

# ساخت و مشخصه یابی هیدروژل پلی وینیل الکل / آلوورا با روش ریخته گری حلال جهت کاربرد به عنوان زخم پوش

مونا حاجیان<sup>۱</sup>، محبوبه محمودی<sup>۲\*</sup>، رعنا ایمانی<sup>۳</sup>

۱- کارشناسی ارشد، گروه مهندسی پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

۲- استادیار، گروه مهندسی پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

۳- استادیار، گروه مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

\*m.mahmoodi@iauyazd.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۲۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۱۵)

## چکیده

در این مطالعه، فیلم‌های هیدروژلی پلی وینیل الکل / آلوورا با درصدهای وزنی مختلف آلوورا (۲۰، ۳۰ و ۵۰ درصد) توسط روش ریخته گری حلال ساخته شد. سپس میزان جذب آب، نرخ تخریب، میزان عبور بخار آب و خواص مکانیکی فیلم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) به ترتیب برای شناسایی پیوندهای تشکیل شده در نمونه‌ها و بررسی مورفولوژی سطح آن‌ها انجام گرفت. از نتایج آزمایش‌ها مشاهده گردید که با افزایش درصد وزنی آلوورا تا ۳۰٪، میزان جذب آب، نرخ تخریب، خواص مکانیکی و تعداد تخلخل‌های موجود در سطح نمونه‌ها افزایش می‌یابد. همچنین، افزایش نرخ عبور بخار آب از نمونه‌ها با افزایش درصد وزنی آلوورا مشاهده گردید. در نهایت توسط آزمون‌های برون تنی (In vitro)، سمیت سلولی و مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست (L929) بر روی سطح نمونه‌ها مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. از نتایج این آزمون، افزایش رشد و تکثیر سلول‌ها بر روی نمونه پلی وینیل الکل / آلوورا با درصد وزنی ۳۰٪ آلوورا مشاهده گردید. بنابراین هیدروژل پلی وینیل الکل / آلوورا می‌تواند گزینه مناسبی برای کاربرد به عنوان زخم پوش باشد.

## کلمات کلیدی:

آلوورا، پلی وینیل الکل، زخم پوش، ریخته گری حلال، فیلم‌های هیدروژلی.

## ۱- مقدمه

انواع محصولات ارائه شده در درمان جراحات پوستی، زخم‌پوش‌های مدرن به دلیل دارا بودن خواصی چون ایجاد محیط مرطوب برای زخم، تسریع در روند درمان و ایزوله کردن زخم از محیط بیرونی، مورد توجه محققین قرار گرفته اند. یک زخم‌پوش ایده آل باید توانایی فراهم نمودن رطوبت کافی برای

آسیب‌های پوستی عمدتاً شامل زخم‌های مزمن، سوختگی، تومورها و بریدگی‌ها می‌باشند. از روش‌های مرسوم جهت درمان آسیب‌های پوستی می‌توان به اتوگرافت<sup>۱</sup>، آلوگرافت<sup>۲</sup>، زخم پوش و مهندسی بافت که به عنوان یکی از رویکردهای نوین در درمان زخم به شمار می‌آید، اشاره نمود [۱]. در میان

رشد کراتینوسیت، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و بیان کلاژن نوع یک مؤثر می‌باشد [۱۰].

پلی‌وینیل الکل، پلیمری سنتزی می‌باشد که به دلیل زیست‌سازگاری عالی، آب‌دوستی بالا، خاصیت شکل‌گیری بصورت فیلم و خواص مکانیکی مناسب در کاربردهای زیستی مورد توجه قرار گرفته است [۱۱-۱۲]. همچنین، این ماده به دلیل حضور گروه‌های هیدروکسیل فراوان در ساختارش قادر به تشکیل پیوند هیدروژنی با پلیمرهای آبدوست دیگر می‌باشد [۴]. ترکیب آلورا با پلیمرهای سنتزی و طبیعی دیگر جهت کاربرد در ترمیم آسیب‌های پوستی در مطالعات مختلفی مورد توجه قرار گرفته است. گروهی از محققین به بررسی تأثیر آلورا بر جذب آب و نرخ تخریب فیلم‌های هیدروژلی آلجینات/آلورا به منظور درمان زخم و رهایش دارو پرداختند. نتایج نشان داد جذب آب برای فیلم‌هایی با درصد بالای آلورا افزایش می‌یابد، اما بین فیلم آلجینات خالص و فیلم حاوی ۵٪ آلورا تفاوت چشم‌گیری مشاهده نشده است. همچنین، میزان جذب آب و نرخ تخریب فیلم‌های هیدروژلی با افزایش درصد آلورا افزایش می‌یابد [۱۳-۱۴]. حضور آلورا در کامپوزیت کیتوسان/آلورا به دلیل توانایی تحریک فیروبلاست، ترمیم زخم را در موش‌های دیابتی تسریع می‌دهد و در طولانی مدت پاسخ سلولی قابل توجهی را در بر دارد. در زخم پوش‌های کیتوسان، افزایش آلورا موجب افزایش نرخ جذب آب و خواص مکانیکی می‌گردد. افزایش نرخ تورم نه تنها موجب مرطوب نگه‌داشتن محل زخم می‌شود بلکه می‌تواند بعد از گذشت مدت زمانی ترشحات زخم را نیز جذب کند [۱۵]. با ارزیابی فیلم‌های هیدروژلی آلورا/ فیروئین مشاهده گردید که چسبندگی و تمایز سلول‌های فیروبلاست در این فیلم‌ها در مقایسه با فیلم‌های فیروئین افزایش می‌یابد. همچنین، افزایش خواص مکانیکی (انعطاف‌پذیری و رفتار ویسکوالاستیک) و خواص مشابه بودن با پوست در نمونه‌های حاوی آلورا که دارای انعطاف‌پذیری بیشتری بودند، نیز مشاهده گردید [۱۶-۱۷].

زخم، جلوگیری از ایجاد عفونت، حذف ترشحات زخم و تحریک بازسازی بافت را داشته باشد [۲]. از جمله عیوب زخم‌پوش‌های سنتی مانند گازها، بانداژها و پنبه، جذب زیاد ترشحات و ایجاد محیطی خشک بر روی زخم می‌باشد در صورتیکه زخم‌پوش‌های مدرن مانند زخم‌پوش‌های هیدروکلونیدی، آلجینات‌ها و هیدروژل‌ها قادر به ایجاد محیطی گرم و مرطوب بر روی زخم می‌باشند [۳] و شرایط مناسب تری را جهت ترمیم زخم ایجاد می‌نمایند [۱]. محیط مرطوب زخم سبب افزایش تکثیر و تمایز سلول‌های کراتینوسیت می‌شود و به فاکتورهای رشد اجازه می‌دهد تا در تماس با سطح زخم قرار گرفته و سرعت بهبود را افزایش دهند [۴]. بنابراین، زخم‌پوش‌های سنتی از طریق ایجاد محیط خشک موجب تأخیر در روند ترمیم زخم می‌گردند که این مسئله منجر شد تا زخم‌پوش‌های سنتی جای خود را به زخم‌پوش‌های مدرن بدهند.

هیدروژل‌ها، شبکه‌های پلیمری و آبدوست سه بعدی هستند که در حلال‌های آبی بدون اینکه حل شوند، متورم می‌گردند. هیدروژل‌ها به دلایل خاصی چون قابلیت جذب آب بالا، الاستیسیته، انعطاف‌پذیری و توانایی ایجاد محیط مرطوب، مواد مناسبی برای طراحی زخم‌پوش‌ها می‌باشند [۵-۶]. اخیراً، استفاده از پلیمرهای طبیعی و گیاهی به دلیل زیست‌سازگاری بالا، زیست‌تخریب‌پذیری و شباهت به بافت‌های بدن در درمان زخم‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند [۷]. این دسته از مواد به دلیل خواص مکانیکی ضعیف‌تر، معمولاً به صورت ترکیب با پلیمرهای سنتزی به کار می‌روند تا خواص مورد توجه در یک زخم‌پوش ایده‌آل را فراهم سازند [۸-۹].

آلورا گیاهی دارای خواص آنتی‌باکتریال، ضدالتهاب و رنگ‌زایی می‌باشد، بنابراین به عنوان افزودنی در اکثر محصولات پوستی مورد استفاده قرار می‌گیرد و به عنوان جایگزین دارویی مؤثر در زخم‌های عفونی نیز در نظر گرفته می‌شود [۱-۵]. آسمانان<sup>۳</sup> پلی‌ساکاریدی مشتق‌شده از آلورا می‌باشد که بر فرایند ترمیم زخم از طریق تمایز فیروبلاست، تحریک فاکتور

برای مثال، جهت تهیه نمونه پلی وینیل الکل / آلوورا با میزان ۲۰ درصد آلوورا (PA20)، ۰/۸g پلی وینیل الکل توسط ۹ g آب مقطر مخلوط گردید و به مدت دو ساعت روی همزن مغناطیسی حرارتی (پارس آزما مدل M.J54) با دمای ۸۰°C و دور ۲۰۰rpm قرار داده شد. پس از انحلال کامل و سرد شدن محلول تا دمای اتاق، میزان ۰/۲g پودر آلوورا به محلول اضافه گردید و مجدداً روی همزن مغناطیسی حرارتی با دمای ۳۰°C قرار داده شد تا آلوورا کاملاً حل گردد. پس از همگن شدن ترکیب، ۵ml از محلول در ظرف پلی استایرن به قطر ۶cm ریخته شد و سپس در فور (پارس آزما مدل CO-WO3) قرار داده شد تا فیلم‌ها خشک شود و جهت انجام آزمون‌های بعدی آماده گردند [۱۹]. لازم به توضیح می‌باشد که تمام نمونه‌ها مشابه روش ذکر شده در بالا تهیه شدند.

جدول (۱): کدگذاری نمونه‌ها

کد نمونه‌ها	% ترکیبات
P	۱۰۰٪ پلی وینیل الکل - ۰٪ آلوورا
PA20	۸۰٪ پلی وینیل الکل - ۲۰٪ آلوورا
PA30	۷۰٪ پلی وینیل الکل - ۳۰٪ آلوورا
PA50	۵۰٪ پلی وینیل الکل - ۵۰٪ آلوورا

#### ۴-۲- میکروسکوپ الکترونی روبشی

جهت مشاهده ریزساختار و مورفولوژی سطح نمونه‌ها از میکروسکوپ الکترونی رویشی (SEM) (PHILIPS) مدل XL30، ۱۲KV استفاده گردید. برای آماده‌سازی، نمونه‌ها پس از تهیه با طلا پوشش داده شد و سطح آن‌ها مورد تصویربرداری قرار گرفت [۲۰].

#### ۵-۲- طیف نگاری مادون قرمز تبدیل فوریه

طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) (Frontier) مدل PerkinElmer در محدوده طول موج  $4000-400\text{cm}^{-1}$  جهت شناسایی گروه‌های عاملی و پیوندهای تشکیل شده در نمونه‌ها به

هدف از این تحقیق، ساخت فیلم‌های پلی وینیل الکل / آلوورا و بهبود خواص سطحی، مکانیکی، زیست‌سازگاری و زیست تخریب‌پذیری نمونه‌ها برای توسعه کاربرد در ترمیم زخم می‌باشد.

## ۲- مواد و روش انجام تحقیق

### ۲-۱- مواد

پلی وینیل الکل (وزن مولکولی  $72000\text{g/mol}$  و هیدرولیز بالای ۹۸٪) از شرکت مرک آلمان و گیاه آلوورا از داروخانه گیاهی تهیه شد. محیط کشت DMEM/F12، محلول‌های تریپسین، آنتی‌بیوتیک Pen strep، PBS<sup>۶</sup> و DMSO<sup>۵</sup> از شرکت INOCLON خریداری شد. همچنین نمک تترازولیوم بروماید و سرم NCS<sup>۶</sup> از شرکت Gibco و محلول گلو تار آلدئید از Sigma تهیه گردید.

### ۲-۲- تهیه پودر آلوورا

جهت استخراج آلوورا و تهیه پودر، قسمت خارجی برگ گیاه توسط آب مقطر شسته شد. سپس ژل داخل گیاه از قسمت سبز رنگ خارجی جدا شده و توسط یک مخلوط‌کن کاملاً به صورت خمیر مانند تبدیل شد. جهت جداسازی بخش ژل از باقی اجزاء فیبری، خمیر حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفیوژ (Eppendorf مدل 5810R) با دور ۱۰۰۰۰ rpm قرار داده شد [۱۸]. ژل خالص به مدت ۳ روز در دستگاه خشک‌کایش انجمادی (Operon مدل FDB-5503) قرار داده شد تا کاملاً خشک گردد.

### ۳-۲- تهیه فیلم‌های هیدروژلی

در این مطالعه، به منظور بهبود خواص مکانیکی زخم‌پوش از پلی وینیل الکل (PVA) به عنوان بستر مناسب و از آلوورا به عنوان یک عامل طبیعی با هدف تسریع در روند درمان زخم استفاده گردید. جهت تهیه فیلم‌های کامپوزیتی پلی وینیل الکل / آلوورا، از ۳ درصد متفاوت آلوورا استفاده گردید (جدول ۱).

PBS با محلول تازه جایگزین گردید. میزان کاهش وزن و نرخ تخریب نمونه‌ها از طریق فرمول ۲ محاسبه شد [۵].

$$WL(\%) = \left( \frac{W_i - W_f}{W_i} \right) \times 100 \quad (2)$$

که  $W_i$  وزن خشک اولیه نمونه و  $W_f$  وزن خشک نمونه پس از تخریب شدن می‌باشد.

#### ۲-۸- عبور بخار آب از نمونه‌های هیدروژلی

برای انجام آزمون عبور بخار آب فیلم‌هایی با ضخامت  $110 \mu\text{m}$  تهیه گردید (ضخامت فیلم‌ها با استفاده از میکرومتر اندازه‌گیری شد). از هر نمونه دو فیلم دایره شکل به قطر  $2/5$  سانتی‌متر بریده و روی دهانه لوله‌های آزمایش با قطر  $2 \text{ cm}$  که حاوی  $15 \text{ ml}$  آب دوبار تقطیر گردید. دو عدد لوله آزمایش بدون درپوش به عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد. برای انجام آزمایش، ابتدا وزن هر لوله آزمایش به همراه آب و نمونه فیکس شده بر روی آن اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌های آماده شده در انکوباتور با دمای  $37^\circ\text{C}$  و رطوبت  $40\%$  قرار داده شد. پس از گذشت  $24$  ساعت نمونه‌ها از انکوباتور خارج شده و دوباره توزین انجام گرفت. در این آزمون، میزان کاهش وزن نمونه‌ها بیانگر کاهش آب داخل لوله آزمایش‌ها بود [۲۳]. میزان عبور بخار آب (WVTR) از نمونه‌ها توسط فرمول ۳ محاسبه گردید.

$$\text{WVTR} \left( \frac{\text{gr}}{\text{mm}^2/\text{h}} \right) = \left( \frac{W_i - W_f}{24A} \right) \times 10^6 \quad (3)$$

به طوری که در این رابطه  $W_i$  وزن اولیه سیستم (لوله آزمایش، آب و فیلم پلیمری)،  $W_f$  وزن نهایی سیستم پس از کاهش  $A$  مساحت دهانه بطری می‌باشد [۲۳].

#### ۲-۹- بررسی استحکام نمونه‌های هیدروژلی

آماده‌سازی نمونه‌ها جهت انجام آزمایش، طبق استاندارد ASTM D00882 در ابعاد  $1 \times 6 \text{ cm}$  انجام شد. در این آزمون

کار برده شد. برای آماده سازی نمونه‌ها، ابتدا نمونه‌ها با پودر KBr (با نسبت  $1/100$  /KBr) آسیاب شدند و سپس توسط دستگاه فشار به صورت قرص نازک تهیه و در دستگاه FTIR جهت بررسی پیوند های ایجاد شده قرار داده شدند [۲۱].

#### ۲-۶- بررسی میزان جذب آب

به منظور ارزیابی میزان قابلیت جذب آب توسط نمونه‌ها، آزمون جذب آب برای نمونه‌ها به مدت  $27$  روز انجام گرفت. برای انجام آزمایش، ابتدا قطعاتی از نمونه با ابعاد  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  تهیه گردید و توسط ترازوی دیجیتالی (Startorius مدل CP324S با دقت  $0/0001$  گرم) وزن شد. سپس فیلم‌های توزین شده با  $15 \text{ ml}$  محلول بافر نمکی فسفات (PBS) در انکوباتور  $\text{CO}_2$  (BINDER مدل C150) با دمای  $37^\circ\text{C}$  قرار داده شد. در پنج ساعت اول جهت محاسبه نرخ تورم نمونه‌ها در بازه‌های زمانی  $20$  دقیقه از محلول PBS خارج گردید. سپس آب سطحی نمونه‌ها از طریق کاغذ صافی گرفته شد و توسط ترازو، وزن آن‌ها اندازه‌گیری گردید. در نهایت، میزان جذب آب یا نرخ تورم (Sw) نمونه‌ها از طریق فرمول ۱ محاسبه گردید [۲۲].

$$Sw = (W_1 - W_0) / W_0 \quad (1)$$

در این فرمول  $W_0$  وزن نمونه‌ها در حالت خشک و  $W_1$  وزن نمونه‌ها در حالت تر پس از جذب آب می‌باشد.

#### ۲-۷- بررسی زیست تخریب پذیری

به منظور محاسبه نرخ تخریب نمونه‌ها (WL)، قطعاتی از فیلم‌ها با ابعاد  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  تهیه گردید. نمونه‌ها پس از توزین در فالکن حاوی  $10 \text{ ml}$  محلول PBS قرار داده و در انکوباتور  $\text{CO}_2$  با دمای  $37^\circ\text{C}$  نگهداری شدند. نمونه‌ها در روزهای ۱، ۲، ۵، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۷ از PBS خارج شدند و به مدت ۲ ساعت در فور با دمای  $37^\circ\text{C}$  خشک و سپس توزین شدند. برای جداسازی تکه‌های احتمالی جدا شده ناشی از تخریب نمونه‌ها، از روز اول تا روز هفتم، هر روز و از روز هفتم تا بیست و هفتم، هر هفته محلول

اتانول با غلظت‌های ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۹۹٪ قرار گرفته و پس از خارج شدن از الکل و خشک شدن در ۴°C در دستگاه SEM برای تصویربرداری از سلول‌های روی سطح نمونه‌ها قرار داده شدند [۲۶].

### ۲-۱۰-۲- آزمون MTT

میزان تکثیر و زنده مانی سلول‌های L929 روی سطح نمونه‌ها توسط آزمون MTT<sup>۲</sup> مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمایش نمونه‌های PA20، PA30 و کنترل منفی جهت انجام آزمون انتخاب شدند. پس از ۲۴ ساعت کشت سلول در تماس با نمونه، ۱۰۰ μl محلول ۰/۰۵ mg/ml نمک تترازولیوم بروماید به چاهک‌ها اضافه شد. پس از طی ۴ ساعت زمان انکوباتور (دمای ۳۷°C و ۵٪ گاز CO<sub>2</sub>)، محتویات درون چاهک کامل تخلیه شده و ۱۰۰ μl محلول DMSO به هر چاهک اضافه شد. ظرف کشت به مدت ۲۰ دقیقه داخل شیکر دستگاه الایزایدردر (پیشتازطب مدل Avecina) قرار داده شد و میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد [۲۷-۲۸].

### ۲-۱۱-۱- ارزیابی آماری

مقایسه آماری داده‌های به دست آمده توسط روش t-student انجام شد. تعداد تکرار برای آزمون‌های ۳ در نظر گرفته شده و نتایج به صورت میانگین ± انحراف از معیار گزارش شده است.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- بررسی ریز ساختار و مورفولوژی نمونه‌ها

شکل ۱ مورفولوژی سطح نمونه‌های PA20، PA30 و PA50 را نشان می‌دهد. سطح نمونه PA20 نسبتاً صاف و بدون تخلخل و دارای پستی و بلندی‌های اندک می‌باشد که در شکل (الف-۱) مشاهده می‌شود. سطح نمونه PA30، ناهموار و متخلخل می‌باشد (شکل ب-۱). شکل (ج-۱) سطح نمونه PA50 را نشان می‌دهد که دارای بیشترین ناهمواری و تخلخل در مقایسه با دو نمونه

سرعت کشتش فیلم‌ها ۵۰ mm/min و فاصله بین دو فک دستگاه از یکدیگر حدود ۴cm در نظر گرفته شد. درصد ازدیاد طول و مدول الاستیک فیلم‌ها از طریق نمودار تنش- کرنش و استحکام کششی (TS) توسط فرمول ۴ محاسبه گردید [۲۴].

$$TS = \frac{F_{max}}{A} \quad (۴)$$

در این رابطه A مساحت اولیه فیلم و F<sub>max</sub> بیشترین نیروی قابل تحمل قبل از شکست می‌باشد.

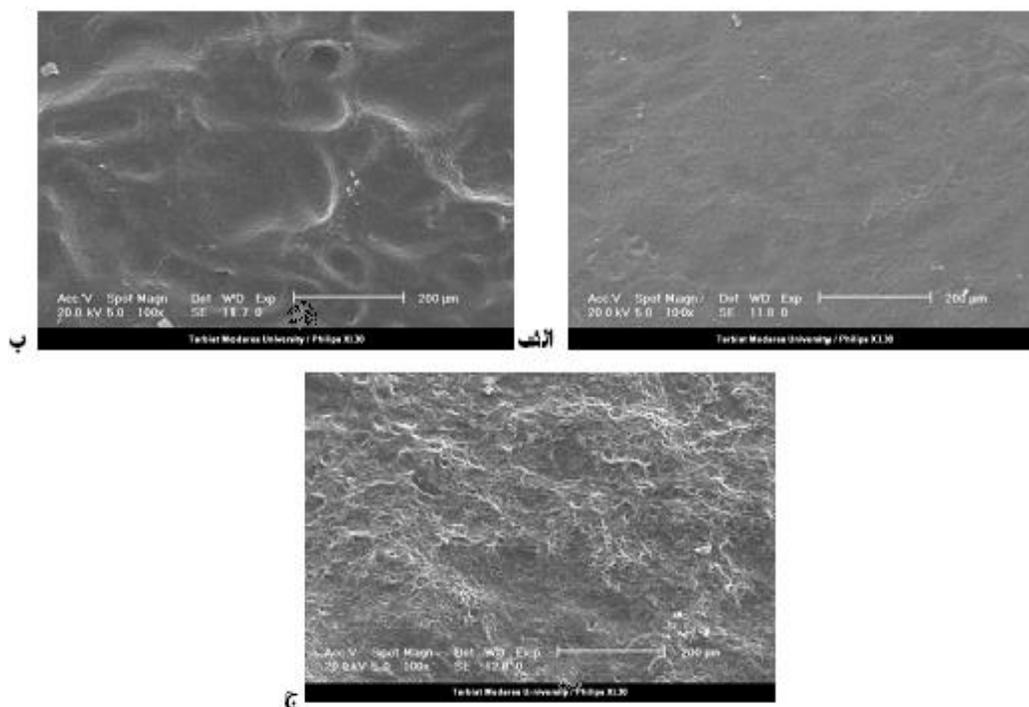
#### ۲-۱۰-۲- آزمون کشت سلول (In vitro)

جهت انجام آزمون سمیت سلولی و تعیین تکثیر سلولی از رده سلولی L929 (فیروبیلاست دم موش) تهیه شده از انیستیتو پاستور ایران استفاده شد. سلول‌های فریز شده به محیط کشت حاوی DMEM/F12، ۱۰٪ سرم NCS و ۲۰۰ μl از محلول Pen strep اضافه و در فلاسک کشت سلول ریخته شد. سپس فلاسک در انکوباتور با شرایط ۵٪ گاز CO<sub>2</sub> و ۹۸٪ رطوبت قرار داده شد. پس از دو بار پاساژ، از سلول‌ها جهت انجام آزمایش‌ها استفاده گردید. به منظور بررسی مورفولوژی سلول‌ها، نمونه‌های P، PA20، PA30 در ابعاد ۵×۵/۵ cm<sup>2</sup> بریده و استریل شدند. نمونه‌ها داخل چاهک‌های ظرف کشت ۹۶ خانه قرار داده شدند و تعداد ۱۰۰۰۰ cell/well در چاهک‌ها ریخته شد. در این آزمون ظرف کشت سلول بدون نمونه و حاوی همین تعداد سلول به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد [۲۵].

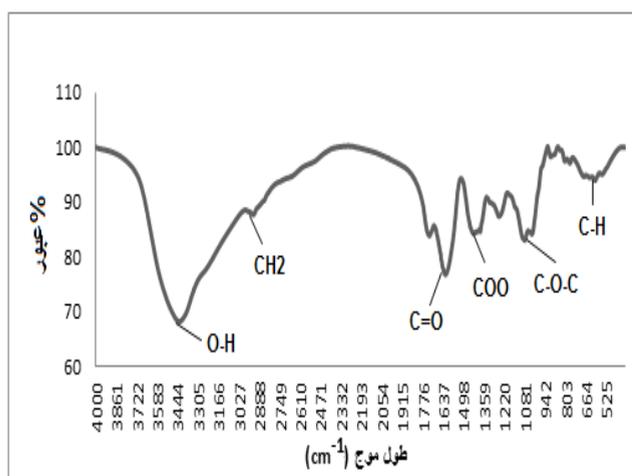
#### ۲-۱۰-۱- بررسی مورفولوژی سلول‌ها

مورفولوژی سلول‌ها پس از ۲ روز کشت بر روی نمونه‌ها، با استفاده از میکروسکوپ SEM مورد بررسی قرار گرفت. پس از طی ۴۸ ساعت از تماس نمونه‌ها با سلول‌ها، محیط کشت رویی خالی شده نمونه‌ها دو بار به مدت ۲۰ دقیقه توسط PBS شسته شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۷۵ دقیقه در تماس با گلو تار آلدئید ۲٪/۵ قرار داده شدند و پس از آن مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه با PBS شسته شدند. در نهایت نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در الکل

دیگر می‌باشد. نتایج حاکی از آن است که افزایش درصد آلورا موجب افزایش تخلخل و ناهمواری در نمونه‌ها می‌شود [۲۵].



شکل (۱): تصاویر SEM از سطح نمونه‌ها: (الف): PA20، (ب): PA30 و (ج): PA50

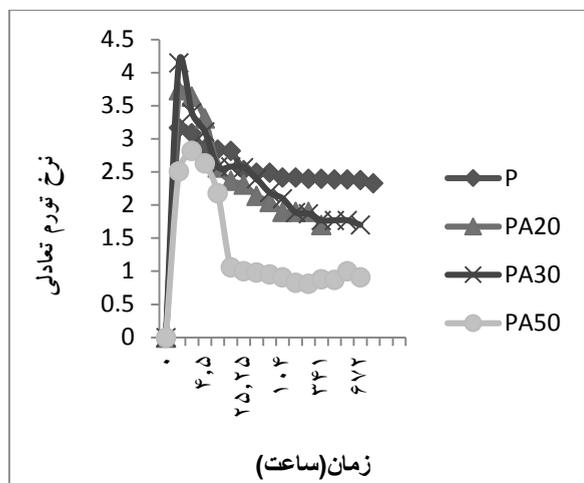


شکل (۲): طیف FTIR آلورا

شکل ۳ طیف FTIR نمونه‌های PA20 و PA30 را نشان می‌دهد. پیک بلند در طول موج  $3434 \text{ cm}^{-1}$  که معرف گروه OH می‌باشد، در طیف PA20 مشاهده می‌شود. وزن مولکولی

### ۳-۲- پیوندهای تشکیل شده در هیدروژل

شکل ۲ طیف FTIR آلورا را در محدوده طول موج  $\text{cm}^{-1}$  ۴۰۰-۴۰۰۰ نشان می‌دهد. پیک پهن در طول موج  $3434 \text{ cm}^{-1}$  معرف گروه هیدروکسیل (OH) می‌باشد. همچنین، پیک‌های موجود در طول موج‌ها  $2928 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1621 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1433 \text{ cm}^{-1}$  و  $1080 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب به گروه‌های  $\text{CH}_2$ ،  $\text{C=O}$ ، جهت گیری متقارن گروه  $\text{CH}_3$  و  $\text{COO}$  و  $\text{C-H}$ ،  $\text{C-O-C}$  و  $\text{C-H}$ ، آلورا نسبت داده می‌شود [۲۹-۳۰]. همچنین، PVA دارای پیوندهای OH، CH،  $\text{C=O}$ ، C-C و C-O می‌باشد [۳۰].

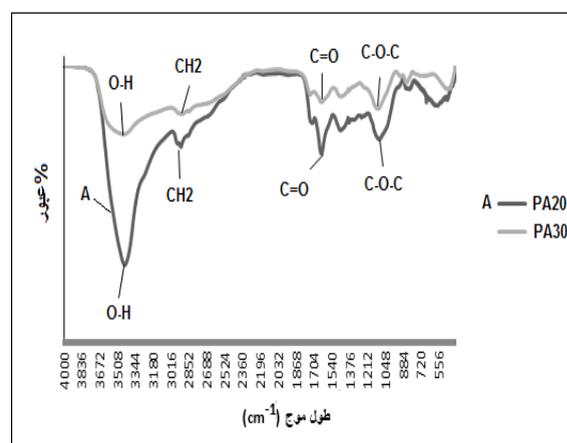


شکل (۴): نمودار جذب آب در نمونه های پلی وینیل الکل / آلورا با درصد های متفاوت آلورا

### ۳-۴- بررسی زیست تخریب پذیری هیدروژل ها

با توجه به نتایج زیست تخریب پذیری نمونه ها در شکل ۵، بیشترین سرعت تخریب نمونه ها در روز اول مشاهده می شود، ولی از پایان روز اول تا روز بیست و هفتم، تخریب با نرخ پایین تری ادامه می یابد. نتایج حاکی از آن است که با افزایش درصد آلورا نرخ تخریب افزایش می یابد. زیرا افزایش آلورا تا ۳۰٪ جذب آب را افزایش می دهد و بالا رفتن میزان جذب آب موجب افزایش نرخ تخریب می گردد [۱-۵]. البته باید توجه داشت که حداکثر تخریب در نمونه PA50 مشاهده شد. با توجه به مورفولوژی و تصاویر SEM، این نمونه دارای سطحی با تخلخل بیشتر نسبت به نمونه های دیگر می باشد. همچنین، در ساختار آن کمترین مقدار PVA و درصد بالای آلورا می باشد که از ابتدای قرارگیری در محلول PBS، آلورا شروع به خروج از سیستم می کند [۳۱]. بنابراین بیشترین نرخ تخریب در نمونه PA50 مشاهده می شود.

پلی وینیل الکل بکار رفته در این مطالعه ۷۲۰۰۰ gr/mol می باشد، در صورتی که وزن مولکولی آلورا حدود ۲۴۰۰۰ gr/mol می باشد. بنابراین با کم شدن یک مول از PVA تعداد O-H بیشتری در مقایسه با کاهش یک مول آلورا از سیستم حذف می شود و همین امر منجر به تشکیل پیک بلندتر هیدروکسیل در نمونه با درصد بالاتر PVA (PA20) در مقایسه با نمونه PA30 می گردد.



شکل (۳): طیف FTIR نمونه های PA20 و PA30

### ۳-۳- بررسی میزان جذب آب

در شکل ۴ نمودار جذب آب نمونه های P، PA20، PA30 و PA50 مشاهده می گردد. برای هر نمونه ۳ مرتبه آزمایش تکرار شد. نتایج نشان داد که افزایش آلورا تا ۳۰٪ موجب افزایش میزان جذب آب می گردد ولی در نمونه PA50، کمترین میزان جذب آب مشاهده می شود. گروه های عاملی آلدوست موجود در آلورا و PVA سبب ایجاد پیوند با آب می گردند و میزان جذب آب در نمونه ها افزایش می یابد. دلیل بالاتر بودن میزان جذب آب در نمونه P فوق آلدوست بودن PVA می باشد، بنابراین هر چه درصد وزنی PVA کمتر باشد مانند نمونه PA50 میزان جذب آب کمتر می شود. همچنین، همزمان با شروع فرایند جذب آب، آلورا شروع به خارج شدن از ساختار می کند و کاهش آلورا سبب کاهش جذب آب می گردد [۳۱].

افزایش میزان جذب بخار آب از طریق سطح در تماس با آب و عبور آن از سطحی که در تماس با هوا می‌باشد، می‌گردد. از طرفی دیگر، افزایش درصد آلوورا (PA50) موجب افزایش تخلخل در سطح نمونه‌ها می‌گردد که این امر بر افزایش میزان عبور بخار آب مؤثر می‌باشد.

### ۳-۶- بررسی استحکام نمونه‌های هیدروژلی

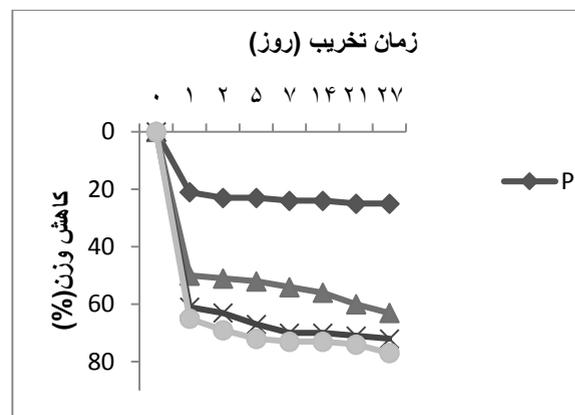
به منظور بررسی تأثیر آلوورا بر خواص مکانیکی زخم‌پوش موردنظر، آزمون کشش انجام گرفت. جدول ۲ اطلاعات مربوط به خواص مکانیکی فیلم‌ها را نشان می‌دهد. با افزایش درصد آلوورا تا ۳۰٪ خواص مکانیکی نمونه‌ها بهبود یافته و استحکام کششی، ازدیاد طول و مدول الاستیک به ترتیب MPa ۴/۰±۸۵/۴، ۴۰/۰±۳۳/۵٪ و ۲۰/۰±۸۳/۱MPa می‌باشد که بالاترین مقادیر در مقایسه با سایر نمونه‌ها می‌باشد. با بالا رفتن درصد آلوورا تا ۵۰٪ خواص مکانیکی نمونه‌ها تا ۵ برابر نسبت به نمونه PA30 افت می‌کند. زیرا با افزایش آلوورا میزان رطوبت جذب شده از طریق فیلم افزایش یافته و رطوبت به عنوان روان‌ساز عمل کرده و موجب کاهش خواص مکانیکی می‌گردد [۲۴]. همچنین با افزایش آلوورا و رطوبت، تخلخل افزایش یافته و در نهایت با افزایش تخلخل خواص مکانیکی و استحکام کششی به شدت کاهش می‌یابد [۳۳].

جدول (۲): خواص مکانیکی فیلم‌ها (\* دلالت بر تفاوت معنادار  $p < 0.05$  مقادیر به دست آمده در مقایسه با نمونه P دارد)

نمونه	استحکام کششی (MPa)	ازدیاد طول (%)	مدول الاستیک (MPa)
P	۲۲/۰±۹۹/۳	۱۱/۵۹ ±۰/۳۲	۳/۰±۷۶/۰۹
PA20	*۳۱/۰±۹۴/۲۷	۱۷/۰±۱۷/۳۱	۴/۰±۴۴/۰۹۵
PA30	*۴۰/۰±۸۵/۴	*۲۰/۳۳ ±۰/۵	*۴/۰±۸۳/۱
PA50	۸/۰±۴۸/۱۲	۹/۰±۳۲/۲	۱/۰±۳۱/۱۳

### ۳-۷- مطالعه زیست‌سازگاری نمونه‌ها

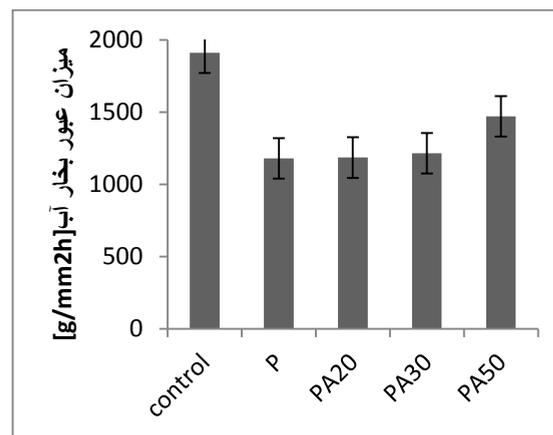
لازم به توضیح می‌باشد که با توجه به نتایج حاصل از آزمون‌های انجام شده، نمونه PA50 خواص فیزیکی و مکانیکی مورد



شکل (۵): نمودار نرخ تخریب نمونه‌های پلی‌وینیل الکل / آلوورا با درصد‌های متفاوت آلوورا

### ۳-۵- عبور بخار آب از نمونه‌های هیدروژلی

میزان عبور بخار (WVTR) آب خیلی بالا از زخم پوش منجر به خشک شدن سریع سطح پوست و تأخیر در ترمیم زخم می‌شود. علاوه بر این، WVTR کم نیز منجر به انباشته شدن عفونت در محل زخم و افزایش خطر ابتلا به رشد باکتری و تأخیر در روند درمان می‌شود [۳۲]. نتایج حاصل از آزمون عبور بخار آب برای تمام نمونه‌ها در شکل ۶ مشاهده می‌گردد.



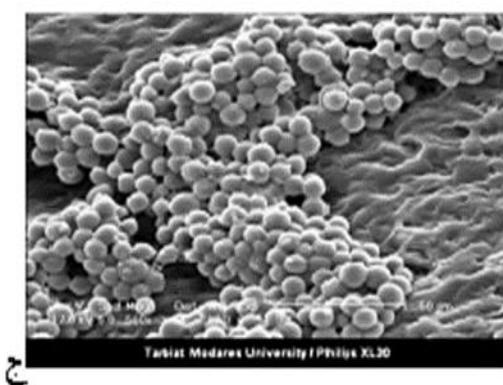
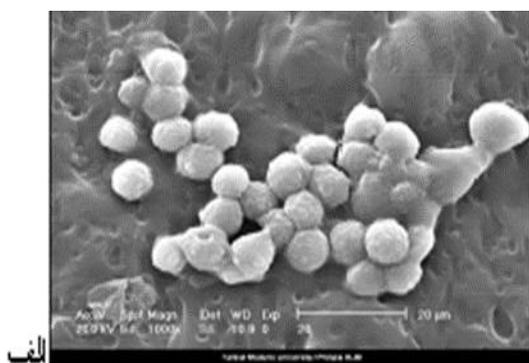
شکل (۶): نمودار میزان عبور بخار آب از نمونه‌های پلی‌وینیل الکل / آلوورا با درصد‌های متفاوت آلوورا. افزایش نرخ عبور بخار آب در نمونه PA50 نسبت به سه نمونه دیگر (P, PA20, PA30) معنادار ( $p < 0.05$ ) بوده است

افزایش حضور آلوورا موجب افزایش تعداد گروه‌های آبدوست در نمونه‌های هیدروژلی می‌شود. بنابراین این مسئله موجب

نشان می دهد. همان طور که انتظار می رفت زیست سازگار بودن پلی وینیل الکل قابل مشاهده می باشد. در شکل (ب-۷) که مربوط به نمونه PA20 می باشد، به دلیل حضور آلوورا و تأثیر آلوورا بر افزایش چسبندگی سلولی، تکثیر سلولی بیشتر و تجمع سلولها در سطح نمونه مشاهده می شود [۲۰-۳۲].

نظر را به عنوان زخم پوش مناسب دارا نمی باشد. بنابراین، آزمون زیست سازگاری و MTT بر روی نمونه های P، PA20 و PA30 انجام داده شد.

شکل ۷، چسبندگی، رشد و مورفولوژی سلول های L929 بر روی نمونه های P، PA20 و PA30 را بعد از ۲ روز کشت نشان می دهد. شکل (الف-۷) سلول های تثبیت شده بر روی نمونه P را

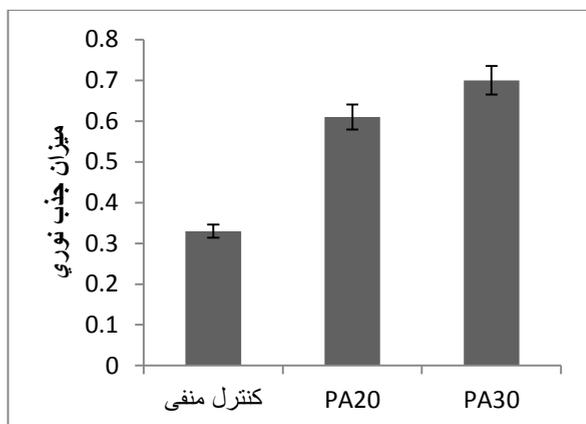


شکل (۷): تصاویر SEM از سلول های تثبیت شده بر روی نمونه های: (الف): P، (ب): PA20 و (ج): PA30

آزمایش لیگاندی جهت چسبندگی سلول ندارند و آلوورا محرک تکثیر سلولی می باشد، سلولها تا حدی کروی شکل دیده می شوند [۳۴].

در محصولاتی که به عنوان زخم پوش (نه جایگزین پوست) استفاده می شوند، به دلیل تحریک سلول های محل آسیب، به ترمیم هرچه بیشتر و سریع تر نیاز می باشد و در نهایت پس از اتمام دوره ترمیم، بقایای زخم پوش از محل زخم خارج خواهد شد. بنابراین، در این مطالعه هدف از افزودن آلوورا به پلی وینیل

تصاویر SEM نشان می دهد که سلولها به خوبی در روی سطح نمونه ها تکثیر یافتند و سلولها از طریق ترشحات ریز سلولی مثل فلوپدیا به یکدیگر و به ماده زمینه چسبیده اند. با این تفاوت که سطح نمونه PA30 (شکل (ج-۷)) با تعداد سلول های بیشتری نسبت به دو نمونه دیگر و بطور کامل با سلول های دارای ترشحات فلوپدیای بزرگ چسبیده به سطح، پوشیده شده است. تعداد سلول های موجود در نمونه PA20 نیز از نمونه P بیشتر می باشد، اما از آنجا که هیچ یک از دو جزء مورد استفاده در این



شکل (۸): آزمون MTT نمونه‌های PA20 و PA30. به لحاظ آماری تفاوت هر دو نمونه حاوی آلورا نسبت به نمونه کنترل معنادار ( $p < 0.05$ ) بوده است

#### ۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه، زخم‌پوش نوین هیدروژلی با روش ریخته‌گری حلال برای کاربرد در ترمیم زخم ساخته شد. در زخم‌پوش هیدروژلی، از پلی‌وینیل الکل به عنوان بستر با قابلیت ایجاد خواص مکانیکی، زیست‌سازگاری، جذب آب و انعطاف‌پذیری مناسب و از آلورا به عنوان یک عامل طبیعی برای تسریع در روند درمان زخم استفاده شد. از نتایج مشاهده گردید که با افزایش درصد آلورا، تعداد تخلخل‌های موجود در ساختار و میزان عبور بخار آب از فیلم‌های هیدروژلی افزایش می‌یابد. همچنین میزان جذب آب، استحکام کششی فیلم‌ها با افزایش آلورا تا ۳۰٪ افزایش و پس از آن کاهش می‌یابد. همچنین سرعت تخریب در نمونه دارای آلورا بیشتر افزایش می‌یابد، بنابراین نمونه PA50 نمونه مناسبی برای کاربرد در زخم‌پوش نمی‌باشد. نتایج آزمایشات سلولی نشان‌دهنده بهینه بودن نمونه PA30 بود و بیشترین تکثیر سلولی در مجاورت این نمونه مشاهده گردید. بنابراین نمونه PA30 را به عنوان نمونه بهینه با توجه به میزان ترشحات موجود در محل زخم می‌توان در دو حالت خشک و تر به کار برد.

#### ۵- مراجع

- [1] R. F. Pereira, A. Carvalhob, A. Mendesa & P. J. Bartolo, "Influence of Aloe vera on water

الکل، بهره بردن از خواص مطلوب آن در القای بیشتر ترمیم زخم می‌باشد. طبق مطالعات انجام شده، ترکیبات موجود در آلورا سبب افزایش تکثیر سلولها از طریق القای مکانیسم فعال سازی مسیر سیگنالینگ فاکتور رشد فیروبلاست می‌گردد [۳۵]. ترکیبات موجود در آلورا فاقد لیگاند چسبندگی به سلول می‌باشند و همچنین با توجه به اینکه ماده زمینه کامپوزیت تهیه شده پلی‌وینیل الکل است، به طور مشابه این پلیمر زیستی نیز فاقد چسبندگی بالای سلولی می‌باشد. از این رو انتظار نمی‌رود که سلولهای در تماس با فیلم کامپوزیت تهیه شده، پهن شدگی ناشی از چسبندگی قوی را نشان دهند. همچنین باید توجه داشت که چسبندگی بالای سلول‌های در حال ترمیم در محل آسیب به زخم پوش، سبب بروز مشکل در حین جداسازی و خروج بقایای زخم پوش از محل زخم خواهد شد. در تحقیقی، ترکیب کیتوسان و آلورا به عنوان زخم‌پوش مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه، نمونه حاوی آلورا نسبت به نمونه کیتوسان که بدون آلورا است، تنها بر تکثیر سلول‌ها مؤثر بوده و چسبندگی و پهن شدگی مشاهده نشده است [۳۶].

#### ۳-۲-۱- آزمون MTT

برای تعیین کمی تکثیر سلول‌های فیروبلاست روی نمونه‌های PA20 و PA30 آزمون MTT انجام گرفت. شکل ۸ زنده‌مانی سلول‌ها بر روی سطح نمونه‌ها بعد از ۲ روز کشت را نشان می‌دهد. در این نمونه‌ها رشد و زنده ماندن سلول‌ها بر روی سطح نمونه PA30 با تخلخل بیشتر، به دلیل حضور درصد بالاتر آلورا نسبت به نمونه PA20 مشاهده می‌شود. ساختار متخلخل فیلم‌هایی با ترکیب آلورا بستر مناسبی جهت برهم کنش با سلول ایجاد می‌کند. چسبندگی پایین‌تر در زخم‌پوش می‌تواند به عنوان یک مزیت مطرح شود زیرا هنگام جدا کردن سلول از سطح، سلول‌ها با سطح زخم‌پوش جدا نمی‌شود [۱۵]. نتایج این آزمون بیانگر زیست‌سازگاری عالی هر دو نمونه با توجه به میزان جذب بالاتر آن‌ها در مقایسه با نمونه کنترل منفی می‌باشد.

- Factor-1, Vascular Endothelial Growth Factor, and Type I Collagen; and Wound Healing”, *Journal of Pharmacological Sciences*, Vol. 109, pp. 1-4, 2009.
- [11] J. O. Kimb, J. K. Parka, J. H. Kimb, S. Giu Jin, C. S. Yonga, Li. D. Xun, J. Y. Choia, J. S. Wooa, B. K. Yooa, W. Seok Lyooc, J. A. Kima & H. G. Choia, “Development of polyvinyl alcohol–sodium alginate gel-matrix- based wound dressing system containing nitrofurazone”, *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 359, pp. 1-4, 2008.
- [12] B. Hui, Zhang & Y. L. Ye, “Preparation of PVA Hydrogel Beads and Adsorption Mechanism for Advanced Phosphate Removal”, *Chemical Engineering Journal*, Vol. 74, pp. 3-7, 2014.
- [13] R. Pereira, A. Mendes & P. Bártolo, “Alginate/Aloe vera hydrogel films for biomedical applications, The First CIRP Conference on Biomanufacturing”, Vol. 5, pp. 1-6, 2013.
- [14] R. F. Pereira, A. Carvalhob, A. Mendesa & P. J. Bartolo, “Influence of Aloe vera on water absorption and enzymatic in vitro degradation of alginate hydrogel films”, *PubMed*, Vol. 15, pp. 1-7, 2013.
- [15] S. S. Silva, E. G. Popa, M. E. Gomes, M. Cerqueira, A. P. Marques, S. G. Caridade, P. Teixeira, C. Sous, J. F. Mano & R. L. Reis, “An investigation of the potential application of chitosan/aloe-based membranes for regenerative medicine”, *Acta Biomaterialia*, Vol. 49, pp. 1-7, 2013.
- [16] S. Khoshgozaran Abrasa, M. H. Azizi, Z. Hamidyan & N. Bagheripoor Fallahb, “Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan based-films as a function of Aloe vera gel incorporation”, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 87, pp. 2-5, 2011.
- [17] P. Inpanya, A. Faikrua, A. Ounaron, A. Sittichokechaiwut & J. Viyoch, “Effects of the blended fibroin/aloe gel film on wound healing in streptozotocin induced diabetic rats, *Biomed*”, Vol. 7, pp. 1-8, 2012.
- [18] P. Jithendra, A. Merlin Rajam, T. h. Kalaivani, A. Mandal & C. h. Rose, “Preparation and Characterization Of Aloe Vera Blended Collagen-Chitosan Composite Scaffold for Tissue Engineering Applications”, *International Journal of Pharmaceutic*, Vol. 97, pp. 2-7, 2013.
- absorption and enzymatic in vitro degradation of alginate hydrogel films”, *PubMed.*, Vol. 15, pp. 1-7, 2013.
- [2] S. Moritz, C. Wiegand, F. Wesarg, N. Hessler, F. A. Müller, D. Kralisch, U. C. Hipler & B. Fischer, “Active wound dressings based on bacterial nanocellulose as drug delivery system for octenidine”, *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 471, pp. 1-4, 2014.
- [3] C. Radhakumarya, M. Antontyb & K. Sreenivasan, “Drug loaded thermoresponsive and cytocompatible chitosan based hydrogel as a potential wound dressing”, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 83, pp. 1-8, 2010.
- [4] G. Zhou, A. Ruhan, Ge. Heng, L. Wang, M. Liu, B. Wang, H. Su, M. Yan, Y. Xi & Y. Fan, “Research on a novel poly (vinyl alcohol)/lysine/vanillin wound dressing: Biocompatibility, bioactivity and antimicrobial activity”, *BURNS*, Vol. 4346, pp. 1-9, 2014.
- [5] R. Pereira, A. Mendes & P. Bártolo, “Alginate/Aloe vera hydrogel films for biomedical applications”, *The First CIRP Conference on Biomanufacturing*, Vol. 5, pp. 1-6, 2013.
- [6] B. Singha, S. Sharmab & A. Dhiman, “Design of antibiotic containing hydrogel wound dressings: Biomedical properties and histological study of wound healing”, *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 457, pp. 1-7, 2013.
- [7] G. D. Mogoşanu & A. M. Grumezescu, “Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing”, *Pediatric nephrology*, Vol. 29, pp. 1, 2013.
- [8] L. Vandamme, A. Heyneman, H. Hoeksema, J. Verbelen & S. Monstrey, “Honey in modern wound care: A systematic review”, *BURNS*, Vol. 4076, pp. 1- 7, 2013.
- [9] J. O. Kimb, J. K. Parka, J. H. Kimb, S. Giu Jin, C. S. Yonga, Li D. Xun, J. Y. Choia & J. S. Wooa, “Development of polyvinyl alcohol–sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone”, *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 359, pp. 1-4, 2008.
- [10] S. Jettanacheawchankit, S. Sasithanasate, P. Sangvanich, W. Banlunara, P. Thunyakitpisal5, “Acemannan Stimulates Gingival Fibroblast Proliferation, Expressions of Keratinocyte Growth

- [29] Raya & S. h. Aswatha, "An analysis of the influence of growth periods on physical appearance and acemannan and elemental distribution of Aloe vera Lgel", *Acta Biomaterialia*, Vol. 54, pp. 2-7, 2013.
- [30] Singh & L. Pal, "Sterculia crosslinked PVA and PVA-poly (AAM) hydrogel wound dressings for Slow drug delivery: Mechanical, mucoadhesive, biocompatible and permeability properties", *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, Vol. 9, pp. 2-8, 2012.
- [31] O. Saibuatong & M. Phisalaphong, "Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis", *Polymer Sciences*, Vol. 11, pp. 2-6, 2009.
- [32] P. T. Alexy, A. Bakoš, G. Crkoňová, Z. Kramárová, J. Hoffmann, M. Julinová, M. Chiellini & P. Cinelli, "Poly(vinyl alcohol)-collagen hydrolysate thermoplastic blends: II. Water penetration and biodegradability of melt extruded films", *Polymer Testing*, Vol. 22, pp. 1-3, 2003.
- [33] D. Archana, J. Dutt & P. K. Dutta, "Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, in vitro and in vivo studies", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 57, pp. 1-8, 2013.
- [34] H. Y. Kim, H. N. Kim, S. J. Lee, J. E. Song, S. Y. Kwon, J. W. Chung, D. Lee & G. Khang, "Effect of Pore sizes of PLGA scaffolds on mechanical properties and cell behaviour for nucleus pulposus regeneration in vivo", *Tissue Eng. Regen. Med.*, Vol. 11, pp. 1-8, 2014.
- [35] K. M. Abdullah, A. Abdullah, M. L. Johnson, J. J. Bilski, K. Petry, D. A. Redmer, L. P. Reynolds & A. T. Grazul-Bilska, "Effects of Aloe vera on gap junctional intercellular communication and proliferation of human diabetic and nondiabetic skin fibroblasts", *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, Vol. 9, pp. 711-718, 2003.
- [36] S. Silva, E. G. Popa, M. E. Gomes, M. Cerqueira, A. Marques, S. Caridade, P. Teixeira, C. Sousa, J. ano & R. Reis, "An investigation of the potential application of chitosan/aloe-based membranes for regenerative medicine", *Acta biomaterialia*, Vol. 9, pp. 6790-6797, 2013.
- [19] Uslu, S. Keskin, A. Gül, T. C. Karabulut & M. L. Aksu, "Preparation and Properties of Electrospun Poly (vinyl alcohol) Blended Hybrid Polymer with Aloe vera and HPMC as Wound Dressing", *Journal of biology and chemistry*, Vol. 38, pp. 1-5, 2009.
- [20] H. E. Thu, M. Zulfakar & S. h. Fern, "Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 434, pp. 1-8, 2012.
- [21] Rayll & D. Gupta, "A panoptic study of antioxidant potential of foliar gel at different harvesting regimens of Aloe vera", *Materials Science and Engineering*, Vol. 21, pp. 2-4, 2013.
- [22] M. Shemesh & M. Zilberman, "Structure-property effects of novel bioresorbable hybrid structures with controlled release of analgesic drugs for wound healing applications", *Acta Biomater*, Vol. 10, pp. 2-4, 2013.
- [23] M. Kokabi, M. Sirousazar & Z. Muhammad Hassan, "PVA-clay nanocomposite hydrogels for wound dressing", *European Polymer Journal*, Vol. 43, pp. 1- 8, 2007.
- [24] S. Khoshgozaran Abrasa, M. H. Azizi, Z. Hamidyan & N. Bagheripour Fallahb, "Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan based-films as a function of Aloe vera gel incorporation", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 87, pp. 2-5, 2011.
- [25] R. Pereira, A. Tojeira, C. Daniela, A. Mendes & P. Ba'rtolo, "Preparation and characterization of film Based on alginate and aloe vera", *International Journal of Polymer Anal Charact*, Vol. 16, pp. 2-16, 2011.
- [26] S. Massumi, "Protocol for Fixation of cells on scaffold for SEM", 2012.
- [27] G. Simbula, C. Dettori, T. Camboni & E. Cotti, "Comparison of Tetraacetylenylendiamine + Sodium Perborate and Sodium Hypochlorite Cytotoxicity on L929 Fibroblasts", *Basic Research-Biology*, Vol. 36, pp. 1-4, 2010.
- [28] M. Boncler, M. Rózsalski, A. Krajewska, A. Podśedek & C. Watala, "Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells", *Basic Research-Biology*, Vol. 88, pp.1-7, 2013.

---

**۶- پی نوشت**

---

- [1] Autograft
- [2] Allograft
- [3] Acemannan
- [4] Phosphate Buffered Saline
- [5] Dimethyl Sulfoxid
- [6] Newborn Calf Serum
- [7] Methyl Thiazol Tetrazolium