه، نشان می‌دهد. میزان جذب نوری توسط نیترات نقره در ۲۳۰ نانومتر به‌وسیله طیف‌سنجی مرئی/فرابنفش اندازه‌گیری شده است.

بررسی زیست‌سازگاری و عدم سمیت هیدروژل

نهایی به روش MTT

برای بررسی زیست‌سازگاری و میزان عدم سمیت پلیمرها و نمونه‌های هیدروژل نهایی، مطابق استاندارد ISO 10993-1، ابتدا سلول‌های غیر سرطانی بافت جنینی موش سوئیسی (NIH-3T3) به تعداد ۱۰^۳ سلول به ازای هر خانه از پلیت ۹۶ خانه کشت‌شده و سه ساعت پس از اتصال سلول‌ها سوسپانسیون‌های تهیه‌شده از هرکدام از مواد NFC و HEC با غلظت به‌کاررفته در هیدروژل در محیط کشت مخلوط شده و روی سلول‌ها ریخته شد. دیسک‌های استریل شده با اشعه گاما با دوز ۲۲ کیلوگرمی، به قطر شش میلی‌متر در محیط‌های کشت به مدت ۱ و ۳ روز در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسید کربن قرار گرفتند. در روزهای ۱ و ۳ پس از خارج کردن محیط کشت سلول‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر محلول MTT (دی متیل تیازول-۲ و ۵ دی فنیل تترازولیوم برمید) به ازای هر خانه از پلیت ریخته و پس از ۳ ساعت انکوباسیون در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه و ۵٪ دی‌اکسید کربن قرار داده، بلورهای فورمازان تشکیل‌شده

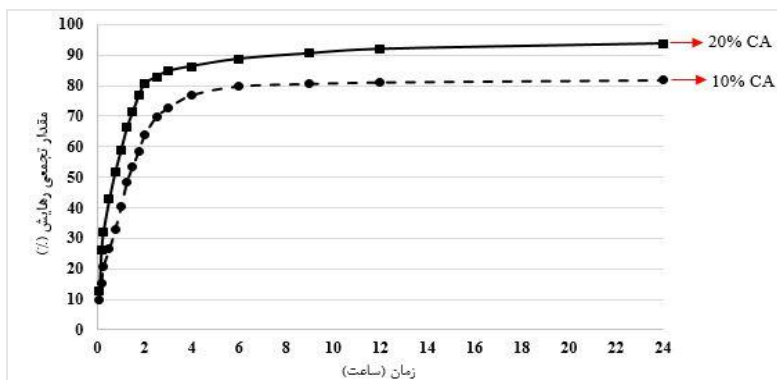
¹ Optic Density



شکل ۳ - منحنی کالیبراسیون جذب نیترات نقره در ۲۳۰ نانومتر نسبت به غلظت

کالیبراسیون می‌باشد [۳۳]. با استفاده از فرمول برازش، غلظت هر یک از محلول‌های نمونه‌برداری شده از محیط رهایش به دست آمد و درصد تجمعی رهایش دارو برای هر دو تیمار محاسبه شد. شکل ۴، منحنی تغییرات این مقادیر را نسبت به زمان‌های نمونه‌برداری نشان می‌دهد.

نتایج رهایش دارو نشان داد که رابطه خطی بین میزان جذب و غلظت داروی مربوطه وجود دارد. خط رگرسیون برازش داده‌شده، با فرمول $y = 0.0039x + 0.1317$ با میزان R^2 بیش از ۰/۹۹ به دست آمد. میزان بالای R^2 نشان‌دهنده برازش مناسب خط رگرسیون با منحنی



شکل ۴- درصد تجمعی رهایش داروی نیترات نقره از هیدروژل‌های مختلف نسبت به زمان

نقره دارد، در ۲ ساعت اول آزمون در حدود ۷۰ تا ۹۰ درصد گزارش شد. پس‌از آن دارو به‌صورت تدریجی از هیدروژل حاصل از HEC کاتیون دارشده آزاد شد [۳۴]. این شرایط رهایش دارو مناسب کاربرد هیدروژل‌ها به‌عنوان پانسمان سوختگی می‌باشد؛ زیرا این سیستم باعث افزایش سریع غلظت دارو در ناحیه سوختگی می‌شود تا سوختگی در ابتدای ترمیم به دوز موردنیاز دست پیدا کند و پس‌از آن رهایش کندتر به حفظ سطح دارو بر روی سوختگی کمک می‌کند [۳۵]. به‌طور کلی فناوری کنترل دارورسانی یکی از موضوعات مورد مطالعه در زمینه علوم دارویی است. هدف اصلی استفاده از این سیستم افزایش اثربخشی درمان دارویی است. مزایای این سیستم

تیمارها یک پروفایل رهایش نمایی را برای درصد تجمعی رهایش داروی نیترات نقره از هیدروژل‌های مختلف نسبت به زمان نشان دادند. در ۲ ساعت اولیه رهایش، درصد بالایی از خروج دارو مشاهده شد (از ۶۳/۸ درصد در تیمار دارای ۲۰٪ سیتریک اسید تا ۸۰/۵ درصد در تیمار دارای ۱۰٪ اسیدسیتریک) و پس‌از آن تا ۲۴ ساعت خروج دارو از هیدروژل‌ها به‌کندی انجام گرفت. رهایش کلی دارو در هیدروژل‌ها پس از ۲۴ ساعت از ۸۱/۸ درصد در تیمار دارای ۲۰٪ سیتریک اسید تا ۹۳/۷ درصد در تیمار دارای ۱۰٪ سیتریک اسید متغیر بود. در تحقیقی که توسط رودریگز و همکاران انجام شد، رهایش نسبتاً سریع داروی دیکلوفناک سدیم که حلالیتی مشابه نیترات

مکانیسم رهایش دارو استفاده شد. معمولاً از این مدل زمانی استفاده می‌شود که مکانیسم دقیق رهایش دارو نامشخص است و یا رهایش دارو در زمان‌های مختلف بیش از یک مکانیسم را در برمی‌گیرد [۳۶]. این مدل بیشتر برای مدل‌سازی رهایش مولکول‌های کوچک مانند بربرین از باکتریال سلولز استفاده شده است [۳۷]. جدول ۲، معادلات رگرسیون خطی که به منحنی لگاریتم درصد تجمع رهایش نسبی در برابر لگاریتم زمان برازش داده شده را به همراه ضریب رگرسیونی (R^2) که نشان‌دهنده میزان نزدیکی رگرسیون خطی به منحنی است نشان می‌دهد.

شامل افزایش فعالیت‌های درمانی، کاهش عوارض جانبی و درمان سریع‌تر می‌باشد. رهایش تدریجی دارو در فاز دوم آزمایش و رهایش نهایی ۸۱/۸ تا ۹۳/۷ درصد احتمالاً به دلیل واکنش شیمیایی میان گروه‌های هیدروکسیل نانوسلولز با بار مثبت یون نقره می‌باشد که حضور HEC با ایجاد فاصله میان زنجیرها سلولزی نانوسلولز و کاهش واکنش درون‌مولکولی هیدروکسیل‌های نانوسلولز شرایط افزایش پیوند میان دارو و ماده زمینه را فراهم می‌کند.

مطالعه و بررسی مکانیسم رهایش دارو

از مدل نیمه تجربی Ritger-Peppas برای بررسی

جدول ۲- معادلات خطی، ضرایب رگرسیون و ضرایب نمایی حاصل از مدل Ritger-Peppas در هیدروژل‌ها

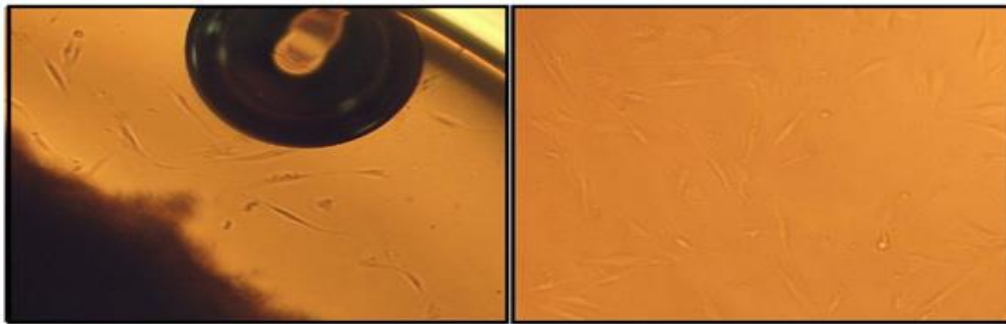
تیمار	معادله	ضریب‌انتشار (n)	ضریب رگرسیون (R^2)
10% CA	$y = 0.5395x + 1.7899$	۰/۵۳۹۵	۰/۹۹۹۲
20% CA	$y = 0.5253x + 1.6911$	۰/۵۱۷۶	۰/۹۹۶۱

مرطوب با رطوبت حدود ۷۰٪، امکان واکنشیدگی هیدروژل در تماس با ترشحات زخم کم است و نتایج مدل‌سازی رهایش نیز سهم کمی را به مکانیسم رهایش کنترل شده از طریق واکنشیدگی اختصاص داده و مکانیسم غالب رهایش را نفوذ فیک معرفی کرد.

زیست‌سازگاری

نتایج آزمون MTT در روز ۱ و ۳، درصد زیست‌پذیری سلول‌های غیر سرطانی بافت جنینی موش سوئسی NIH-3T3 در حضور هیدروژل را به ترتیب ۹۳/۷+۸/۳ درصد و ۸۶/۹+۵/۷ درصد نشان داد. بعلاوه میزان درصد زیست‌پذیری سلول‌ها در سوسپانسیون به ترتیب در روز ۱ و ۳ برای سوسپانسیون حاوی NFC برابر ۱۰۵/۶+۴/۱ درصد و برای HEC ۹۸/۱+۶/۷ درصد و برای HEC ۹۰/۳+۵/۲ درصد و ۵+۸۲/۸ درصد به دست آمد. شکل ۵، تصاویر میکروسکوپ نوری از سلول‌های کشت شده روی پلیت بدون حضور هیدروژل و در حضور هیدروژل را نشان می‌دهد.

در مطالعه و بررسی مکانیسم رهایش دارو، ضرایب رگرسیون ۰/۹۹ در این مطالعه تأیید می‌کنند که خط مناسبی به هریک از منحنی‌ها، برازش داده شده و مدل Ritger-Peppas با نتایج مطالعه هماهنگی دارد. در این تحقیق، ضرایب نمایی (n) که از شیب رگرسیون خطی به دست آمده است؛ در هیدروژل‌های صفحه‌ای تهیه شده از دو نوع میزان مختلف اتصال‌دهنده‌های عرضی مقادیر مشابهی را در بازه ۰/۵۱ و ۰/۵۳ در برمی‌گیرند. بر این اساس، سینتیک رهایش، هر دو فرایند نفوذ و واکنشیدگی را شامل می‌شود. با توجه به این که مقادیر n به محدوده مربوط به انتشار ($n = 0.5$) نزدیک‌تر است، مکانیسم غالب در این مطالعه رهایش، نفوذ می‌باشد. از آنجاکه گرادیان غلظت، نیروی محرکه در انتشار دارو است؛ اختلاف غلظت بین محیط اطراف و هیدروژل، احتمالاً مسئول هدایت رهایش دارو است [۳۸]؛ بنابراین مدل‌سازی رهایش دارو از هیدروژل که با استفاده از معادله نیمه تجربی Ritger-Peppas انجام شد؛ نشان داد که خروج دارو متأثر از دو عامل انتشار فیک (مدل هیگچی) و واکنشیدگی می‌باشد. با توجه به استفاده از پانسمان هیدروژل به صورت نیمه



شکل ۵- تصاویر میکروسکوپ نوری از سلول‌های کشت‌شده روی پلیت: راست) بدون حضور هیدروژل و چپ) در حضور هیدروژل

هیدروژل‌ها به‌عنوان پانسمان سوختگی می‌باشد؛ زیرا این سیستم باعث افزایش سریع غلظت دارو در ناحیه سوختگی می‌شود تا سوختگی در ابتدای ترمیم به دوز موردنیاز دست پیدا کند و پس‌از آن رهایش کندتر به حفظ سطح دارو بر روی سوختگی کمک می‌کند. به‌این‌ترتیب استفاده از پانسمان سوختگی در دارورسانی و رهایش تدریجی دارو موجب کاهش دوز مصرفی دارو و درنتیجه کاهش عوارض جانبی آن شده و از نیاز به تعویض سریع و مکرر پانسمان خودداری می‌شود. نتایج مدل‌سازی رهایش با استفاده از معادله نیمه تجربی Ritger-Peppas، سهم کمی را به مکانیسم رهایش کنترل‌شده از طریق واکنشیدگی اختصاص داده و مکانیسم غالب رهایش را نفوذ فیک معرفی کرد. نتایج آزمون MTT، حاکی از عدم سمیت سلولی هیدروژل‌های بر پایه مواد زیست‌سازگار بود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشگاه تهران به خاطر حمایت مالی از انجام این پژوهش تقدیر و تشکر می‌نمایند.

نتایج آزمون MTT، زیست‌سازگاری هیدروژل‌ها را تأیید می‌کند. تشابه کامل مورفولوژی سلول‌ها در حضور هیدروژل و سلول‌های کشت‌شده روی پلیت بدون حضور هیدروژل نیز عدم سمیت هیدروژل را تأیید می‌کند. بررسی میزان زیست‌سازگاری هیدروژل‌هایی که در تهیه پانسمان زخم به کار می‌روند، بسیار حائز اهمیت است. از آزمون MTT برای ارزیابی زیست‌سازگاری و عدم سمیت سلولی استفاده شد و نتایج آزمایش، حاکی از عدم سمیت سلولی هیدروژل‌های بر پایه مواد زیست‌سازگار بود.

نتیجه‌گیری

جهت ایجاد ویژگی ترمیم سوختگی در پانسمان، هیدروژل‌ها با داروی ضدعفونی‌کننده نیترات نقره بارگذاری شدند. با توجه به نتایج تحقیق، رهایش دارو نشان داد که رابطه خطی بین میزان جذب و غلظت داروی مربوطه وجود دارد. در هیدروژل‌های بارگذاری شده توسط داروی ضدعفونی‌کننده نیترات نقره، رهایش دارو در ۲ ساعت اول، بسیار سریع بوده و پس‌از آن رهایش کندتر شده و تا ۲۴ ساعت خروج دارو به‌صورت تدریجی انجام‌شده است. این شرایط رهایش دارو، مناسب کاربرد

منابع

- [1] Gibs, I. and Janik, H. 2010. Review: synthetic polymer hydrogels for biomedical applications. Chemistry and Chemical Technology. 4:4.297-304.
- [2] Sood, A., Granick, M.S. and Tomaselli, N.L. 2014. Wound dressings and comparative effectiveness data. Advances in wound care. 3:8.511-529.
- [3] Morkhande, V.K., Pentewar, R.S., Gapat, S.V., Sayyad, S.R., Amol, B.D., Sachin, B. and Sandip K. 2016. A Review on Hydrogel. Pharmacy Research 6: 4678-4689.

- [4] Ganji, F. and Vasheghani-Farahani E. 2009. Hydrogels in Controlled Drug Delivery Sys tems. Iran Polymer Journal. 18: 63-88.
- [5] Winter, G.D. 1962. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig, Nature. 193:4812. 293-294.
- [6] Naves, L.B., Almedia, L. 2015. Wound Healing Dressing and Some Composites Such as Zeolite, TiO₂, Chitosan and PLGA: A Review. International Journal of Materials and Metallurgical Engineering. 9:3. 242-246.
- [7] Dhivyaa, S., Padmab, V.V. and Santhina, E. 2015. Wound dressing- a review. BioMedicine. 5:4.24-28.
- [8] Hunt, T.K., Hopf, H. and Hussain, Z. 2000. Physiology of wound healing. Advances in skin & wound care. 13: 6-11.
- [9] Rivera, A.E. and Spencer, J.M. 2007. Clinical aspects of full-thickness wound healing. Clinics in dermatology. 25:1. 39-48.
- [10] Strecker-McGraw, MK., Jones, T.R. and Baer, D.G. 2007. Soft tissue wounds and principles of healing. Emergency Medicine Clinics North American. 25:1. 1-22.
- [11] Debra, J.B. and Cheri, O. 1998. Wound healing: Technological innovations and market overview. Technology Catalysts International Corporation, 2: 1-185.
- [12] Kamoun, E.A., Kenawy, E.S. and Chen, X. 2017. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. Journal of Advanced Research. 8: 217-233.
- [13] Morgan, DA. 1999. Wound management products in the drug tariff. Pharmaceutical journal. 263: 820-825.
- [14] Liu, J., Willf?r, S. and Xu, C. 2015. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. Bioact Carbohydr Diet Fibre, 5(1):31-61.
- [15] Zhao, W., Jin, X., Cong, Y., Liu, Y. and Fu, J. 2013. Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 88:3.327-39.
- [16] Robinson, J.R. and Lee, V.H.L. 1987. Controlled drug delivery: Fundamentals and applications. 2nd edition. New York: Marcel Dekker.
- [17] Lee, J.W. and Park R.J.H. 2000. Bioadhesive-based dosage forms: The next generation. Journal of Pharmaceutical Sciences. 89:7.850-866.
- [18] Lu, T., Li, Q., Chen, W. and Yu, H. 2014. Composite aerogels based on dialdehyde nanocellulose and collagen for potential applications as wound dressing and tissue engineering scaffold, Composites Science and Technology. 94: 132-138.
- [19] Martson, M., Viljanto, J., Hurme, T., Laippala, P., and Saukko, P. 1999. Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material? An in vivo subcutaneous study in the rat, Biomaterials. 20:21.1989-1995.
- [20] Babu, R., O'Connor, K. and Seeram, R. 2013. Current progress on bio-based polymers and their future trends. Progress in Biomaterials. 2: 1. 8.
- [21] Sannino, A., Demitri, Ch., and Madaghiele, M. 2009. Biodegradable cellulose-based hydrogels: design and applications. Materials. 2: 353-373.
- [22] Sell, S.A., Wolfe, P.S., Garg, K., McCool, J.M., Rodriguez, I.A., and Bowlin, G. L. 2010. The use of natural polymers in tissue engineering: a focus on electrospun extracellular matrix analogues. Polymers. 2: 522-553.

- [23] Kolakovic, R., Peltonen, L., Laukkanen, A., Hirvonen, J. and Laaksonen, T. 2012. Nanofibrillar cellulose films for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82(2):308-3015.
- [24] Mihranyan, A. and Andersson, S.B. 2004. Sorption of nicotine to cellulose powders. *European Journal Pharmaceutical Sciences*, 22(4):279-86.
- [25] Trovatti, E., Silva, N.H., Duarte, I.F., Rosado, C.F., Almeida, I.F. and Costa, P. 2011. Biocellulose membranes as supports for dermal release of lidocaine. *Biomacromolecules*, 12(11):4162-8.
- [26] Dash, R. and Ragauskas, A.J. 2012. Synthesis of a novel cellulose nanowhisiker-based drug delivery system. *RSC Adv*, 2(8):3403-3409.
- [27] Lin, N. and Dufresne, A. 2013. Supramolecular hydrogels from in situ host-guest inclusion between chemically modified cellulose nanocrystals and cyclodextrin. *Biomacromolecules*, 14(3):871-880.
- [28] Shetye, S.P., Godbole, A., Bhilegaokar, Sh., and Gajare, P. 2015. Hydrogels: Introduction, Preparation, Characterization and Applications. *International Journal of Research Methodology*. 1:47-71.
- [29] Motie, N., Jonoobi, M., Faezipour M.M., Mahboobian, M.M. and Borzacchiello A. 2019. Nanocellulose based biohydrogel preparation and characterization of some Properties. *Iranian Journal of Wood and Paper Industries*. 9:4.497-509.
- [30] Trovattia, E., Freire, C. S.R., Pinto, P. C., Almeida, I. F., Costa, P., Silvestre, A. J.D., Neto, C. P., and Rosadob, C. 2012. Bacterial cellulose membranes applied in topical and transdermal delivery of lidocaine hydrochloride and ibuprofen: In vitro diffusion studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 435: 83- 87.
- [31] Qi, X., Li, J., Wei, W., Zuo, G., Su, T., Pan, X., Zhang, J., and Dong, W. 2017. Cationic Salecan-based hydrogels for release of 5- fluorouracil, *RSC Advances*. 7: 14337-14347.
- [32] Ritger, Ph.L. and Peppas, N.A. 1987. A simple equation for description of solute release II. Fickian and Anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*. 5: 37-42.
- [33] Behnia, N. and Pirouzfard, V. 2018. Effect of operating pressure and pyrolysis conditions on the performance of carbon membranes for CO₂/CH₄ and O₂/N₂ separation derived from polybenzimidazole/Matrimid and UIP-S precursor blends. *Polymer Bulletin*. 75: 10. 4341-4358.
- [34] Rodriguez, R., Alvarez-Lorenzo, C. and Concheiro, A. 2003. Cationic cellulose hydrogels: kinetics of the cross-linking process and characterization as pH-/ ion-sensitive drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 86: 253-265.
- [35] Wilhelms, T.A., Schulze, D., Alupeil, C., I, Rohrer, C., Abel, M., Wiegand, C. and Hipler, U.C. 2007. Release of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) from a hydroballanced cellulose wound dressing with PHMB. 17th Conference of the European Wound Management Association Glasgow/UK.
- [36] Korsmeyer, R.W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P. and Peppas, N.A. 1983. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 15: 25-35.
- [37] Huang, L., Chen, X., Nguyen, T.X., Tang, H., Zhang, L. and Yang, G. 2013. Nanocellulose 3D-networks as controlled-release drug carriers. *Journal of Materials Chemistry B*. 1. 23: 2976- 2984.
- [38] Amin, M.C.I.M., Ahmad, N., Halib, N. and Ahmad, I. 2012. Synthesis and characterization of thermo- and pH-responsive bacterial cellulose/acrylic acid hydrogels for drug delivery. *Carbohydrate Polymers*. 88:465-473.

Investigation of releasing mechanism of silver nitrate in the nanocellulose based hydrogel pad for burn healing

Abstract

One application of hydrogels is to use them as dressings (wounds and burns). Biocompatibility and cytotoxicity are of particular significance for hydrogels used in the medical field. Cellulosic materials can load and relief drugs at temperatures or pH levels of the body as a result of contrary processes such as diffusion. The aim of this study was to investigate the mechanism of release of silver nitrate in nano-cellulose-based biodegradable hydrogel film for burn repair. To prepare a hydrogel in the form of film, cellulose nanofibers and hydroxyethyl cellulose were used with the weight ratio (3:1), and also, the citric acid was used as a crosslinker in different amounts of 10 and 20 wt% matrix. Later on, the loading silver nitrate as a disinfectant drug into selected hydrogels was performed. Drug release results illustrated that there was a direct relationship between absorption rate and drug concentration. In the initial times of the testing, 70 to 90% of the drug release was detected and then for 24 h, the drug was gradually released from the hydrogel. Investigation of modeling drug-releasing selected kinetic diffusion as the dominant mechanism in drug delivery. MTT non-toxicity test displayed high efficacy of nanocellulose cationization and confirmed the non-toxicity of biocompatible hydrogels. It can be concluded that biodegradable nanocellulose based hydrogel containing silver nitrate can be used as an appropriate and relevant product for burn repair.

Keywords: Hydrogel, Burning dressing, Nanocellulose, Silver nitrate.

M. Jonoobi^{1*}
P. Moradpour^{2*}
A.A Tofangchi Kalle basti³

¹ Associate Prof., Department of Wood and paper science & technology, Faculty of Natural resources, University of Tehran, Karaj, Iran

² Assistant Prof., Department of wood and paper science and technology, Faculty of natural resources, University of Tehran, Karaj, Iran

³ M.Sc. Department of wood and paper science and technology, Faculty of natural resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Corresponding author:
mehdi.jonoobi@ut.ac.ir
pmoradpour@ut.ac.ir

Received: 2020/01/03
Accepted: 2020/04/12