

ساخت و ارزیابی فیلم نانوهیدروژل پلی‌وینیل الکل / هیالورونیک اسید / اکسید روی به‌عنوان زخم‌پوش

ملاحظه‌ی خاطری رودبرده
دکتر ناهید حسن‌زاده نعمتی

گروه مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی علوم و فناوری‌های پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسئول:
دکتر ناهید حسن‌زاده نعمتی

بزرگراه شهید ستاری، میدان دانشگاه، بلوار شهدای حصارک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات
پست الکترونیک:
nahid_hasanzadeh@yahoo.com

تعارض منافع: اعلام نشده است.

زمینه و هدف: آسیب‌های پوستی می‌تواند عملکرد حیاتی آن را که محافظت از انسان‌ها در برابر عوامل بیماری‌زا می‌باشد، دچار اختلال کند لذا تولید یک زخم‌پوش مناسب برای ترمیم پوست همواره از چالش‌های محققین است. هدف از این مطالعه تولید یک فیلم هیدروژلی برای کاربرد به‌عنوان زخم‌پوش بود.

روش اجرا: در تحقیق حاضر فیلمی هیدروژلی از جنس پلی‌وینیل الکل/هیالورونیک اسید/نانو اکسید روی به‌منظور کاربرد به‌عنوان زخم‌پوش ساخته شد. برای این منظور سه فیلم با درصد‌های متفاوت از ترکیبات ذکرشده با استفاده از روش ریخته‌گری حلال تهیه گردید. نمونه‌های سنتز شده با استفاده از آزمون‌های SEM، FTIR، XRD، MTT و آزمون کشش ارزیابی شدند.

یافته‌ها: بررسی مورفولوژی نمونه‌ها نشان داد که افزایش نانوذرات اکسید روی منجر به ایجاد تخلخل و رشد اندازه آن‌ها در فیلم‌ها شد. همچنین مشخص گردید که درصد ازدیاد طول فیلم‌ها با افزایش نانو ذرات اکسید روی و هیالورونیک اسید افزایش یافته است. میزان درصد ازدیاد طول به‌ترتیب برای کمترین مقدار نانو اکسید روی تا بیشترین (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد وزنی) به‌ترتیب برابر با ۱۵۹٪، ۱۶۶٪ و ۲۳۰٪ بود. مطالعه MTT حاکی از زنده‌مانی سلولی بالای ۸۰٪ بر هر سه فیلم بود.

نتیجه‌گیری: فیلم حاوی ۱۵٪ اکسید روی می‌تواند گزینه‌ی مناسبی برای کاربرد در ساخت زخم‌پوش‌ها و مهندسی بافت پوست باشد.

کلیدواژه‌ها: اکسید روی، پلی‌وینیل الکل، ریخته‌گری حلال، هیالورونیک اسید، ترمیم پوست

دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۹/۰۹ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۱۰/۳۰

پوست و زیبایی؛ زمستان ۱۳۹۹، دوره‌ی ۱۱ (۴): ۲۶۷-۲۵۶

مقدمه

زخم‌هایی که زمان ترمیم، بیشتر از ۱۲ هفته به طول بینجامد را زخم مزمن می‌گویند^۱. انتخاب پانسمان مناسب با توجه به نوع زخم یکی از پارامترهای کلیدی و مهم در مدیریت ترمیم زخم است. پانسمان‌ها به دو دسته سنتی و مدرن تقسیم‌بندی می‌شوند. پانسمان‌های سنتی عبارتند از گاز، گاز وازلین و پنبه^۲. پانسمان‌های مدرن نیز شامل هیدروکلوئیدها، فوم‌ها، آلژینات‌ها و هیدروژل‌ها می‌باشد^۳. پانسمان‌های هیدروژلی قابلیت جذب بالایی

آسیب‌های پوستی از قبیل سوختگی، بریدگی، زخم‌های مزمن و تومورها می‌تواند مشکلات عمده‌ای را در روند طبیعی فیزیولوژیکی بدن ایجاد نمایند^۱ چراکه عملکرد حیاتی پوست محافظت از انسان‌ها در برابر عوامل بیماری‌زا است^۲. طبق تعریف انجمن ترمیم زخم، می‌توان زخم را «تخریب ساختمان آناتومیکی و عملکردی پوست» بیان و آن را به دو گروه زخم‌های مزمن و حاد تقسیم کرد. زخم‌هایی که سطحی هستند و در مدت ۱۲-۸ هفته بهبود می‌یابند را زخم حاد و

مطالعات پیشین نشان می‌دهد که زخم‌های به‌وجودآمده در اثر سوختگی در حضور روی بهبود می‌یابند و ضدرادیکال‌های آزاد اکسیژنی می‌باشد.^{۱۷}

Imaan و همکاران داربستی بر پایه‌ی پلی‌وینیل الکل و نانواکسید روی ساختند. نتایج مطالعه ایشان نشان داد که حضور نانواکسید روی موجب افزایش جذب آب (۱۰۵-۸۵ درصد) و کاهش جذب متانول (۲۰-۱۷ درصد) می‌شود.^{۱۸}

Mirhosseini و همکاران فیلم نانوکامپوزیت کیتوسان/اکسید روی را به روش سل ژل ساختند. اثر ضد میکروبی این نانوکامپوزیت بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس آرتوس ارزیابی شد و خاصیت آنتی‌باکتریال مورد تأیید قرار گرفت.^{۱۳} هم‌چنین Soubhagya و همکاران اثر افزودن اکسید روی به فیلم‌های کیتوسان/پکتین را بررسی کردند. ایشان متوجه ظهور خاصیت آنتی‌باکتریال بالاتر در فیلم‌های حاوی اکسید روی نسبت به نمونه‌های عاری از آن شدند. ایشان نشان دادند که نانوذرات ZnO زمانی که با اتصال به باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌تواند به دیواره سلول آسیب برساند و عملکرد DNA را مختل کرده و در نهایت میکروارگانیسم‌ها را به دلیل فعالیت فوتوکاتالیستی و تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر از بین ببرد.^{۱۹}

Wu و همکاران هیدروژل کامپوزیتی هیالورونیک اسید/پلی‌وینیل‌الکل/کلاژن را ساختند. نمونه با درصدهای ۰/۰۵ درصد هیالورونیک اسید ۱۵ درصد و پلی‌وینیل‌الکل ۱ درصد کلاژن بیشترین میزان درصد ازدیاد طول (۵۳۲ درصد) و بهترین مدول یانگ (۶۲/۱ Mpa) را داشتند.^{۲۰}

هیالورونیک اسید، پلی‌وینیل‌الکل و نانوذرات اکسید روی به‌صورت ترکیبات دو تایی از هم یا همراه با اجزای دیگر در پوشش‌های زخم کاربرد مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که در بالا به مواردی از این مطالعات اشاره شد. اما استفاده هم‌زمان از سه جز اشاره شده در

از ترشحات را دارند. این پانسمان‌ها برای هر دو نوع زخم (مزمن و حاد) کاربرد دارند.^۶ استفاده از زخم‌پوش‌های مدرن به دلیل داشتن خواص منحصربه‌فردی از قبیل تسریع روند درمان و ایجاد یک محیط ایزوله بسیار مورد توجه قرار گرفته‌است.^۷

پلی‌وینیل‌الکل (Polyvinyl Alcohol [PVA]) که در سال ۱۹۳۲ توسط Herman ساخته شد،^۸ یک پلی‌هیدروکسی محلول در آب است. غیرسمی بودن، زیست‌تخریب‌پذیری با قابلیت تولید فیلم با خواص مکانیکی مناسب^{۹،۱۰} از جمله خواص منحصربه‌فرد پلی‌وینیل‌الکل است.

اسید هیالورونیک (Hyaluronic Acid [HA]) در بافت‌های انسانی از قبیل مایع سینوویال، غضروف و غشاء میانی پوست یافت می‌شود. اسید هیالورونیک در انتقال سیگنال‌های سلولی در مواردی مانند سرطان، التهاب و ترمیم زخم نقش بسزایی دارد.^{۱۱} اسید هیالورونیک ویژگی‌هایی از قبیل توانایی جذب آب بسیار، حامل بودن فاکتورهای رشد و سهولت اتصال به گیرنده‌ی متناسب سطح سلول دارد.^{۱۲}

نانو ذرات اکسید روی (Zinc Oxide [ZnO]) یکی از ترکیباتی است که توسط سازمان دارو و غذای آمریکا (FDA) به‌عنوان یک ماده ضد عفونی‌کننده برای کنترل میکروارگانیسم‌ها، تأیید شده است.^{۱۳} از ویژگی‌های مهم اکسید روی می‌توان به سمیت پایین، قابلیت تجزیه‌ی زیستی، ضد عفونی‌کنندگی^{۱۴} و آنتی‌باکتریالی آن اشاره کرد. از این رو و هم‌چنین با توجه به اثرگذاری نانوذرات اکسید روی در تکثیر فیبروبلاست‌ها، رگ‌زایی و ترمیم سریع‌تر زخم‌ها، کاربرد آن‌ها در ساخت پانسمان‌ها مرسوم شده است. اثربخشی ضد باکتریایی نانوذرات ZnO مربوط به انتشار یون‌های Zn²⁺ از آن است که می‌تواند منجر به اختلال در سیستم آنزیمی شود.^{۱۵} مواد مذکور در محدوده pH طبیعی (pH=۷) و در شرایط عدم حضور نور تأثیرگذار بر سنتز ویتامین E و C می‌باشند.^{۱۶}

ایکس (XRD) مدل PW1730 استفاده شد. طول موج اشعه ی ایکس ۵۴/۱ آنگستروم، آند مس و فیلتر نیکل بود. زمان توقف در هر گام ۱ ثانیه، اندازه ی گام ۰/۲۰ درجه و محدوده ی روبش (۲) بین ۸۰-۱۰ درجه انتخاب گردید.

ارزیابی خواص مکانیکی فیلم‌ها توسط دستگاه تست استحکام مدل SMT-20، انجام گرفت. فیلم‌ها طبق استاندارد ISO 6824 به ابعاد $60 \times 10 \text{ m}^2$ بر روی قاب کاغذی چسبانده شدند^{۲۱} و تحت آزمون استحکام کششی قرار گرفتند. قاب کاغذی بین دو فک دستگاه کشش با فاصله ی ۳ سانتی‌متر و با نیروی اعمالی ۱۰ نیوتن، سرعت کشش ۱۰ میلی‌متر بر دقیقه، رطوبت ۳۰٪ و دمای 23 ± 2 درجه ی سانتی‌گراد قرار گرفت.

برای بررسی میزان تورم و جذب از آزمون جذب آب استفاده شد. در این آزمون ابتدا نمونه‌ها وزن شده (وزن خشک)، پس از غوطه‌وری در محلول نمک بافر فسفاتی (PBS)، مجدداً وزن آن‌ها (وزن تر) اندازه‌گیری می‌شود و از معادله ی ۱ میزان جذب آب یا نرخ تورم (SW) به دست خواهد آمد:

$$\%SW = [(W-W_0)/W_0] \times 100 \quad (1)$$

که در اینجا W_0 وزن خشک و W وزن فیلم در حالت تر می‌باشد.

به منظور بررسی میزان پایداری و اندازه‌گیری سرعت تخریب در محیط برون‌تن از آزمون زیست‌تخریب‌پذیری هیدرولیتیکی استفاده شد. در این آزمون ابتدا ترکیب وزن شد (وزن خشک) و به مدت ۱۴ روز در نمک بافر فسفاتی (PBS) قرار گرفت. در پایان هر ۲۴ ساعت وزن خشک نمونه اندازه‌گیری شد. درصد زیست‌تخریب‌پذیری (WL) نمونه‌ها با استفاده از معادله ی ۲ به دست آمد:

$$\%WL = [(W_i - W_f)/W_i] \times 100 \quad (2)$$

که در اینجا W_i وزن خشک و W_f وزن خشک نمونه بعد از تخریب شدن می‌باشد.

قالب یک فیلم به عنوان پوشش زخم تا کنون مورد بررسی قرار نگرفته است. هدف از مطالعه حاضر ساخت فیلم هیدر وژلی با استفاده از روش ریخته‌گری حلال از ترکیب سه تایی پلی وینیل الکل/هیالورونیک اسید/نانو اکسید روی است. آزمون‌های لازم برای امکان‌سنجی کارآیی فیلم مذکور برای کاربرد به عنوان زخم پوش انجام شد. انتظار می‌رود ترکیب مذکور قابلیت‌های مورد نیاز را برای کاربردهای پوستی و ترمیم زخم داشته باشد.

روش اجرا

مشخصه ی مواد اولیه و ساخت

هر سه ماده ی هیالورونیک اسید $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$ ، پلی وینیل الکل (۹۸۰۰۰-۸۹۰۰۰ g/mol) و نانو اکسید روی تولیدی شرکت سیگما آلد ریچ بودند. سه فیلم با نسبت‌های مختلف طبق جدول ۱ با استفاده از روش ریخته‌گری حلال تهیه شدند. مقدار ZnO استفاده شده باید برای باکتری سمی ولی برای سلول انسان سمی نباشد^{۱۵} لذا انتخاب درصدهای متفاوت ZnO با توجه به کار تحقیقاتی Soubhagya و همکارانش^{۱۹} انجام شد. مواد درون پتری‌دیش ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در آن قرار داده شدند تا حلال کاملاً تبخیر و نمونه‌ها خشک شوند.

برای مشخصه‌یابی نمونه‌های ساخته شده از طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) مدل (SRG 1100G) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل AIS2100 استفاده گردید.

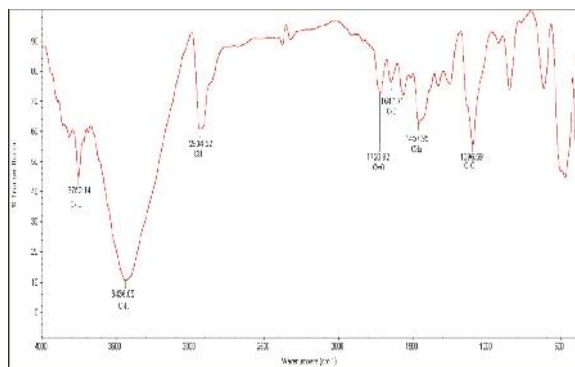
برای مطالعه ی ساختار کریستالی و بررسی ترکیب فازی نمونه‌ها، از آنالیز پراش تفرقی اشعه ی

جدول ۱: کدگذاری فیلم‌ها

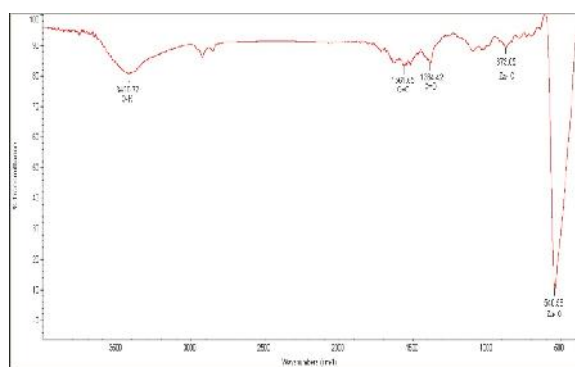
کد نمونه	ترکیبات (درصد وزنی)
A	85% PVA-10% HA-5% ZnO
B	70% PVA-20% HA-10% ZnO
C	55% PVA-30% HA-15% ZnO

یافته‌ها

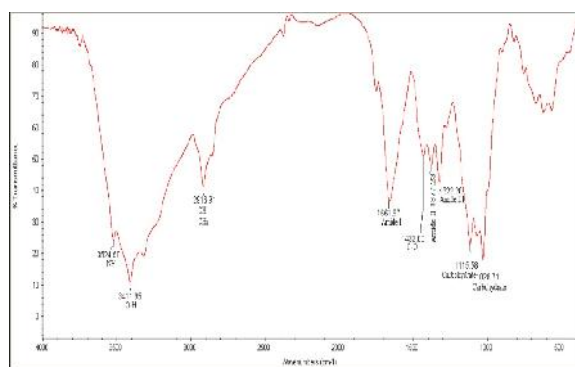
شکل ۱، طیف FTIR پلی‌وینیل الکل، هیالورونیک اسید و نانو اکسید روی خالص را نشان می‌دهد. در شکل ۲ نیز طیف FTIR مربوط به ساختارهای ترکیبی برای درک تعامل احتمالی بین نانوذرات ZnO و ماتریس هیدروژل PVA-HA آمده است.



A



B



C

شکل ۱: طیف FTIR از (A) پلی وینیل الکل، (B) اکسید روی، (C) هیالورونیک اسید

یکی از بهترین روش‌های غیرمستقیم موجود برای تعیین ازدیاد سلول‌ها آزمون دی متیل تیازل دی فنیل تترازولیوم بروماید (MTT, Sigma, USA) است که بر پایه‌ی تغییر پودر زردرنگ تترازولیوم به کریستال‌های نامحلول بنفش مایل به سیاه فورمازان است که در پژوهش حاضر نیز استفاده شد. این پدیده تنها در سلول‌های زنده و با استفاده از آنزیم موجود در میتوکندری آن‌ها به نام سوکسینات دهیدروژناز اتفاق می‌افتد. کریستال‌های فورمازان با استفاده از حلال آلی مثل ایزوپروپانول قابل حل گردید و چگالی نور (OD) حاصل از آن با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (STAT FAX 2100, USA) خوانده شد. میزان چگالی نوری نسبت مستقیم با غلظت فورمازان داشته که آن هم متناسب با فعالیت متابولیکی سلول‌های زنده است. به همین منظور بررسی سمیت نمونه‌ها و تأثیر آن‌ها بر رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست (L929) تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، فرآیند عصاره‌گیری براساس استاندارد ایزو ۵-۱۰۹۹۳ انجام شد که طی آن به هر نمونه استریل به‌ازای هر ۳ سانتی‌متر مربع سطح، مقدار یک میلی‌لیتر محیط کشت (DMEM) اضافه گردید. سپس بعد از گذشت ۷ روز محیط خارج و به سلول‌ها افزوده شد. چاهک دارای سلول‌های بیشتر چگالی نوری بالاتری نسبت به چاهک با سلول کمتر نشان می‌دهد بنابراین می‌توان از رابطه‌ی زیر چاهک دارای مقدار سلول بیشتر را مشخص کرد و با نمونه‌ی کنترل مقایسه نمود:

معادله‌ی ۳:

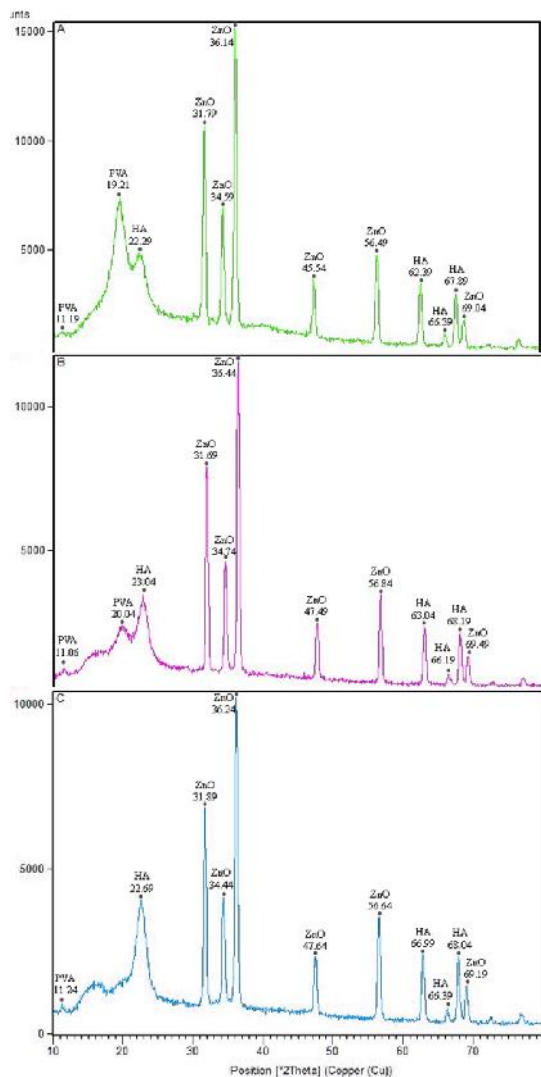
$$\text{Toxicity \%} = \left(1 - \frac{\text{mean OD of sample}}{\text{mean OD of control}}\right) \times 100$$

معادله‌ی ۴: % Viability = 100 - % Toxicity

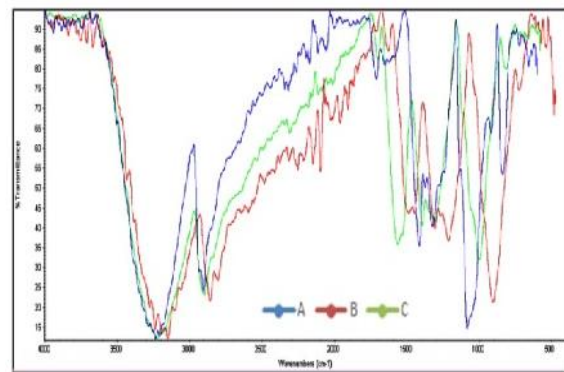
با استفاده از معادله‌ی ۳ درصد سمیت و معادله‌ی

۴ درصد زنده‌مانی سلول‌ها محاسبه می‌شود.

نتایج الگوهای XRD در شکل ۴ نشان داده شده است. در شکل ۵ نیز منحنی تنش (MPa) برحسب درصد ازدیاد طول آمده است. فیلم A کمترین میزان جذب آب (۶۱/۴۷٪) را دارد. اما با افزایش میزان ZnO و HA میزان جذب آب افزایش چشمگیری پیدا کرد به طوری که به ترتیب برای نمونه های B و C با ۲۸/۱۱۴٪ و ۲۰٪ برابر بود. شکل ۶ نشان دهنده ی میزان تخریب نمونه ها است. همانطور که در نمودار مشخص است میزان تخریب در فیلم C بیشتر از B و A است.



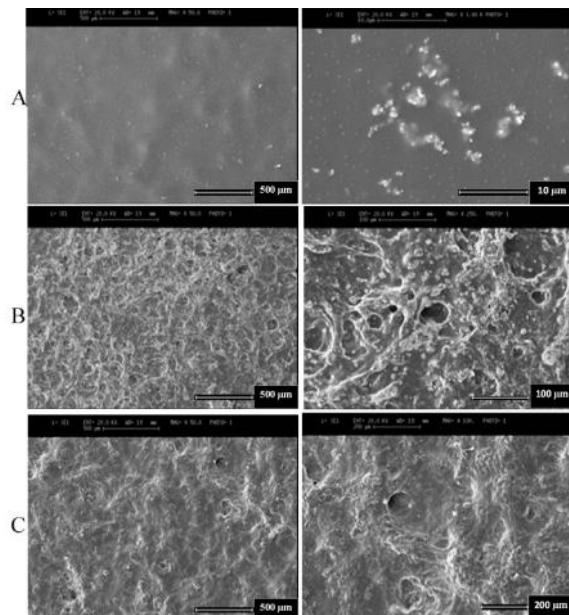
شکل ۴: آنالیز پراش تفرقی اشعه ی ایکس (XRD) فیلم های: A) 85%PVA-10%HA-5%ZnO B) 70%PVA-20%HA-10%ZnO C) و 55%PVA-30%HA-15%ZnO



شکل ۲: طیف FTIR از فیلم های: A) 85%PVA، B) 70%PVA-20%HA-10%ZnO و C) 55%PVA-30%HA-15%ZnO

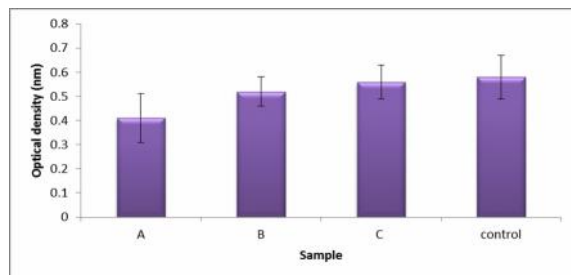
شکل ۳- A مربوط به تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی غشای A (85%PVA-10%HA-5%Zn) در بزرگنمایی های متفاوت می باشد.

شکل ۳- B و C) به ترتیب نشان دهنده ی تصویر SEM از فیلم های B (70%PVA-20%HA-10%ZnO) و C (55%PVA-30%HA-15%ZnO) می باشند.

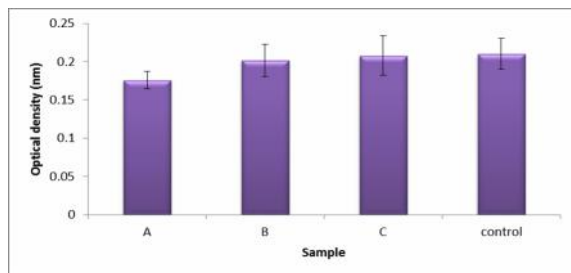


شکل ۳: تصویر میکروسکوپ SEM از فیلم های: A) 85%PVA-10%HA-5%Zn B) 70%PVA-20%HA-10%ZnO C) و 55%PVA-30%HA-15%ZnO

نتایج زنده مانی سلول L929 بر روی فیلم در شکل ۸ در ۲۴ ساعت (شکل ۸-ا) و ۷ روز (شکل ۸-ب) مورد بررسی قرار گرفته است. بعد از گذشت ۲۴ ساعت تفاوت چندانی در تکثیر سلول‌ها مشاهده نشد. اما پس از گذشت ۷ روز زنده‌مانی سلول در فیلم C تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) را نشان داده است.



A

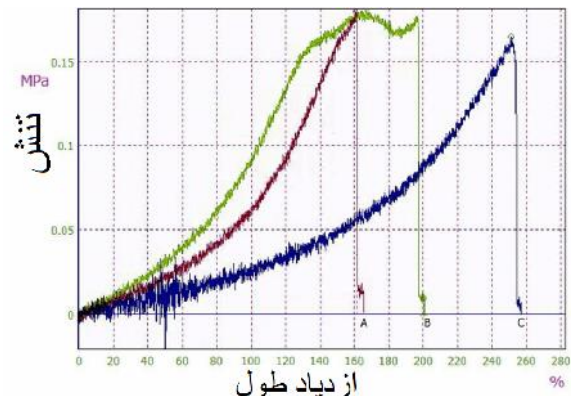


B

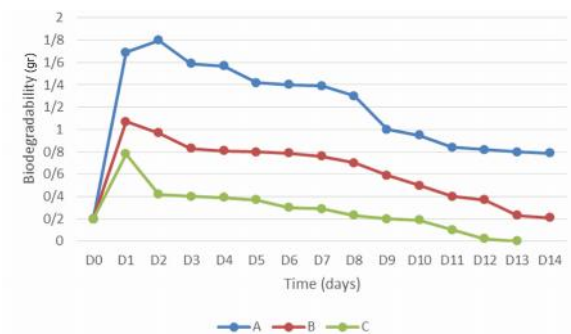
شکل ۸: نمودار ستونی نتایج MTT: (a) نتایج در ۲۴ ساعت و (b) نتایج در ۷ روز. میزان جذب نور ۵۷۰ نانومتر، 70%PVA- (B: 85%PVA-10%HA-5%ZnO (A 55%PVA-30%HA-(C و 20%HA-10%ZnO 15%ZnO

بحث

در شکل ۱ باندهای $1-2934\text{cm}^{-1}$ (C-H)، $1-3752\text{cm}^{-1}$ (باند کششی OH — غیرپیوندی) و $1-3436\text{cm}^{-1}$ (OH) قابل مشاهده است. انتظار می‌رود پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی و بین مولکولی به دلیل نیروهای آب‌دوستی قوی، میان زنجیره‌های پلی‌وینیل الکل روی دهد. پیک $1-1096\text{cm}^{-1}$ (C-O) بلوری می‌باشد. این باند به‌عنوان ابزار ارزیابی ساختار پلی‌وینیل الکل مورد استفاده قرار می‌گیرد. پیک ضعیف در محدوده $1-1720\text{cm}^{-1}$ (C=O) با گروه وینیل استات

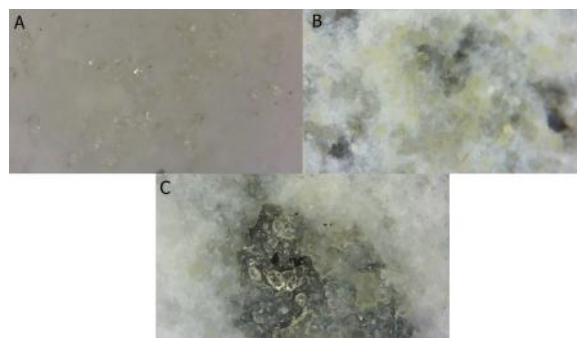


شکل ۵: منحنی تنش/درصد ازدیاد طول، فیلم‌های: (A: 70%PVA-20%HA-(B: 85%PVA-10%HA-5%ZnO 55%PVA-30%HA-15%ZnO (C و 10%ZnO



شکل ۶: تخریب‌پذیری بعد از ۱۴ روز، فیلم‌های: (A: 70%PVA-20%HA-(B: 85%PVA-10%HA-5%ZnO 55%PVA-30%HA-15%ZnO (C و 10%ZnO

شکل ۷ تصویر میکروسکوپ نوری از فیلم‌ها و بررسی مورفولوژی سطحی آن‌ها بعد از ۷ روز فرآیند تخریب می‌باشد.



شکل ۷: تصویر میکروسکوپ نوری بعد از ۷ روز تخریب از فیلم: (A: 70%PVA-(B: 85%PVA-10%HA-5%ZnO 55%PVA-30%HA-(C و 20%HA-10%ZnO 15%ZnO

پیک‌های نشان‌دهنده‌ی اکسید روی عبارتند از 835cm^{-1} ، 836cm^{-1} و 831cm^{-1} (Zn-O)، با افزایش مقدار اکسید روی در شکل‌های C-B-۲ پیک‌های جدید 1540cm^{-1} و 1579cm^{-1} (C=O) پدیدار شدند.

همان‌طور که در تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (شکل ۳-A) مشخص است هیچگونه ترک و شکستگی بر روی سطح به وجود نیامده است. Imaan و همکاران نیز عنوان کردند که نمونه‌ای که حاوی مقادیر بسیار اندکی از نانوذرات اکسید روی باشد عاری از ترک، شکستگی و ناهمواری است^{۱۸}. با افزایش میزان نانوذرات اکسید روی و هیالورونیک اسید بر روی سطوح ناهمواری به وجود آمده است (شکل ۳-B و C). همچنین ایجاد تخلخل بر روی سطح، تأثیر دیگر افزایش دو ماده ذکر شده می‌باشد. اندازه‌ی متوسط حفره‌ها در فیلم‌های B و C به ترتیب برابر با $23/69$ میکرومتر و $3/86$ میکرومتر می‌باشد. نتایج حاکی از آن است که با افزایش نانوذرات اکسید روی و هیالورونیک اسید تخلخل به وجود آمده بزرگ‌تر می‌شود.

برای PVA، الگوهای XRD (شکل ۴) قله‌های کوچکی را در 2° ، $19/11^\circ$ ، $69/11^\circ$ و $24/11^\circ$ به ترتیب برای فیلم‌های A، B و C نشان می‌دهد که نشان‌دهنده‌ی فاصله بین مولکولی فاز آمورف است، ماهیت نیمه کریستالی فیلم را نشان می‌دهد^{۲۰}. شدت پیک $29/19^\circ$ در فیلم A بسیار قوی می‌باشد، اما با کاهش میزان درصد PVA در فیلم B شدت پیک هم کاهش می‌یابد که پیک ۲ برابر با $04/20^\circ$ است.

بدیهی است پیک‌هایی با وجود قله‌های تیز، نشان‌دهنده‌ی حضور نانو ذرات ZnO هستند که باعث افزایش فاز کریستالی در تمام غشای فیلم‌های سنتز شده می‌شود^{۱۶}.

پیک‌های مربوط به نانو ذرات ZnO در زاویه حدودی ۲ برابر $79/31^\circ$ ، $59/34^\circ$ ، $14/36^\circ$ ، $54/47^\circ$ و $49/56^\circ$ و $04/69^\circ$ در نمونه‌های مختلف

پلی وینیل الکل مطابقت دارد^{۲۲}. همچنین پیک‌های 1457cm^{-1} و 1647cm^{-1} (CH₂) و (C-C) مشاهده شدند.

اوج نانو اکسید روی در باند 540cm^{-1} (ZnO) می‌باشد، همچنین قله‌های 1561cm^{-1} و 1284cm^{-1} به دلیل ارتعاش کشش متقارن و نامتقارن گروه C=O از استات وجود حضور استون‌های آنیونی استات در سطح ZnO را نشان می‌دهد^{۲۳}. قله‌ی پهن گسترده‌ی ضعیف در حدود 3420cm^{-1} به دلیل ارتعاش کششی O-H است.

پیک‌های 3411cm^{-1} ، 3524cm^{-1} و 2916cm^{-1} به ترتیب مربوط به پیوندهای OH، NH و CH متقارن و CH₂ نامتقارن است. همچنین پیک‌های 1661cm^{-1} ، 1377cm^{-1} و 1322cm^{-1} به ترتیب مربوط به آمید I، II و III می‌باشند. پیک‌های 1433cm^{-1} (C-O) متقارن، 1256cm^{-1} (C-O) v از (COOH) 1115cm^{-1} و 1028cm^{-1} مربوط به کربوهیدرات‌ها می‌باشند. پیک‌های شناسایی شده با مطالعات Chen و همکاران مطابقت دارند^{۲۴}.

در تجزیه و تحلیل FTIR (شکل ۲) می‌توان گفت که پیک‌های 3238cm^{-1} ، 3188cm^{-1} و 3233cm^{-1} مربوط به گروه OH، پیک‌های 1709cm^{-1} و 1717cm^{-1} نشان‌دهنده‌ی ارتعاش کششی C=O و پیک قوی 1082cm^{-1} مربوط به گروه C-O می‌باشد. پیک‌های 2904cm^{-1} و 2909cm^{-1} مربوط به CH متقارن و CH₂ نامتقارن هستند. در شکل (A-۲) پیک 2904cm^{-1} به علت مقدار بیشتر پلی وینیل الکل شدت بیشتری یافته است. پیک‌های فوق‌الذکر نشان‌دهنده‌ی حضور مؤثر پلی وینیل الکل در سه فیلم می‌باشد.

پیک‌های 1647cm^{-1} (آمید I) و 1322cm^{-1} ، 1314cm^{-1} و 1413cm^{-1} (آمید III) و 1411cm^{-1} (C-O متقارن) نشان‌دهنده‌ی حضور هیالورونیک اسید هستند.

دیده شده است.

پیک در محدوده‌ی $29/22^\circ$ برای نمونه‌ی A مؤید حضور HA است که افزایش درصد وزنی آن در نمونه‌ی B موجب تشدید پیک در 2° حدود $0.4/23^\circ$ شده است. پیک قوی $69/22^\circ$ در فیلم C نیز نشانه‌ی HA می‌باشد. همچنین پیک‌های $39/62^\circ$ ، $39/66^\circ$ و $89/67^\circ$ برای نمونه‌ی A، $0.4/63^\circ$ ، $19/66^\circ$ و $19/68^\circ$ برای فیلم B برابر با $99/66^\circ$ ، $39/66^\circ$ و $0.4/68^\circ$ گواه بر حضور HA هستند. نتایج به‌دست‌آمده با مطالعات 25 Chen و 26 Nath تطابق دارد.

خواص مکانیکی مواد زیستی بسیار مهم است چراکه تأثیر قابل توجهی بر رفتار و شکل سلولی دارد. تحقیقات نشان داده‌اند داربست‌هایی که سختی کمی دارند سلول‌های گرد را تشکیل می‌دهند درحالی‌که داربست‌هایی که سختی بالایی دارند منجر به تشکیل شکل‌های سلولی دوک مانند و کشیده می‌شوند. بافت‌ها و ارگان‌های بدن با توجه به نوع عملکردشان خواص مکانیکی متفاوتی نشان می‌دهند. پوست تغییر شکل سیکی متناوبی را تحمل می‌کند. همان‌طور که از شکل ۵ پیدا است فیلم C بیشترین درصد ازدیاد طول را دارد. درصد ازدیاد طول به‌ترتیب برای فیلم‌های A، B و C برابر است با $0.9/159\%$ ، $0.60/166\%$ و $24/23\%$ که این روند افزایشی علی‌رغم افزایش میزان ZnO بوده است. حضور ZnO در تست کشش برای حرکت بخش‌های زنجیره‌ای پلیمر PVA محدودیت ایجاد می‌کند اما حضور هیالورونیک اسید بیشتر مسبب آن بوده است. افزایش درصد ازدیاد طول با نتایج Imaan و همکاران هماهنگ می‌باشد^{۱۸}. گستردگی ناحیه‌ی میانی منحنی مربوط به نمونه‌ی B بیشتر از دو نمونه دیگر است که به حضور تخلخل‌های بیشتر در آن است که در تصاویر میکروسکوب الکترونی آن نیز مشهود است. افزایش میزان ZnO و HA باعث ازدیاد جذب آب شده است. Imman و همکاران اعتقاد دارند که جذب آب به شدت بر خواص غشاء داربست

تأثیر می‌گذارد و نقش مهمی در هدایت یون‌ها دارد. غشای هیدراته باعث هدایت یون‌ها می‌شود زیرا آب باعث افزایش تحرک یون‌ها در غشا می‌شود^{۱۸}. Wu و همکاران افزایش HA را موجب جذب آب بیشتر می‌دانند^{۲۰}.

نتایج به‌دست‌آمده از شکل ۶ گواه بر آن است که مقدار بیشتر ZnO که باعث ظهور بیشتر تخلخل می‌شود و HA به‌دلیل باندهای بیولوژیکی موجب افزایش سرعت تخریب فیلم می‌شود.

در مورد تصویر میکروسکوپ نوری (شکل ۷-A) می‌توان گفت در فیلم A حفرات ایجادشده در اثر تخریب، بسیار کوچک هستند. همچنین مشخص است که فیلم A طی ۷ روز چندان تخریب نشده است. شکل B-۷ مربوط به تخریب فیلم B می‌باشد. همان‌طور که نمایان است، نسبت تخریب فیلم B به فیلم A بسیار بیشتر می‌باشد چراکه سطح بیشتری از فیلم تخریب شده است. شکل C-۷ نشان از تخریب بیشتر فیلم C نسبت به دیگر فیلم‌ها را دارد و سطح وسیعی از فیلم تخریب شده است. می‌توان نتیجه گرفت که افزایش درصد ZnO تأثیر بسزایی بر سرعت تخریب فیلم پلیمری دارد. می‌توان از روی منحنی‌ها نتیجه گرفت پایداری فیلم‌های A، B و C به‌ترتیب بیش از ۱۴، حدود ۱۴ و ۱۰ روز می‌باشد.

در خصوص نتایج حاصل از زنده‌مانی سلولی (شکل ۸) می‌توان بیان کرد که حضور نانو ذرات اکسید روی تأثیر بسزایی بر چسبندگی، رشد و تکثیر سلولی دارد. میزان درصد زنده‌مانی سلول بر روی فیلم A در ۲۴ ساعت اول برابر $81/83\%$ است که بعد از گذشت ۷ روز این میزان کمتر شده و به $69/70\%$ رسید. با افزایش هیالورونیک اسید و نانو ذرات اکسید روی در فیلم‌های B و C درصد زنده‌مانی سلول افزایش یافته است و به‌ترتیب در ۲۴ ساعت اول این مقدار برابر $2/96\%$ و $0.5/99\%$ بیان شده است که بعد از ۷ روز برابر با $66/89\%$ و $96/56\%$ می‌باشد. بعد از گذشت هفت روز

نانوآکسید روی است. بررسی ریزساختار فیلم‌ها با استفاده از آنالیز پراش تفرقی اشعه‌ی ایکس حضور ZnO را تأیید کردند. در بررسی خواص مکانیکی مشخص شد که با افزایش ZnO میزان درصد ازدیاد طول افزایش می‌یابد.

فیلم C بیشترین میزان تورم را دارد. در بررسی‌های زیست‌تخریب‌پذیری وزن فیلم C در روز ۱۳ به صفر گرم رسیده است. با افزایش ZnO و HA تخریب فیلم‌ها نیز افزایش یافته‌اند. نتایج تست MTT طی مدت ۷ نشان داد که بالاترین زنده‌مانی سلولی مربوط به فیلم C می‌باشد. ساختار ترکیبات جدید و خواص زیستی فیلم 55%PVA-30%HA-15%ZnO نسبت به دیگر فیلم‌های ساخته‌شده مناسب‌تر گزارش شده است، بنابراین کاربرد آن در برنامه‌های بازسازی زخم به‌عنوان زخم پوش می‌تواند امیدبخش باشد.

میزان درصد زنده‌مانی سلول‌ها در نمونه C بیشتر از A و B می‌باشد. یافته‌ها با نتایج مطالعات مشابه حاوی اکسید روی همخوانی دارد. غلظت بالاتر یون‌های آزاد اکسید روی منجر به عدم تعادل در هموستاز و باعث واکنش‌های سلولی از جمله سمیت سلولی، آسیب DNA و فرآیندهای التهابی می‌شود^{۱۵ و ۲۷}.

در این مطالعه به دلیل استفاده از غلظت‌های بهینه‌ی اکسید روی تأثیرات منفی در تست MTT مشاهده نشده است. در این مطالعه سه فیلم A، B و C از جنس پلی‌وینیل‌الکل/هیالورونیک اسید/نانوذرات اکسید روی با نسبت‌های متفاوت ساخته شدند. گراف‌های طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه گواهی بر حضور گروه‌های عاملی مربوط به هر سه ماده می‌باشد. بررسی مورفولوژی سطحی نمونه‌ها نشان‌دهنده‌ی ایجاد تخلخل با افزایش میزان درصد

References

1. Pereira RF, Carvalho A, Gil MH, et al. Influence of aloe vera on water absorption and enzymatic in vitro degradation of alginate hydrogel films. *Carbohydr Polym.* 2013; 98(1): 311-20.
2. Johansen E, Lind R, Sjøbø B, et al. Moisture associated skin damage (MASD) in intensive care patients: A Norwegian point-prevalence study. *Intensive Crit Care Nurs.* 2020; 102889.
3. Ghaderi R. Efficacy of epiglue, suture, honey and animal oil in accelerating healing of full thickness wound of skin in mice. *J Invest Dermatol.* 2005; 125(3): 136-43.
4. Sandri G, Bonferoni MC, Ferrari F, et al. Montmorillonite–chitosan–silver sulfadiazine nanocomposites for topical treatment of chronic skin lesions: in vitro biocompatibility, antibacterial efficacy and gap closure cell motility properties. *Carbohydr Polym.* 2014; 102: 970-7.
5. Guillén-Solà M, Mieras AS, Tomàs-Vidal AM, et al. A multi-center, randomized, clinical trial comparing adhesive polyurethane foam dressing and adhesive hydrocolloid dressing in patients with grade II pressure ulcers in primary care and nursing homes. *BMC Fam Pract.* 2013; 14(1): 196.
6. Dong Y, Hassan WU, Kennedy R, et al. Performance of an in situ formed bioactive hydrogel dressing from a PEG-based hyperbranched multifunctional copolymer. *Acta Biomater.* 2014; 10(5): 2076-85.
7. Moritz S, Wiegand C, Wesarg F, et al. Active wound dressings based on bacterial nanocellulose as drug delivery system for octenidine. *Int J Pharm.* 2014; 471(1-2): 45-55.
8. Yahyavi M. Polyvinyl Alcohol Biodegradable Nanocomposites, Reinforced with Nanocellulose. *Besparesh* 2014; 4(3): 82-90 (perian).

9. Zeynali MR, Nazari M, Karimi S, et al. Prediction of polyvinyl alcohol (PVOH) properties synthesized at various conditions by artificial neural networks technique. *Iran J Chem Eng.* 2017; 14(2): 3-16 (Persian).
10. Norouzi M, Ghasemi-Mobarakeh L, Morshed M. Fabrication of antibacterial poly (vinyl alcohol) microfibers mat for wound dressing application. *Iran J Polym Sci Technol* 2016; 29: 15-25 (Persian).
11. Fotouhi Chahuki F, Aminzadeh S, Jafarian V, et al. Screening of HA-producing lactic acid bacteria and culture condition optimization of selected bacterium by Taguchi method. *J Cell Mol Res (Iranian J Biol).* 2018;31(4): 511-20 (Persian).
12. Ghanbari H, Saghariana N, ZakeryM, et al. The histological study of the effect of hyaluronic acid and curcuma longa-GHEE compound on the gingival healing following gingivalectomy in dogs. *J of Dentistry (Shiraz University of Medical Sciences)* 2008; 9: 222-34 (Persian).
13. Mirhosseini M, Yazdani N, Dehghan Hamdan A. Investigation of antimicrobial properties of chitosan-ZnO nanocomposite. *Razi J Med Sci.* 2016; 23(147): 104-14 (Persian).
14. Nakhaei Moghaddam M, Najafi M. Effect of zinc oxide nanoparticles on the pigment production of clinical isolates of pseudomonas aeruginosa. *SJIMU.* 2017; 24(6): 107-16 (Persian).
15. Rajaie S, Mohammadi Sichani M, Mohammad Yousefi H. Study on the inhibitory activity of zinc oxide nanoparticles against Pseudomonas aeruginosa isolated from burn wounds. *Qom Univ Med Sci J.* 2015;9 (1) :30-7 (Persian).
16. Norouzi MA, Montazer M, Harifi T, et al. Flower buds like PVA/ZnO composite nanofibers assembly: Antibacterial, in vivo wound healing, cytotoxicity and histological studies. *Polymer Testing* 2021; 93:106914 (Persian).
17. Ebrahimi S, Hayati Roodbari N, Parivar K, et al. Investigation of the effect of nano zinc oxide on skin burns in adult female mouse. *Medical Sciences* 2015; 25 (4): 257-62 (Persian).
18. Imaan DU, Mir FQ, Ahmad B. Synthesis and characterization of a novel poly (vinyl alcohol)-based zinc oxide (PVA-ZnO) composite proton exchange membrane for DMFC. *Int J Hydrogen Energy* 2020; (in press).
19. Soubhagya AS, Moorthi A, Prabakaran M. Preparation and characterization of chitosan/pectin/ZnO porous films for wound healing. *Int J Biol Macromol* 2020; 157: 134-45.
20. Wu X, Li W, Chen K, et al. A tough PVA/HA/COL composite hydrogel with simple process and excellent mechanical properties. *Mater Today Commun.* 2019; 21: 100702.
21. Bromiley GW. *The International Standard Bible Encyclopedia.* Wm. B. Eerdmans Publishing; 1995.
22. Kumaraswamy S, Babaladimath G, Badalamoole V, et al. Gamma irradiation synthesis and in vitro drug release studies of ZnO/PVA hydrogel nanocomposites. *Adv Mater Lett.* 2017;8: 546-52.
23. Martinez CR, Joshi P, Vera JL, et al. Cytotoxic studies of PEG functionalized ZnO nanoparticles on MCF-7 cancer cells. In: *NSTI Nanotechnol. Conf. Expo, NSTI-Nanotech;* 2011.
24. Chen H, Qin J, Hu Y. Efficient degradation of high-molecular-weight hyaluronic acid by a combination of ultrasound, hydrogen peroxide, and copper ion. *Molecules.* 2019; 24(3): 617.
25. Chen K, Liu J, Yang X, et al. Preparation, optimization and property of PVA-HA/PAA composite hydrogel. *Mater Sci Eng C.* 2017; 78: 520-29.

26. Nath SD, Abueva C, Kim B, et al. Chitosan–hyaluronic acid polyelectrolyte complex scaffold crosslinked with genipin for immobilization and controlled release of BMP-2. *Carbohydr Polym.* 2015; 115: 160-9.
27. Manuja A, Raguvaran R, Kumar B, et al. Accelerated healing of full thickness excised skin wound in rabbits using single application of alginate/acacia based nanocomposites of ZnO nanoparticles. *Int J Biol Macromol* 2020;155: 823-33.

Synthesis and evaluation of nanohydrogel film containing polyvinyl alcohol/hyaluronic acid/zinc oxide for wound dressing

Malahat Khateri Roodbordeh, MSc
Nahid Hassanzadeh Nemati, PhD

Department of Biomedical Engineering,
Faculty of Medical Science and
Technology, Islamic Azad University,
Science and Research Branch, Tehran, Iran

Background and Aim: Lesions of the skin can impair its vital function to protect humans against external pathogens. Therefore, producing a suitable wound dressing to repair injuries is always one of the challenges of researchers. The present study aims to Synthesize a hydrogel film for wound dressing applications.

Methods: In this research, a hydrogel film of polyvinyl alcohol / hyaluronic acid / nano zinc oxide was fabricated for application as a wound dressing. For this purpose, three films with different percentages were prepared using the solvent casting method. The synthesized samples were characterized using FTIR, SEM, XRD, and tensile tests.

Results: Evaluation of the morphology of the samples showed that the increase of zinc oxide nanoparticles led to porosity and growth of their size in the films. It was also characterized that the percentage of film elongation increased with increasing nanoparticles of zinc oxide and hyaluronic acid. The elongation percentage from the lowest amount of nano zinc oxide to the maximum (5, 10 and 15% of weight was 159%, 166%, and 230%, respectively. The MTT study indicated the cell viability above 80% in all three films.

Conclusion: A film containing 15% zinc oxide can be a suitable option for using in tissue engineering and wound dressing.

Keywords: zinc oxide, polyvinyl alcohol, solvent casting, hyaluronic acid, skin regeneration

Received: Nov 29, 2020 Accepted: Jan 19, 2021

Dermatology and Cosmetic 2020; 11 (4): 256-267

Corresponding Author:
Nahid Hassanzadeh Nemati, PhD

Shohaday-Hesarak Blvd., University
Square, Satari Highway, Science and
Research Branch, Islamic Azad University
Email: nahid_hassanzadeh@yahoo.com

Conflict of interest: None to declare