



بررسی اثر هیدروژل کربوکسی متیل سلولز-ژلاتین حاوی عصاره گیاه پنیرک بر ترمیم زخم پوستی: مطالعه پیش بالینی

نعیمه ماه‌حیدری^۱، نریمان رضائی کلاریجانی^۲، قاسم عباس‌زاده گودرزی^۳، سیدرضا موسوی^۴، مجید صالحی^{۵*}

۱- استادیار مهندسی بافت مرکز نوآوری سلول‌های بنیادی و پزشکی باز ساختی، دانشگاه علوم پزشکی علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

۲- استادیار مهندسی بافت مرکز رشد فناوری سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۳- استادیار بیوتکنولوژی پزشکی دپارتمان بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۴- استادیار بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۵- دانشیار مهندسی بافت، مرکز تحقیقات پزشکی بازساختی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۶- دانشیار مهندسی بافت، دپارتمان مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۰۶، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۲۶

چکیده

مقدمه: ترمیم زخم‌های پوستی چالش بالینی مهمی است و پانسمان‌های زیست‌سازگار حاوی ترکیبات طبیعی، بهبود را تسریع می‌کنند. پنیرک (*Malva sylvestris*) خواص ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی، گزینه‌ای مناسب برای پانسمان زیستی است. هدف، سنتز و ارزیابی هیدروژل کربوکسی متیل سلولز-ژلاتین حاوی عصاره هیدروآلکلی پنیرک (*CMC-Gel-Malva*) و بررسی اثر آن بر ترمیم زخم در مدل حیوانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: هیدروژل *CMC-Gel-Malva* سنتز شد. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی (مورفولوژی با *SEM*، جذب آب، زیست‌تخریب پذیری و *pH*) ارزیابی گردید. زیست‌سازگاری خونی با همولیز و شاخص لخته‌شدن (*BCI*) و زیست‌سازگاری سلولی با *MTT* روی فیبروبلاست *3T3* انجام شد. اثر ترمیمی در مدل زخم موش صحرایی در گروه‌های کنترل منفی، *CMC-Gel* و *CMC-Gel-Malva* طی ۱۴ روز بررسی و درصد بسته‌شدن زخم و شاخص‌های هیستوپاتولوژیک (*H&E*) ارزیابی شد.

نتایج: همولیز هر دو هیدروژل زیر ۵٪ (به ترتیب ۴/۱۵٪ و ۴/۴۰٪) بود *BCI* در *CMC-Gel* (۴۶/۲۰٪) کمتر از *CMC-Gel-Malva* (۳۱/۱۰٪) اما هر دو نسبت به کنترل (۱۰۰٪) کاهش معنی‌داری داشتند. افزودن پنیرک جذب آب را افزایش (۴۵/۵۳٪ در برابر ۵۷/۲۷٪ در مرحله آخر) و تخریب اولیه را تسریع کرد. *MTT* در ۷۲ ساعت، زنده‌مانی بالاتر برای *CMC-Gel-Malva* (۱۰۷/۲٪ در برابر ۹۹/۲٪) نشان داد. بسته‌شدن زخم در روز ۱۴ در گروه *CMC-Gel-Malva* (۸۵/۴۴٪) به‌طور معنی‌داری بیشتر از *CMC-Gel* (۷۸/۲۲٪) بود. هیستوپاتولوژی گروه *CMC-Gel-Malva* حاکی از کاهش التهاب، بازسازی فولیکول‌ها و غدد چربی، افزایش عروق و کلاژن‌زایی منظم بود.

نتیجه‌گیری: هیدروژل *CMC-Gel-Malva* دارای زیست‌سازگاری عالی، جذب آب بالا و اثر ترمیم‌کنندگی مطلوب است و می‌تواند به‌عنوان پانسمان زیستی مؤثر برای زخم‌های مزمن و سوختگی درجه دو پیشنهاد شود.

واژه‌های کلیدی: عصاره، پنیرک، هیدروژل، کربوکسی متیل سلولز، ژلاتین، ترمیم زخم، زیست‌سازگاری.

*نویسنده مسئول: شاهرود، میدان هفت تیر، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود تلفن: ۰۲۲۳۳۳۹۵۰۵۴، نمابر: ۰۲۲۳۳۳۹۵۰۰۹، Email: Salehi.m@shmu.ac.ir, Msalehi.te1392@gmail.com

ارجاع: ماه‌حیدری نعیمه، رضائی کلاریجانی نریمان، عباس‌زاده گودرزی قاسم، موسوی سیدرضا، صالحی مجید. بررسی اثر هیدروژل کربوکسی متیل سلولز-ژلاتین حاوی عصاره گیاه پنیرک بر ترمیم زخم پوستی: مطالعه پیش بالینی. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۴؛ ۲۱(۱): ۴۰-۵۴.



مقدمه

پوست بزرگ‌ترین ارگان بدن است و به‌عنوان یک سد محافظتی در برابر تنش‌های محیطی، تروماهای خارجی و عوامل بیگانه و پاتوژن‌ها عمل می‌کند. از عملکردهای مهم دیگر پوست می‌توان به تنظیم حرارت بدن از طریق تعریق، سنتز ویتامین D از طریق اشعه ماوراء بنفش نور خورشید، هموستاز مایعات و تشخیص حس اشاره کرد (۱). در نتیجه آسیب به این ارگان مهم، می‌تواند صدمات و عوارض جبران‌ناپذیری را به همراه داشته باشد. این صدمات می‌تواند بر اثر عواملی مانند سوختگی، اشعه‌های رادیواکتیو، تروما، انواع بیماری‌ها و جراحی‌ها ایجاد شود (۲). آسیب به پوست می‌تواند به‌دنبال تروماها، بیماری‌ها، جراحی‌ها، سوختگی‌ها و زخم‌های مزمن ایجاد شود (۳). به تخریب پیوستگی بافتی پوست و آسیب ساختمان آناتومیک و عملکردی آن بر اثر ضایعات فیزیکی مکانیکی و یا متابولیسمی، "زخم" اطلاق می‌شود (۴). زخم‌های بر اساس مدت زمان بهبودی، به دو دسته حاد و مزمن تقسیم‌بندی می‌شوند. زخم حاد معمولاً خود به خود ترمیم می‌شوند و با پیروی از یک مسیر ترمیم به موقع و منظم و با نتیجه نهایی ترمیم عملکردی و آناتومیک، به‌طور عادی پیش می‌روند و در بازه بین ۸ تا ۱۲ هفته بهبود می‌یابد و زخم‌های مزمن، زخم‌هایی هستند که در مراحل عادی بهبودی پیشرفت نمی‌کنند و نمی‌توان آنها را به موقع و منظم ترمیم کرد و بیشتر از ۱۲ هفته تداوم می‌یابند (۵). ترمیم زخم پوستی مکانیسم پیچیده‌ای از عملکرد سلولی را نشان می‌دهد. در فرآیند ترمیم و بسته شدن ضایعه، برهمکنش عوامل مختلفی چون سلول‌ها، شاخص‌های رشد و سایتوکاین‌های دخیل هستند. به همین دلیل، نیاز به مطالعات متعددی جهت دستیابی به درمان‌های مؤثرتر زخم با حداقل عوارض می‌باشد. درمان زخم و بازسازی بافت یک رویکرد جدید و به سرعت در حال توسعه در تحقیقات زیست پزشکی است. هدف آن بازگرداندن پوست به عملکرد اولیه خود، بازسازی سلول‌های آسیب دیده و بافت پوست بدون ایجاد اسکار است (۶). التیام زخم‌ها فرآیندی پیچیده است که در چهار مرحله صورت می‌گیرد و این مراحل با یکدیگر هم‌پوشانی دارند: مرحله هموستاز، مرحله التهاب، مرحله تکثیر سلولی و مرحله تمایز (۷). پانسمان مدرن برای تسهیل عملکرد زخم به جای پوشاندن آن ساخته شده است. این پانسمان‌ها برای جلوگیری از کم‌آبی زخم و تسریع بهبودی متمرکز هستند. بر اساس علت و نوع زخم، محصولات متعددی در بازار موجود است که انتخاب را به یک کار بسیار دشوار تبدیل می‌کند (۸ و ۹). در سال‌های اخیر، استفاده از مواد پلیمری مانند داربست‌ها یا هیدروژل‌ها در درمان زخم‌های پوستی افزایش یافته است و به‌عنوان مواد زیستی امیدوارکننده در بهبود زخم ظهور کرده‌اند (۱۰). هیدروژل‌ها مواد آبدوست نامحلول ساخته شده از پلیمرهایی مانند کربوکسی متیل سلولز، آلژینات، و ژلاتین هستند. محتوای بالای آب هیدروژل‌ها (۷۰-۹۰ درصد) به

گرانولاسیون بافت‌ها و اپیتلیوم در یک محیط مرطوب کمک می‌کند. خاصیت ارتجاعی نرم هیدروژل‌ها پس از التیام زخم بدون هیچ آسیبی کاربرد و حذف آسان را فراهم می‌کند. دمای زخم‌های پوستی توسط هیدروژل‌ها اثر تسکین‌دهنده و خنک‌کننده دارند (۱۱). ویژگی‌های متعدد هیدروژل‌ها شامل: ساختار سه‌بعدی، نفوذپذیری خوب، زیست‌سازگاری عالی و توانایی فراهم کردن محیط مرطوب برای ترمیم زخم، آنها را به‌عنوان کاندیدای ایده‌آل برای التیام زخم تبدیل می‌کند. هیدروژل‌ها به دو دسته طبیعی شامل کلاژن، آلژینات، هیالورونیک اسید، کیتوزان و ژلاتین و سنتزی شامل PEG، PVA و PLA تقسیم می‌گردند. ژلاتین و کربوکسی متیل سلولز دو نمونه از پلیمرهای طبیعی و نیمه مصنوعی هستند که می‌توانند برای ایجاد هیدروژل‌های زیست‌پزشکی مورد استفاده قرار گیرند. ژلاتین از طریق هیدرولیز جزیی کلاژن، به‌عنوان یک پروتئین اصلی ماتریکس خارج سلولی، سازگار با سیستم‌های بیولوژیکی، عدم سمیت، سهولت اصلاح شیمیایی، در دسترس بودن و مقرون به صرفه بودن از جمله مزایای ژلاتین است. همچنین به‌دلیل توانایی‌های اسید آمینه مانند RGD، این پلیمر می‌تواند باعث ایجاد هموستاز و تحریک چسبندگی و تکثیر سلولی در طول فرآیند بهبود شود (۱۲). کربوکسی متیل سلولز (CMC)، با ایجاد بستر مرطوب و زیست‌سازگار، فرآیند ترمیم زخم را تسریع کرده و از عفونت جلوگیری می‌کند. در مهندسی بافت نیز این پلیمر به‌عنوان داربستی قابل تنظیم، باعث هدایت سلول‌ها و بازسازی مؤثر بافت آسیب‌دیده می‌شود. قابلیت تبدیل کربوکسی متیل سلولز به هیدروژل، امکان بارگذاری عوامل ترمیم‌کننده و رهایش کنترل‌شده آنها را در محل زخم فراهم می‌کند (۱۰). ژلاتین با ایجاد ساختاری زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر، داربست مناسبی برای مهاجرت و تکثیر سلول‌ها در فرآیند ترمیم زخم فراهم می‌کند. از سوی دیگر، گیاه پنیرک با داشتن ترکیبات فعال زیستی مانند موسیلاژ، فلاونوئیدها و تانن‌ها، با ایجاد یک لایه محافظ روی زخم ضمن حفظ رطوبت، باعث کاهش التهاب و جلوگیری از عفونت‌های باکتریایی می‌شود و روند بهبود را تسریع می‌کند (۱۳). گیاه پنیرک (*Malva sylvestris* L.) به‌طور گسترده در محیط‌های معتدل پراکنده بوده و به‌عنوان یک گیاه دارویی وحشی از مدت‌ها قبل در طب سنتی استفاده شده است. این گیاه به‌دلیل محتوای غنی فنولیک و فلاونوئیدی خود به‌طور گسترده در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی نیز کاربرد دارد. از ویژگی‌های این گیاه می‌توان به اثرات ضدالتهابی آن اشاره کرد که به مهار فعالیت پروستاگلاندین و ترومبوکسان A2 مرتبط است و این خاصیت در عصاره گل و برگ این گیاه وجود دارد، همچنین گزارش شده است که این گیاه فعالیت ضد میکروبی نیز دارد و در محیط کشت علیه میکروارگانیسم‌هایی مانند *Staphylococcus aureus* و *Corynebacterium* دارد، که در ترمیم زخم نقش مؤثری را ایفا می‌کند

تخریب شده است، اندازه گیری می شود. درصد همولیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه می گردد، که در آن کنترل منفی نرمال سالین (بدون همولیز) و کنترل مثبت، آب مقطر (همولیز کامل) می باشد (۱۷).

فرمول ۱:

جذب کنترل مثبت - جذب کنترل منفی / جذب نمونه - جذب کنترل منفی = % همولیز

در این مطالعه، تست BCI یک شاخص آزمایشگاهی برای بررسی اثر مواد سنتزی در هنگام تماس مستقیم با خون است و میزان درصد انعقادی هر ماده به صورت مقایسه ای بررسی می شود. مطابق رفرنس معتبر، تست BCI بدین ترتیب انجام شد (۱۸). در این تست، ابتدا خون در لوله های حاوی سیترات جمع آوری شده و نمونه های داربست یا ماده مورد نظر (۱۰۰ میلی گرم) در حمام آب ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می گیرند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر خون به نمونه ها اضافه شده و پس از ۵ دقیقه، ۲۰ میکرولیتر کلسیم کلراید ۰/۲ مولار به آن افزوده می شود. مجدداً پس از ۵ دقیقه، ۲۵ میلی لیتر آب مقطر به نمونه ها اضافه شده و جذب نوری در ۵۴۵ نانومتر خوانده می شود. شاخص BCI از فرمول زیر محاسبه می گردد، که در آن کنترل شامل ۱۰۰ میکرولیتر خون به همراه ۲۵ میلی لیتر آب مقطر است. هر چه مقدار BCI کمتر باشد، ماده توانایی بیشتری در تسریع انعقاد خون دارد و اثر هموستاتیک بهتری از خود نشان می دهد.

فرمول ۲

$100 \times \text{جذب نمونه} \div \text{جذب کنترل} = (\%) \text{ شاخص لخته شدن خون}$

برای ارزیابی جذب خون، وزن اولیه نمونه های خشک هیدروژل ثبت و سپس خون تازه حاوی ماده ضد انعقاد (مانند سیترات سدیم) تهیه شده و حجم مشخصی از آن (مثلاً ۱۰۰۰ میکرولیتر) روی هر نمونه ریخته می شود تا کاملاً پوشانده شود. نمونه ها به مدت معین (مثلاً ۵، ۱۰، ۱۵ یا ۳۰ دقیقه) در دمای ۳۷ درجه انکوبه می شوند. پس از انکوباسیون، نمونه ها خارج شده، خون جذب نشده از سطح آن ها گرفته می شود و وزن نمونه حاوی خون اندازه گیری می گردد. میزان جذب خون به صورت میلی گرم بر سانتی متر مربع یا درصد افزایش وزن نسبت به وزن خشک محاسبه می شود و هر آزمون سه بار تکرار می گردد.

برای تعیین توانایی جذب آب، نمونه های هیدروژل خشک ابتدا توزین شده و سپس در بافر فسفات سالین با pH=۷/۴ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد غوطه ور می شوند. در فواصل زمانی مشخص (مانند ۱، ۲، ۴، ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت)، نمونه ها از محیط خارج شده، آب سطحی آن ها با کاغذ صافی گرفته می شود و وزن مرطوب اندازه گیری می گردد. درصد جذب آب از اختلاف وزن مرطوب و خشک تقسیم بر وزن خشک ضرب در ۱۰۰ محاسبه می شود و هر آزمایش سه بار تکرار می گردد. گزارش به صورت فراوانی تجمعی محاسبه شد.

(۱۴ و ۱۵). با توجه به خواص ضدالتهابی، ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی گیاه پنیرک و پتانسیل هیدروژل های کربوکسی متیل سلولز/ژلاتین به عنوان داربست های زیست سازگار و زیست تخریب پذیر در مهندسی بافت، این مطالعه به بررسی اثر هیدروژل کربوکسی متیل سلولز/ژلاتین حاوی عصاره گیاه پنیرک بر روی زخم تمام ضخامت موش صحرایی می پردازد.

مواد و روش ها

کربوکسی متیل سلولز (CMC)، ژلاتین، محیط کشت (DMEM)، سرم جنین گاوی (FBS) و فسفات بافر سالین (PBS)، از مرک تهیه شد. همچنین، گیاه پنیرک (*Malva sylvestris*)، از عطاری محلی شاهرود خریداری شد. رت های ویستار از دانشگاه علوم پزشکی شاهرود خریداری شد.

تهیه عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک به روش پرکولاسیون بدین صورت انجام پذیرفت: ابتدا گیاه پنیرک خشک و پودر شده (۱۰۰ گرم) در یک حلال هیدروالکلی (مخلوط اتانول و آب با نسبت مشخص ۸۰:۲۰) خیسانده شد. سپس مخلوط در یک ستون استوانه ای (پرکولاتور) قرار داده شده و حلال تازه به آرامی از بالای ستون عبور داده شد. حلال با عبور از میان پودر گیاه، ترکیبات محلول را در خود حل می کند و از پایین ستون خارج می شود. این فرآیند تا زمانی ادامه می یابد که ترکیبات مؤثر به طور کامل استخراج شوند. در نهایت، عصاره بدست آمده حاوی ترکیبات مؤثر، جمع آوری شده و در نهایت توسط روتاری تغلیظ و خشک شد (۱۶).

هیدروژل ژلاتین (۲٪ وزنی-حجمی) و کربوکسی متیل سلولز (۴٪ وزنی-حجمی) (CMC-Gel) با حل کردن پودر پلیمر در آب دیونیزه تهیه شد. عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک (۵٪ وزنی-حجمی) به محلول اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت بر روی استیرر قرار داد شده تا محلولی همگن به دست آید.

جهت بررسی ساختار و مورفولوژی داربست هیدروژلی تهیه شده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) استفاده شد. نمونه های فریزدراي شده بر روی پایه آلومینیومی جهت پوشش دهی با طلا قرار داده شد و سپس با میکروسکوپ الکترونی (دانشگاه امیر کبیر) مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون همولیز یا blood compatibility نشانگر مقدار آزاد شدن هموگلوبین به پلاسما به علت آسیب اریتروسیت هاست و مستقیماً به خون سازگاری مواد مرتبط است. برای انجام تست همولیز، نمونه مورد نظر با خون کامل یا خون رقیق شده (معمولاً با نسبت ۱:۱۰ در نرمال سالین) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه می شود. سپس نمونه ها سانتریفیوژ شده و جذب نوری مایع رویی (سوپرنانت) در طول موج ۵۴۵ نانومتر که مربوط به هموگلوبین آزاد شده از گلبول های

فرمول ۳:

$$W1-W0 / W0 \times 100 = (\%WA) \text{ جذب آب}$$

وزن خشک هیدروژل = $W0$ ، وزن جذب شده هیدروژل = $w1$

از دست دادن وزن هیدروژل ها (weight loss)

برای اندازه گیری زمان تخریب هیدروژل، ابتدا هیدروژل های فریزدراى شده به یک ضخامت برش می خوردند. سپس، وزن های اولیه هیدروژل ها اندازه گیری شده، در مرحله بعد در محلول PBS قرار داده شده و پس از زمان های مشخص، هیدروژل ها در دمای ۴۰ درجه خشک کرده و وزن نهایی را اندازه خواهیم گرفت. Wf نشان دهنده وزن نهایی و $W0$ وزن اولیه را نشان می دهد.

فرمول ۴:

$$(W0 - Wf) / W0 \times 100 (wl\%) \text{ از دست رفتن وزن}$$

تغییرات pH محلول پس از غوطه ور شدن نمونه های هیدروژل آماده شده در PBS (pH 7.4) در فواصل مختلف ۱، ۳، ۶، ۱۲ و ۱۸ ساعت با استفاده از pH متر (Mettler Toledo, S220 SevenCompact) بررسی شده و با نرم افزار پریزم نمودار مربوطه ترسیم می شود.

به منظور بررسی اثر زنده ماندن سلول روی هیدروژل های سنتز شده، بررسی اثر عصاره حاوی ترکیب تهیه شده بر روی زنده ماندن سلول فیبروبلاست موش 3T3 صورت گرفت. کشت سلول می تواند برای مطالعه ی بافت و ماده به کار رود. حساسیت فوق العاده ی سلول ها نسبت به مواد سمی، امکان برهمکنش های خاص در سلول و انجام آزمایشات متعدد در شرایط معین از مزایای کشت سلول است. بعلاوه در این روش می توان آزمایشات را بر روی سلول های انسانی نیز انجام داد. از آنجا که سلول های فیبروبلاست موش به صورت رده سلولی پیوسته درآمده است از آن به عنوان الگوی سلول یوکاریوت مشابه سلول های فیبروبلاست انسانی استفاده می گردد. لذا در این تحقیق دودمان سلولی 3T3 (۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک)، فراهم شد. این سلول ها موفولوژی دوکی شکلی داشته و کشت این سلول ها در محیط DMEM با غلظت بالای گلوکز، غنی شده با سرم جنین گوساله (FBS) ۱۰٪ و آنتی بیوتیک پنی سیلین / استرپتومایسین ۱٪ (پن-استرپ)، انجام شد. این تست به عنوان زیست سازگاری سلولی یا زنده ماندن سلولی با روش MTT assay صورت گرفت. عموماً تست MTT در پلیت های چندخانه و با تکرار زیاد انجام می شود و عمل خوانش در جذب ۵۰۰-۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه پلیت ریدر یا الیزا ریدر خوانده می شود.

فرمول ۵:

$$100 \times \text{جذب نوری کنترل} / \text{جذب نوری نمونه} = \text{زنده ماندن سلولی}$$

در این مطالعه از ۱۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد که در شرایط استاندارد (دمای ۲۲ ± ۲ درجه سانتی گراد، چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته و دسترسی آزاد به آب و

غذا) نگهداری شدند. تمامی مراحل کار با تأیید کمیته اخلاق در پژوهش های زیست پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شاهرود (با کد اخلاق IR.SHMU.AEC.1401.006) انجام پذیرفت. موش ها به طور تصادفی به سه گروه (هر گروه $n=4$) شامل گروه کنترل منفی (زخم بدون هیچ درمانی)، گروه هیدروژل (CMC-Gel) و گروه CMC-Gel-Malva (دریافت هیدروژل کربوکسی متیل سلولز/ژلاتین حاوی عصاره هیدروالکلی پنیرک) تقسیم شدند. برای القای بیهوشی، ترکیب زایلازین (۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و کتامین (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. پس از بیهوشی کامل، ناحیه پستی موش ها ضد عفونی شده و یک زخم تمام ضخامت مربع به قطر ۱/۵×۱/۵ سانتی متر با استفاده از تیغ و قیچی جراحی در ناحیه پشت ایجاد گردید. در گروه های درمانی، هیدروژل ها روزانه یک بار به صورت موضعی روی زخم اعمال شدند و درمان تا روز ۱۴ انجام شد. جهت تسکین درد پس از عمل، کتوپروفن با دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت عضلانی و به مدت سه روز اول تجویز شد. در روز ۱۴ جهت بررسی هیستولوژی و ترمیم زخم بافت ها موش با دوزی دو برابر کتامین -زایلوزین استفاده در بیهوشی آسان کشی شدند.

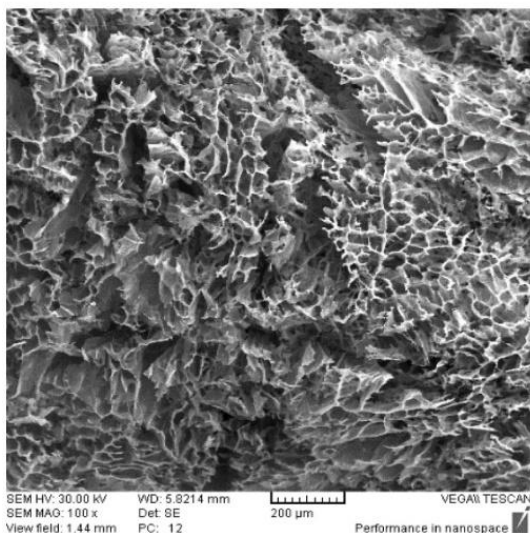
۱۴ روز پس از ایجاد زخم، نمونه های بافتی از ناحیه زخم و بافت اطراف برداشته شد. نمونه ها در فرمالین بافر ۱۰٪ تثبیت شده، سپس در پارافین قالب گیری و برش هایی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه گردید. مقاطع با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین (H&E) جهت بررسی درجه بازسازی اپیتلیوم (اپیتلیالیزاسیون مجدد)، ضخامت بافت گرانوله، و میزان تشکیل عروق جدید (آنژیوژنز) مورد ارزیابی قرار گرفتند. داده ها با استفاده از نرم افزار پریزم نسخه ۹ (یا GraphPad Prism) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. طبیعی بودن توزیع داده ها با آزمون شاپیرو-ویلک تأیید شد. برای مقایسه بین گروه ها در زمان های مختلف از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و به دنبال آن آزمون تعقیبی توکی (Tukey's post hoc) استفاده گردید. سطح معنی داری ۰/۰۵ و $P<0/05$ به عنوان اختلاف آماری معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد (Mean $\pm$ SEM)، گزارش گردید.

نتایج

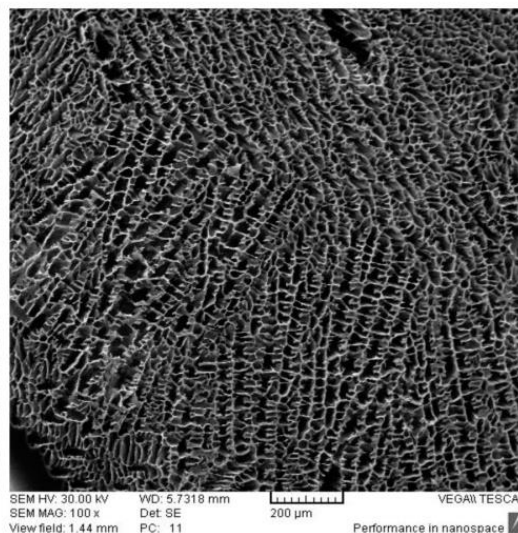
تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) برای بررسی مورفولوژی سطحی هیدروژل های تهیه شده شامل گروه CMC-Gel (هیدروژل کربوکسی متیل سلولز/ژلاتین بدون عصاره) و CMC-Gel-Malva (هیدروژل حاوی عصاره هیدروالکلی پنیرک) مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که هیدروژل CMC-Gel دارای سطحی نسبتاً صاف، یکنواخت و با تخلخل کم بود. در مقابل، هیدروژل CMC-Gel-Malva ساختاری متخلخل تر، سطحی زبرتر و ناهمگن با حفرات بیشتر

افزایش سطح تماس، بهبود نفوذپذیری، جذب رطوبت و رهایش کنترل شده عوامل درمانی کمک کند. به طور کلی، افزودن عصاره پنیرک موجب ایجاد یک شبکه سه بعدی با تخلخل بالاتر شد که برای کاربردهای مهندسی بافت و ترمیم زخم مطلوب است (شکل ۱).

CMC-Gel

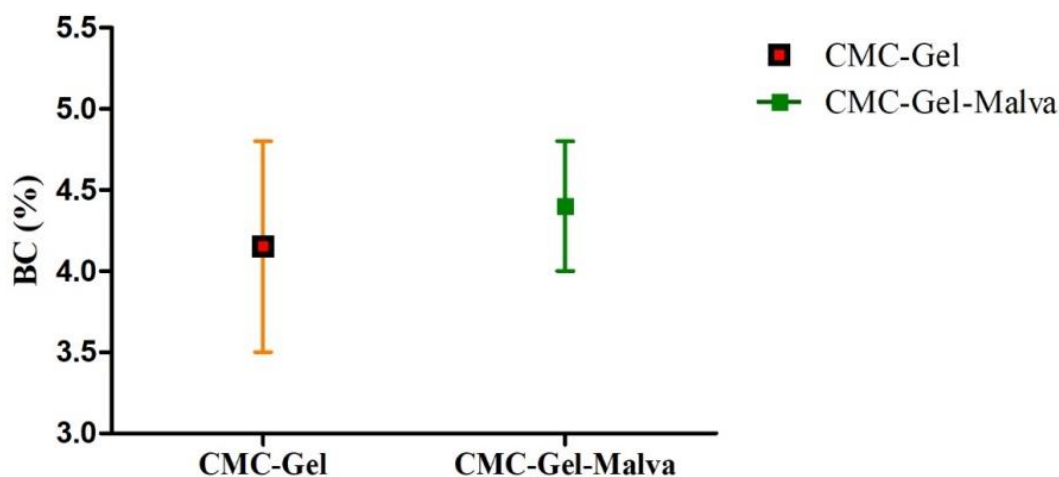


CMC-Gel-Malva



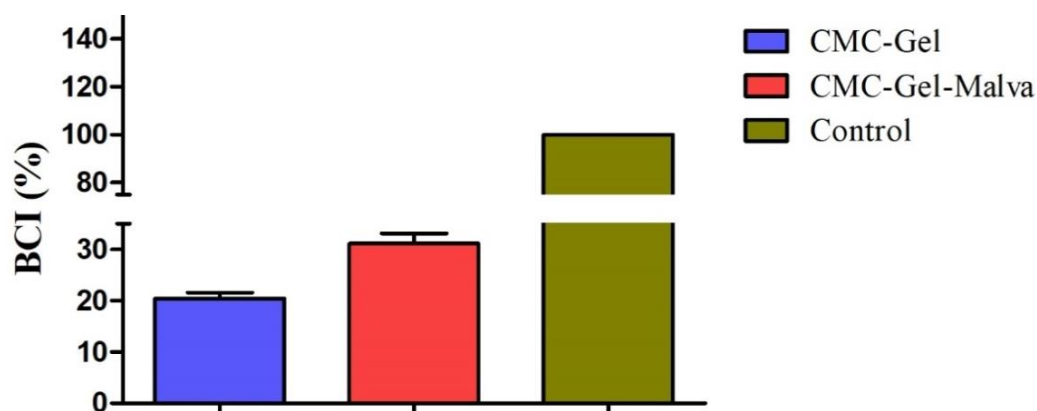
شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از سطح هیدروژل‌ها

(الف) هیدروژل CMC-Gel (کربوکسی متیل سلولز/ژلاتین بدون عصاره) با سطح نسبتاً صاف و تخلخل کم. (ب) هیدروژل CMC-Gel-Malva (حاوی عصاره هیدروآلکلی پنیرک) با ساختار متخلخل تر، سطح زبرتر و حفرات به هم پیوسته. بزرگمایی: [×۱۰۰].

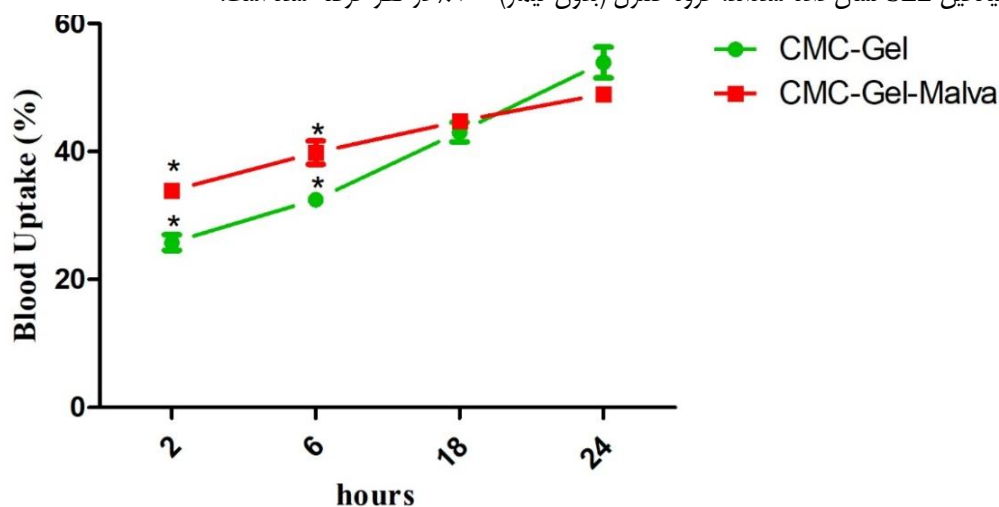


شکل ۲- مقایسه درصد همولیز (Hemolysis Rate) گروه‌های CMC-Gel و CMC-Gel-Malva

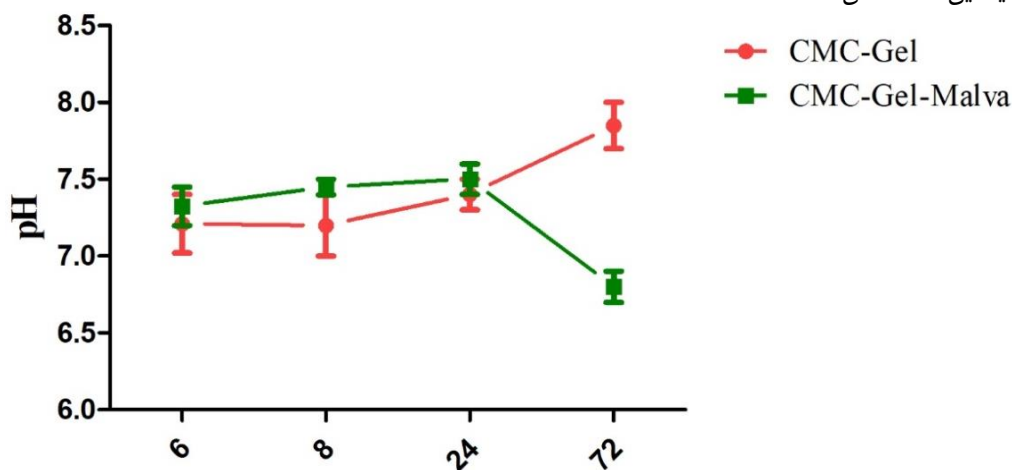
داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ SE نشان داده شده‌اند. هر دو گروه میزان همولیز کمتر از ۵٪ دارند که نشانگر زیست‌سازگاری خونی مطلوب است.



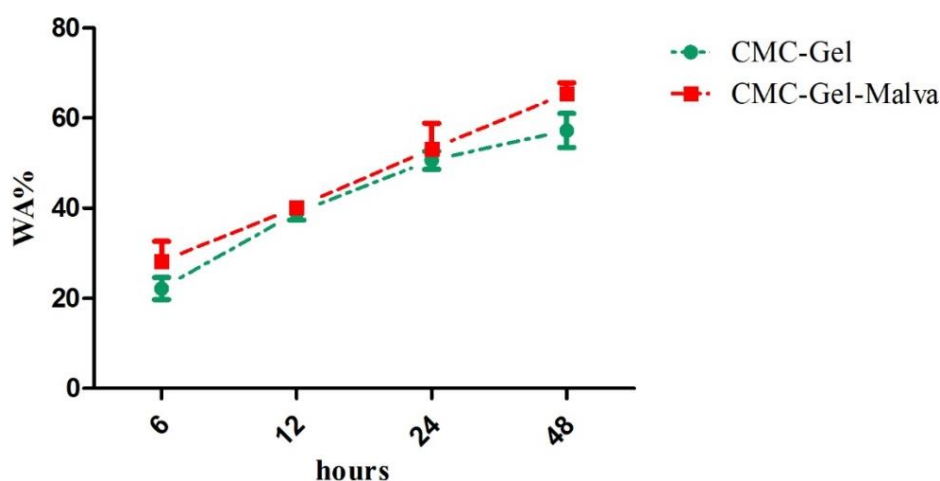
شکل ۳- مقایسه شاخص لخته شدن خون (BCI) گروه‌های کنترل، CMC-Gel (هیدروژل) و CMC-Gel-Malva (هیدروژل حاوی پنیرک) داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ SE نشان داده شده‌اند. گروه کنترل (بدون تیمار) ۱۰۰٪ در نظر گرفته شده است.



شکل ۴- ظرفیت جذب خون (blood uptake capacity) گروه‌های CMC-Gel (هیدروژل) و CMC-Gel-Malva (هیدروژل حاوی پنیرک) در زمان‌های ۲، ۶، ۱۸ و ۲۴ ساعت داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ SE نشان داده شده‌اند.

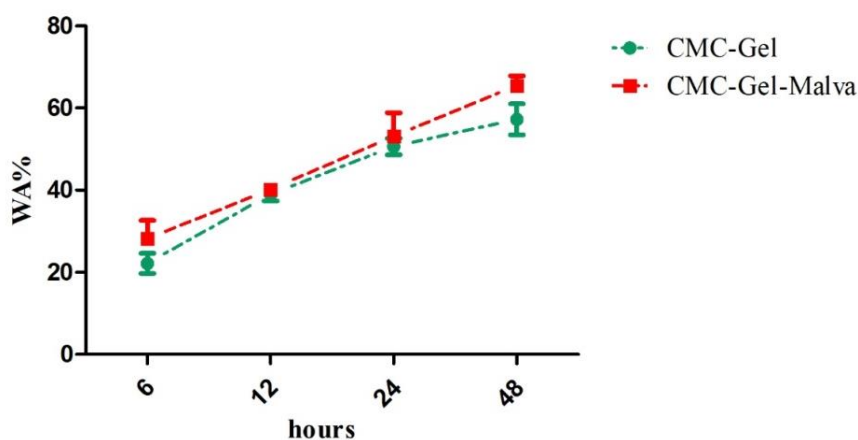


شکل ۵- مقایسه pH گروه‌های CMC-Gel (هیدروژل) و CMC-Gel-Malva (هیدروژل حاوی پنیرک) در چهار زمان مجزا



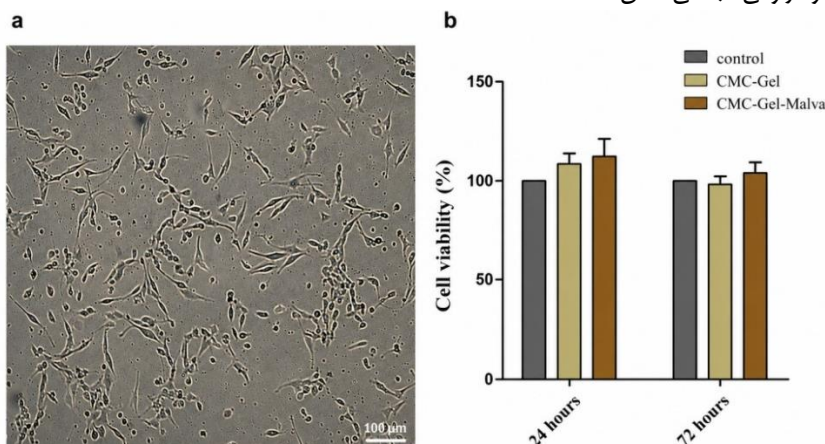
شکل ۶- مقایسه ظرفیت جذب آب (water uptake) گروه‌های CMC-Gel (هیدروژل) و CMC-Gel-Malva (هیدروژل حاوی عصاره پنیرک) در چهار زمان مختلف ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸

داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ SE و فراوانی تجمعی نشان داده شده‌اند.



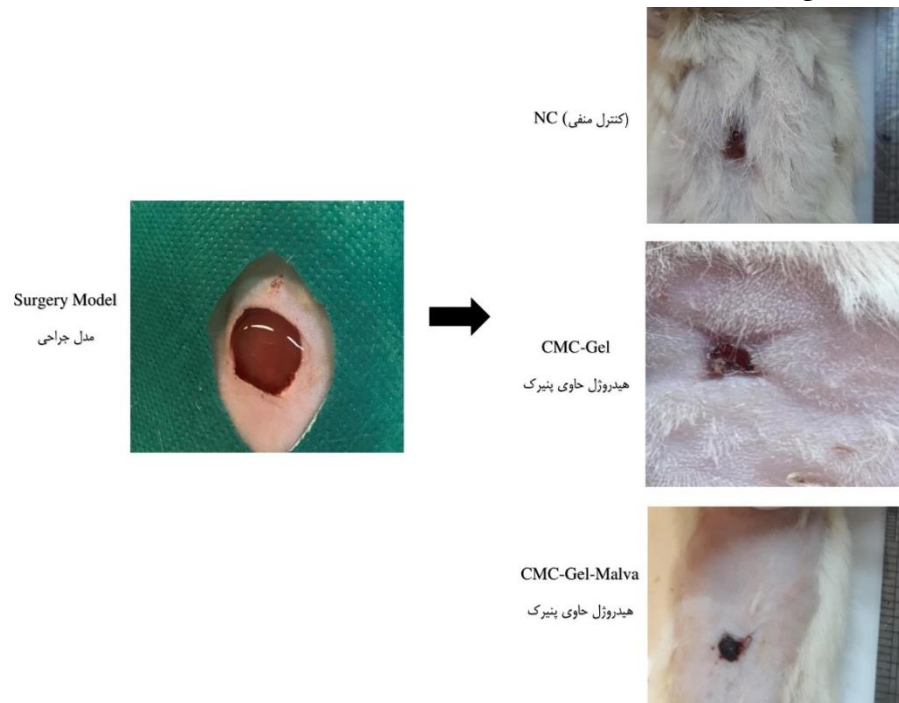
شکل ۷- مقایسه زیست تخریب پذیری (درصد کاهش وزن) گروه‌های CMC-Gel (هیدروژل) و CMC-Gel-Malva (هیدروژل حاوی عصاره پنیرک) در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ ساعت

داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ SE و فراوانی تجمعی نشان داده شده‌اند.

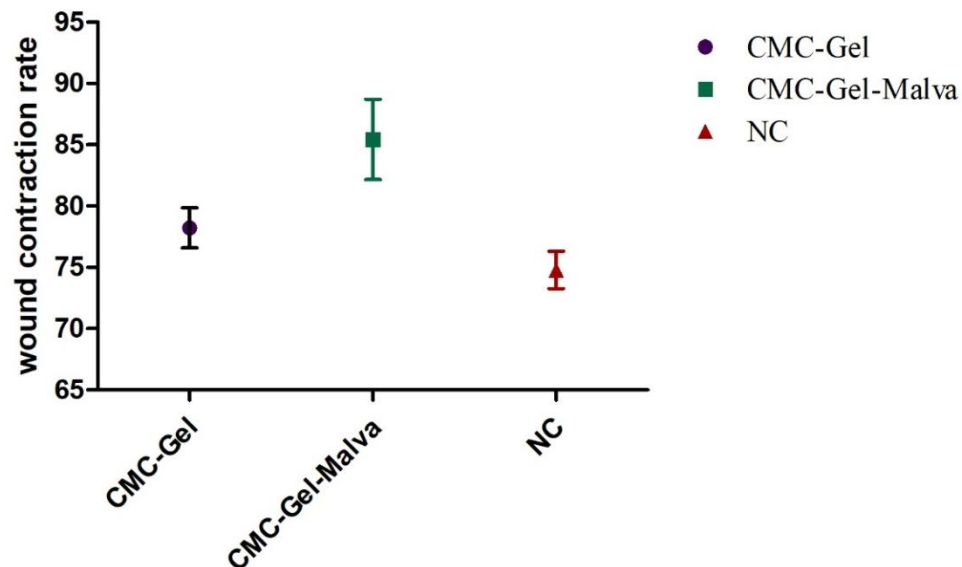


شکل ۸- مورفولوژی سلول پس از کشت هیدروژل (a) مقایسه زنده‌مانی سلول‌ها در گروه‌های کنترل (b)، هیدروژل (CMC-Gel) و هیدروژل حاوی پنیرک (CMC-Gel-Malva) در زمان‌های ۲۴ و ۷۲

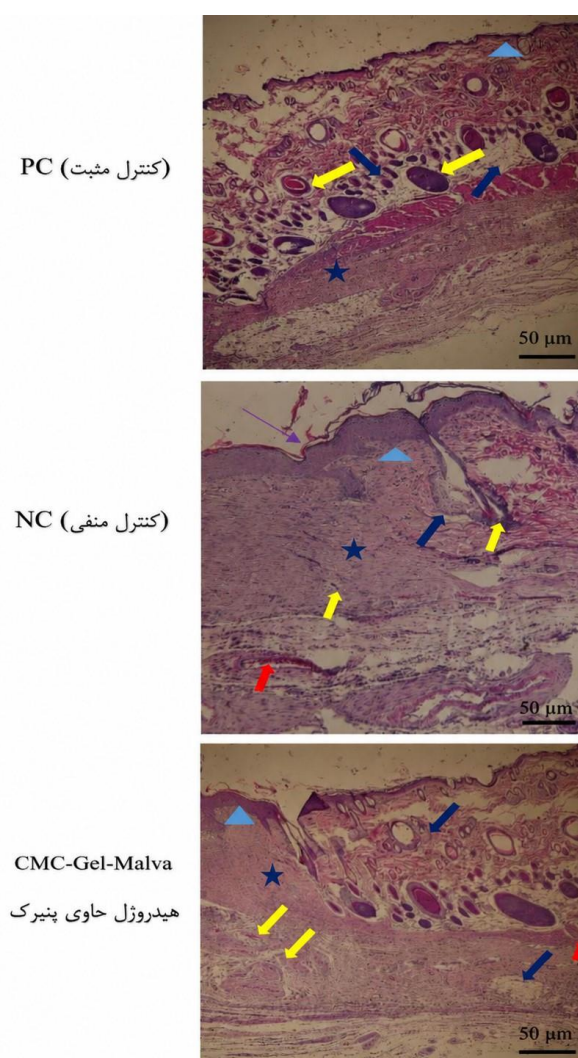
ساعت‌ها به صورت میانگین $\pm SE$ نشان داده شده‌اند.



شکل ۹- مقایسه روند ترمیم زخم در گروه کنترل منفی NC (بدون درمان) و گروه درمان با هیدروژل و هیدروژل حاوی عصاره پنیرک (CMC-Gel-Malva)



شکل ۱۰- مقایسه درصد بسته شدن زخم در روز ۱۴ بین گروه‌های تیمار شده با کنترل منفی، CMC-Gel (هیدروژل) و CMC-Gel-Malva (هیدروژل حاوی عصاره پنیرک) در مدل حیوانی داده‌ها به صورت میانگین $\pm SE$ (n=3) نشان داده شده‌اند.



شکل ۱۱- مقایسه هیستوپاتولوژی رنگ آمیزی هماتوکسیلین و انوزین، بافت پوست در گروه‌های کنترل منفی، کنترل مثبت (PC) و تیمار شده با هیدروژل حاوی پنیرک (CMC-Gel-Malva)
 علایم: فلش ضخیم آبی = غدد چربی، فلش ضخیم زرد = فولیکول مو، فلش ضخیم قرمز = عروق خونی، ستاره آبی = کلاژن، سر فلش آبی = اپیتلیوم، فلش نازک بنفش = لایه کراستی (اسکب)، 100X

سازگاری خونی هر دو هیدروژل می‌باشد. گروه CMC-Gel-Malva میانگین همولیز کمی بالاتر (0.40 ± 0.04) در مقابل (0.65 ± 0.04) نشان داد، اما اختلاف ناچیز است. افزودن عصاره پنیرک به هیدروژل افزایش قابل توجهی در همولیز ایجاد نمی‌کند و هر دو فرمولاسیون برای کاربردهای زیستی از نظر تخریب گلبول قرمز ایمن محسوب می‌شوند. در مطالعه درصد شاخص لخته شدن خون، هر دو هیدروژل باعث کاهش چشمگیر شاخص لخته شدن خون در مقایسه با گروه کنترل شدند. گروه CMC-Gel (هیدروژل) میانگین BCI کمتری 1.14 ± 2.04 نسبت به گروه حاوی پنیرک 3.10 ± 2.03 نشان داد، که این اختلاف با توجه به SEها قابل توجه است. بنابراین افزودن پنیرک به

خون یکی از پیچیده‌ترین و حیاتی‌ترین مایعات در بدن موجودات زنده محسوب می‌شود و اجزای مختلف آن عملکردهای بسیار مهمی را در بدن ایفا می‌کنند. به همین دلیل هر عاملی که منجر به تغییر شاخص‌ها و اجزای خونی در بدن شود می‌تواند آسیب جدی و قابل توجهی را برای انسان به همراه داشته باشد. لخته شدن خون، یا انعقاد، فرایند مهمی است که از خونریزی بیش از حد در هنگام آسیب دیدن رگ خونی جلوگیری می‌کند. در آزمون همولیز، هر چه مقدار درصد همولیز کمتر باشد، خون سازگاری بهتر ماده و یا هیدروژل را نشان می‌دهد. معیار تا ۵ درصد گزارش شده همولیز نشان‌دهنده درصد بالای زیست سازگاری و مجاز بودن استفاده از آن ماده را بیان می‌کند (۱۹). میزان همولیز در هر دو گروه پایین و در محدوده کمتر از ۵٪ است که نشان‌دهنده

(۴ تا ۱۲ ساعت) افزایش می‌دهد، اما در نهایت در ۲۴ ساعت هر دو گروه به تخریب مشابهی می‌رسند. بنابراین پنیرک باعث تسریع تخریب بدون تغییر در میزان نهایی تخریب پذیری می‌شود (شکل ۷).

ارزیابی مورفولوژی نشان داد که سلول‌ها مورفولوژی طبیعی دوکی‌شکل (فیبروبلاست مانند) خود را حفظ کرده (شکل ۸.a) و چسبندگی و گسترش مناسبی روی سطح داشتند که بیانگر زیست‌سازگاری مطلوب مواد مورد بررسی است. نتایج زنده‌مانی سلولی در زمان ۲۴ ساعت، هر دو تیمار CMC-Gel و CMC-Gel-Malva باعث افزایش زنده‌مانی سلول‌ها نسبت به گروه کنترل شدند (به ترتیب $1/6 \pm 111/3$ و $6/9 \pm 113/9$ درصد). با این حال، در زمان ۷۲ ساعت، زنده‌مانی در گروه CMC-Gel اندکی کاهش یافت ($99/27/4$ درصد) که تفاوت معنی‌داری با کنترل ندارد، در حالی که گروه حاوی پنیرک (CMC-Gel-Malva) همچنان زنده‌مانی بالاتری نسبت به کنترل نشان داد ($107/2 \pm 11/65$ درصد). این الگو حاکی از اثر محافظتی پایدارتر عصاره پنیرک در ترکیب با هیدروژل است، در حالی که CMC-Gel به تنهایی اثر محافظتی خود را پس از ۷۲ ساعت از دست می‌دهد (شکل ۸.b).

در بررسی ماکروسکوپی زخم‌ها، همان‌طور که شکل ۹ نشان می‌دهد، در گروه کنترل منفی، زخم هنوز به‌طور کامل بسته نشده است. مساحت زخم نسبتاً بزرگ، با حضور دلمه (اسکب) ضخیم و اطراف زخم قرمزی و التهاب خفیف تا متوسط دیده می‌شود. روند ترمیم کندتر بوده و بافت گرانولاسیون ناکافی است در گروه CMC-Gel (هیدروژل بدون عصاره پنیرک)، زخم نسبت به کنترل منفی کوچک‌تر بوده اما هنوز کامل بسته نشده است. دلمه (اسکب) تشکیل شده ضخامت متوسط دارد؛ نه به ضخامت گروه کنترل منفی و نه به کیفیت گروه حاوی پنیرک. التهاب خفیف تا متوسط در اطراف زخم دیده می‌شود که از گروه کنترل منفی کمتر ولی از گروه CMC-Gel-Malva بیشتر است. حاشیه زخم نسبتاً صاف اما کاملاً منظم نیست و بافت گرانولاسیون بهتر از کنترل منفی، اما هنوز ناکافی می‌باشد. از طرفی در گروه (CMC-Gel-Malva) هیدروژل حاوی پنیرک، زخم به میزان قابل توجهی کوچک‌تر شده و تقریباً به‌طور کامل اپیتلیالیزه شده است. دلمه نازک، حاشیه زخم صاف و بدون التهاب واضح است. ترمیم پیشرفته و بسته شدن زخم در مقایسه با کنترل منفی به وضوح بهتر می‌باشد. در نهایت، هیدروژل حاوی پنیرک (CMC-Gel-Malva) باعث تسریع ترمیم زخم در روز ۱۴ نسبت به گروه کنترل منفی شده است. همچنین، بر اساس داده‌های حاصل از عکس‌های حیوانی در روز ۱۴، درصد بسته شدن زخم در گروه کنترل منفی $3/54 \pm 74/078$ در گروه CMC-Gel (هیدروژل) برابر $1/64$ و در گروه CMC-Gel-Malva (هیدروژل حاوی عصاره پنیرک) برابر $3/27 \pm 85/44$ محاسبه شد. این نتایج نشان می‌دهد که

هیدروژل باعث افزایش BCI (یعنی کاهش تمایل به لخته شدن) در مقایسه با گروه هیدروژل می‌شود (شکل ۳).

در بررسی میزان جذب خون نمونه‌ها، در تمام زمان‌های اولیه (۲ و ۶ ساعت)، گروه CMC-Gel-Malva جذب خون بالاتری نسبت به CMC-Gel نشان داد (به ترتیب $1/02 \pm 33/9$ در مقابل $1/2 \pm 25/8$ در ساعت ۲ و $1/8 \pm 39/9$ در مقابل $1/02 \pm 32/5$ در ساعت ۶). در ساعت ۱۸، هر دو گروه مقادیر نزدیکی داشتند ($1 \pm 44/7$ و $1/53 \pm 43/0$). اما در ساعت ۲۴، هیدروژل بدون پنیرک (CMC-Gel) به حداکثر جذب ($2/42 \pm 53/9$) رسید در حالی که گروه حاوی عصاره پنیرک کاهش نسبی داشت ($1 \pm 49/0$). این الگو نشان می‌دهد که افزودن عصاره پنیرک جذب خون را در مراحل اولیه تسریع می‌کند، اما در درازمدت (۲۴ ساعت) هیدروژل خالص ظرفیت جذب بالاتری از خود نشان می‌دهد (شکل ۴).

در بررسی نتایج pH، مقادیر pH در گروه CMC-Gel در محدوده $7/2$ تا $7/8$ قرار دارد که نشان‌دهنده محیط خنثی تا کمی قلیایی است و روند افزایشی ملایمی در اندازه‌گیری‌های آخر دیده می‌شود. در گروه CMC-Gel-Malva، سه اندازه‌گیری اول pH بین $7/3$ تا $7/5$ (نزدیک به محدوده خنثی) هستند، اما اندازه‌گیری چهارم کاهش قابل توجهی به $6/08 \pm 0/10$ نشان می‌دهد که به سمت اسیدی‌تر شدن متمایل است. این الگو حاکی از آن است که افزودن عصاره پنیرک (Malva) ممکن است در برخی شرایط pH را کاهش دهد، در حالی که هیدروژل، CMC-Gel، pH را پایدارتر و کمی بالاتری حفظ می‌کند (شکل ۵).

در بررسی آزمون جذب آب، در تمام مراحل اندازه‌گیری، گروه CMC-Gel-Malva (حاوی عصاره پنیرک) مقادیر جذب آب بالاتری نسبت به گروه CMC-Gel به تنهایی نشان داد. این اختلاف در مرحله اول ($4/48 \pm 28/16$ در مقابل $2/47 \pm 22/17$) و به‌ویژه در مرحله آخر ($2/27 \pm 65/53$ در مقابل $3/79 \pm 57/27$) مشهودتر است. هر دو گروه روند افزایشی وابسته به زمان در جذب آب داشتند، اما افزودن عصاره پنیرک باعث افزایش ظرفیت جذب آب در تمام نقاط زمانی شد. این یافته حاکی از آن است که پنیرک (Malva) خاصیت هیدروفیلی را در هیدروژل تقویت می‌کند. داده‌ها به‌صورت فراوانی تجمعی گزارش می‌شود (شکل ۶).

در بررسی نتایج از دست دادن وزن، در تمام زمان‌ها، گروه CMC-Gel-Malva (حاوی عصاره پنیرک) کاهش وزن بیشتری نسبت به هیدروژل CMC-Gel نشان داد، به‌ویژه در زمان ۶ ساعت ($4/55 \pm 43/05$ در مقابل $2/18 \pm 27/48$) و ۱۲ ساعت ($5/05 \pm 41/96$ در مقابل $7/22 \pm 36/28$). در زمان ۲۴ ساعت، هر دو گروه مقادیر نزدیکی داشتند ($1/8 \pm 59/00$ و $2/11 \pm 57/39$). این الگو نشان می‌دهد که افزودن پنیرک سرعت زیست‌تخریب‌پذیری هیدروژل را در مراحل اولیه

MTT بر روی رده سلولی فیبروبلاست، مدل حیوانی زخم پوستی در موش صحرایی ویستار، بررسی هیستوپاتولوژی با رنگ آمیزی H&E و مستندسازی ظاهری ترمیم زخم در روز ۱۴ می‌باشد. مطابق با هدف کلی مطالعه، انتظار می‌رود هیدروژل حاوی عصاره پنیرک (و به ویژه همراه با ژلاتین) نسبت به هیدروژل بدون عصاره و گروه کنترل، جذب آب بالاتر، تخریب کنترل شده، سمیت سلولی و خونی پایین (همولیز <۵٪)، بسته شدن سریع‌تر زخم در روز ۱۴ (بیش از ۸۰٪) و بهبود شاخص‌های هیستولوژیک مانند افزایش کلاژن، آنژیوژن و بازسازی فولیکول مو و غدد چربی را نشان دهد که تأییدکننده کارایی بالاتر این پانسمان طبیعی در ترمیم زخم پوستی است.

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که ساختار متخلخل و به هم پیوسته هیدروژل‌ها نقشی اساسی در جذب اگرودا، تبادل گازی و مهاجرت سلولی ایفا می‌کند (۲۱). در پژوهش حاضر، تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان‌دهنده تشکیل شبکه‌ای سه‌بعدی با تخلخل مناسب در هر دو گروه هیدروژل CMC-Gel و هیدروژل حاوی عصاره پنیرک CMC-Gel-Malva بود. افزودن عصاره پنیرک ظاهراً ساختار متخلخل را حفظ کرده و تغییری مخرب در مورفولوژی ایجاد نکرد. این یافته با گزارش‌های پیشین هم‌راستا است که نشان داده‌اند ترکیب پلیمرهای طبیعی با عصاره‌های گیاهی می‌تواند بدون برهم زدن یکپارچگی ساختاری، خواص زیستی هیدروژل را بهبود بخشد (۲۲ و ۲۳). تست همولیز نشانگر میزان آسیب سلول‌های اریتروسیت هاست و مستقیماً به خون سازگاری مواد مرتبط است، که مقدار استاندارد آن زیر ۵ درصد گزارش شده است (۱۷). در این مطالعه، میزان همولیز در گروه‌های هیدروژل CMC-Gel و هیدروژل حاوی عصاره پنیرک CMC-Gel-Malva، هر دو کمتر از ۵٪ بود که طبق استانداردهای رایج، محدوده مجاز برای کاربردهای زیستی محسوب می‌شود. این یافته با نتایج بلخودجا و همکاران که خاصیت خون سازگاری و همولیز بسیار کم، عصاره پنیرک را گزارش کردند، همخوانی دارد و نشان‌دهنده ایمنی خونی هیدروژل حاوی پنیرک است (۲۴). شاخص کل انعقاد خون (BCI) در درجه اول اثر انعقادی پانسمان‌ها را منعکس می‌کند (۱۸). هر چه BCI کمتر باشد، اثر انعقادی پانسمان بهتر است. چون زمان انعقاد خون سریع‌تر می‌شود پس ایندکس هر چه کمتر باشد نشان‌دهنده انعقادکننده بهتر بودن ماده یا داربست یا هیدروژل ما می‌باشد. در مورد شاخص لخته‌شدن خون (BCI)، هر دو هیدروژل کاهش چشمگیری نسبت به گروه کنترل (۱۰۰٪) ایجاد کردند. گروه حاوی پنیرک BCI بالاتری (یعنی تمایل به لخته شدن کمتر) نسبت به هیدروژل خالص نشان داد. این پدیده ممکن است به وجود تانن‌ها و ترکیبات فنلی در عصاره پنیرک مرتبط باشد. اگرچه BCI بالاتر از نظر بالینی ممکن است برای کنترل خونریزی مفید باشد، اما مقادیر هر دو گروه همچنان در محدوده مطلوب

افزودن عصاره پنیرک به هیدروژل منجر به افزایش میانگین بسته شدن زخم (حدود ۷ درصد بیشتر) گردیده است، هرچند پراکندگی داده‌ها در گروه حاوی پنیرک بیشتر می‌باشد. به‌طور کلی، گروه تیمار شده با CMC-Gel-Malva روند ترمیم سریع‌تری نسبت به هیدروژل بدون عصاره پنیرک داشته است (شکل ۱۰).

بررسی‌های هیستولوژی نشان داد که در گروه کنترل مثبت (۲۰)، ساختار طبیعی پوست بدون التهاب یا نکروز قابل توجه مشاهده شد. فولیکول‌های مو به تعداد مناسب، غدد چربی با ظاهر سالم، عروق خونی منظم و کلاژن به‌صورت دسته‌های منظم در درم دیده شد. اپیتلیوم پیوسته و کامل بود و لایه کراستی (اسکب) تقریباً وجود نداشت. از سوی دیگر، در گروه کنترل منفی، التهاب شدید، ادم و نکروز بافتی دیده شد. لایه کراستی ضخیم (اسکب) سطح بافت را پوشانده، فولیکول‌های مو تخریب شده، غدد چربی آتروفی و عروق خونی گشاد شده همراه با ترومبوز خفیف مشاهده گردید. کلاژن به هم ریخته و اپیتلیوم دچار جداسازی می‌باشد. همچنین، در گروه هیدروژل حاوی پنیرک (-CMC-Gel-Malva)، بهبود قابل توجه بافت نسبت به کنترل منفی دیده شد. لایه کراستی نازک‌تر و کمتر، بازسازی فولیکول‌های مو و غدد چربی، افزایش عروق خونی سالم و منظم، و تشکیل کلاژن جدید با آرایش نسبتاً منظم مشاهده گردید. اپیتلیوم تقریباً پیوسته و در حال بازسازی می‌باشد (شکل ۱۱).

بحث

زخم‌های پوستی یکی از شایع‌ترین مشکلات بالینی هستند که در صورت عدم ترمیم مناسب، کیفیت زندگی بیمار را به شدت کاهش می‌دهند. پانسمان‌های سنتی مانند گاز تنها نقش پوشاندگی دارند، اما پانسمان‌های نوین زیستی با هدف تأمین رطوبت، جلوگیری از عفونت و تحریک بازسازی بافت طراحی شده‌اند. هیدروژل‌های بر پایه پلیمرهای طبیعی به دلیل شباهت به ماتریکس خارج سلولی، توجه زیادی را جلب کرده‌اند. در این راستا، استفاده از هیدروژل‌های زیست‌سازگار بر پایه کربوکسی‌متیل سلولز (CMC) به دلیل قابلیت جذب بالا و حفظ رطوبت، همراه با ژلاتین که با دارا بودن توالی‌های RGD به چسبندگی و مهاجرت سلولی کمک می‌کند و عصاره پنیرک (*Malva sylvestris*) با خواص ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و مرطوب‌کنندگی، یک رویکرد امیدوارکننده محسوب می‌شود (۱۴، ۱۵ و ۲۱). برای ارزیابی این هیدروژل (CMC-Gelatin-Malva)، مشخصه‌یابی فیزیکی و شیمیایی شامل بررسی مورفولوژی و تخلخل با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، رفتار جذب آب (swelling ratio)، زیست‌تخریب‌پذیری (کاهش وزن در محیط فیزیولوژیک)، pH هیدروژل و همچنین آزمون‌های همولیز و شاخص لخته شدن (BCI) انجام می‌شود. مشخصه‌یابی بیولوژیکی نیز شامل ارزیابی زیست‌سازگاری با روش

تحریک‌کنندگی پایدار عصاره پنیرک بر تکثیر فیبروبلاست‌ها دارد. مطالعات متعدد قبلی نیز تأیید کرده‌اند که عصاره پنیرک به دلیل داشتن آنتی‌اکسیدان‌های قوی (فنول‌ها، فلاونوئیدها، ویتامین C و E) و خواص ضدالتهابی، باعث افزایش بقا و تکثیر فیبروبلاست‌ها می‌شود (۲۲ و ۲۹). بنابراین، افزودن پنیرک به هیدروژل CMC-Gel نه تنها سمی نیست، بلکه اثرات سودمندی بر زنده‌مانی و فعالیت سلول‌های دخیل در ترمیم دارد. نتایج حاصل از مدل زخم پوستی در موش صحرایی نشان داد که پس از ۱۴ روز، گروه تحت درمان با هیدروژل حاوی پنیرک CMC-Gel-Malva، میانگین بسته شدن زخم بالاتری نسبت به گروه کنترل داشت. این اختلاف از نظر بالینی و آماری حائز اهمیت است. مطالعات پیشین نیز اثر مثبت پنیرک را بر تسریع بسته شدن زخم گزارش کرده‌اند. افشار و همکاران (۲۳)، نشان دادند که استفاده موضعی عصاره آبی ۱٪ پنیرک بر روی زخم برشی در موش BALB/c منجر به کاهش معنی‌دار التهاب، افزایش کراتینیزاسیون لبه زخم و بهبود ویژگی‌های ترمیمی در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ گردید. نصیری و همکاران (۲۷)، نیز تأثیر کرم حاوی ۵٪ و ۱۰٪ عصاره پنیرک را بر زخم سوختگی درجه دو در موش صحرایی بررسی کردند و مشاهده نمودند که در روز ۲۰، گروه‌های درمان شده با پنیرک بیش از ۹۰٪ بهبودی داشتند در حالی که گروه سیلور سولفادیازین تنها ۶۱/۵٪ بهبودی نشان داد. همچنین فهیمی و همکاران (۳۱)، در مطالعه‌ای روی ترکیب چند گیاهی حاوی پنیرک، سولانوم نیگروم و رزا داماسنا، بهبود ۸۷٪ در روز ۱۴ را در گروه درمان با کرم گیاهی در مقایسه با ۷۰/۸٪ در گروه سیلور سولفادیازین گزارش کردند. نتایج مطالعه حاضر با این یافته‌ها همسو بوده و نشان می‌دهد که هیدروژل حاوی پنیرک، به دلیل آزادسازی پایدار ترکیبات زیست‌فعال، بسته شدن زخم را تسریع می‌کند. بررسی میکروسکوپی مقاطع رنگ‌آمیزی شده با H&E در روز ۱۴ نشان داد که در گروه کنترل منفی (احتمالاً زخم بدون درمان یا با پانسمان ساده)، التهاب شدید، ادم، نکروز و تخریب فولیکول‌های مو و غدد چربی وجود داشت. در گروه هیدروژل حاوی عصاره پنیرک CMC-Gel-Malva، بهبود قابل‌توجهی مشاهده شد: لایه دلمه (اسکب) نازک‌تر، بازسازی فولیکول‌های مو و غدد چربی، افزایش عروق خونی سالم و منظم و کلاژن جدید با آرایش نسبتاً منظم. این یافته‌ها با گزارش‌های افشار و همکاران (۲۳)، که کاهش چشمگیر سلول‌های التهابی و افزایش کراتینیزاسیون در گروه‌های تحت درمان با پنیرک مشاهده کردند، و همچنین با نتایج فهیمی و همکاران (۳۱) که اپیتلیالیزاسیون کامل، نتوواسکولایزاسیون و کاهش سلول‌های التهابی در گروه درمان با ترکیب گیاهی گزارش کردند، همخوانی کامل دارد. علاوه بر این، نصیری و همکاران (۲۷)، نیز نشان دادند که کرم پنیرک به‌طور معنی‌داری نمره گراناواسیون و تشکیل درم جدید را بهبود

برای پانسمان‌های زخم قرار دارد (۲۵ و ۲۶). محیط اسیدی یا قلیایی شدید می‌تواند روند ترمیم زخم را مختل کند (۲۷). در مطالعه حاضر، pH هیدروژل CMC-Gel در محدوده ۷/۲ تا ۷/۸۵ (نزدیک به خنثی تا کمی قلیایی) باقی ماند، در حالی که در گروه هیدروژل حاوی عصاره پنیرک، CMC-Gel-Malva یک اندازه‌گیری کاهش به ۶/۸ را نشان داد. این کاهش جزئی pH ممکن است ناشی از حضور گروه‌های کربوکسیل در ترکیبات فنلی یا اسیدهای آلی موجود در عصاره پنیرک باشد. با این حال، تمام مقادیر در محدوده فیزیولوژیک قابل قبول برای زخم (۶/۵ تا ۸/۵) قرار داشتند. نتایج مشابهی توسط نصیری و همکاران نیز گزارش شده است که کرم حاوی عصاره پنیرک باعث تحریک یا تغییر شدید pH پوست نشد (۲۷). هیدروژل‌ها با توانایی جذب آب بالا می‌توانند رطوبت محیط زخم را تأمین کرده و به خودتمیزی زخم کمک کنند. در مطالعه حاضر، گروه CMC-Gel-Malva در تمام زمان‌ها جذب آب بیشتری نسبت به CMC-Gel نشان داد. این افزایش احتمالاً به دلیل حضور گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل فراوان در ترکیبات فنلی و پلی‌ساکاریدهای موجود در عصاره پنیرک است که آب‌دوستی ماتریکس هیدروژل را افزایش می‌دهد. سماواتی باروس و همکاران در مطالعات خود، نیز نشان دادند که برگ‌ها و گل‌های پنیرک سرشار از پلی‌ساکاریدهای موسیلاژی و ترکیبات فنلی هستند که خاصیت نگهداری آب بالایی دارند (۲۸ و ۲۹). بنابراین، افزودن عصاره پنیرک به هیدروژل می‌تواند یک استراتژی مؤثر برای بهبود مدیریت آگزودای زخم باشد. تخریب کنترل‌شده هیدروژل برای تطابق با روند بازسازی بافت ضروری است (۳۰). در این مطالعه، گروه هیدروژل حاوی پنیرک CMC-Gel-Malva در ساعات اولیه (۶ و ۱۲ ساعت) کاهش وزن بیشتری نسبت به گروه CMC-Gel نشان داد، اما در نهایت در ساعت ۲۴ هر دو گروه به تخریب مشابهی (حدود ۵۸٪) رسیدند. این الگو نشان می‌دهد که عصاره پنیرک سرعت تخریب اولیه را افزایش می‌دهد بدون آنکه تخریب نهایی را تحت تأثیر قرار دهد. این ویژگی می‌تواند از نظر بالینی مفید باشد، زیرا تخریب سریع‌تر در روزهای اول امکان آزادسازی تدریجی ترکیبات زیست‌فعال و جایگزینی بافت گرانوله را فراهم می‌کند (۳۰). چنین رفتاری احتمالاً به دلیل ماهیت آبدوست و نفوذپذیری بالای ترکیبات فنلی پنیرک است که دسترسی آب و آنزیم‌های هیدرولیتیک به زنجیره‌های پلیمری را تسهیل می‌کند.

زیست‌سازگاری سلولی از پیش‌نیازهای اصلی پانسمان‌های زیستی است. در آزمون MTT بر روی رده سلولی فیبروبلاست (3T3)، در زمان ۲۴ ساعت، هر دو گروه زنده‌مانی بالاتری نسبت به کنترل نشان دادند. در زمان ۷۲ ساعت، زنده‌مانی گروه هیدروژل CMC-Gel به حدود ۹۹٪ کاهش یافت، در حالی که گروه حاوی عصاره پنیرک همچنان زنده‌مانی بالای ۱۰۷٪ را حفظ کرد. این نتایج نشان از اثر محافظتی و

References

1. Sorg HD, Tilkorn J, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. *Eur Surg Res* 2017;58:81-94. doi: 10.1159/000454919
2. Herman TF, Bordonni B. Wound classification. StatPearls Publishing;2020.
3. Papini S, Cecchetti D, Campani D, Fitzgerald W, Grimaldi C, Naro C, et al. Isolation and clonal analysis of human epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture. *Stem Cells* 2003;21:481-94. doi: 10.1634/stemcells.21-4-481
4. Mogoşanu GD, Grumezescu AM. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *Int J Pharm* 2014;463:127-36. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.015
5. Ghaderi R. Efficacy of epiglu, suture, honey and animal oil in accelerating healing of full thickness wound of skin in mice. *J Invest Dermatol* 2005;125. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23814.x
6. Tottoli EM, Dorati R, Genta I, Chiesa E, Pisani S, Conti B. Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics* 2020;12:735. doi: 10.3390/pharmaceutics12080735
7. Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Landthaler M, Babilas P. Wound healing in the 21st century. *J Am Acad Dermatol* 2010;63:866-81. doi: 10.1016/j.jaad.2009.10.048
8. Hunt TK, Hopf H, Hussain Z. Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care* 2000;13:6-11.
9. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci* 2008;97:2892-923. doi: 10.1002/jps.21210
10. Soleimani Z, Baharifar H, Najmoddin N, Khoshnevisan K. Evaluation of carboxymethyl cellulose/gelatin hydrogel-based dressing containing cefdinir for wound healing promotion in animal model. *Gels* 2025;11:38. doi: 10.3390/gels11010038
11. Morgan SJ, Lippman SI, Bautista GE, Harrison JJ, Harding CL, Gallagher LA, et al. Bacterial fitness in chronic wounds appears to be mediated by the capacity for high-density growth, not virulence or biofilm functions. *PLoS Pathog* 2019;15:e1007511. doi: 10.1371/journal.ppat.1007511
12. Maeso L, Antezana PE, Hvozda Arana AG, Evelson PA, Orive G, Desimone MF. Progress in the use of hydrogels for antioxidant delivery in skin wounds. *Pharmaceutics* 2024;16:524. doi: 10.3390/pharmaceutics16040524
13. Hivechi A, Mirzadeh H, Arefian E, Bagherzadeh R, Bakhshandeh B, Eslaminejad MB, et al. Oxidized carboxymethyl cellulose/gelatin in situ gelling hydrogel for accelerated diabetic wound healing: Synthesis, characterization, and in vivo investigations. *Int J Biol Macromol* 2023;242:125127. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125127
14. Fedoryshyn O, Yaremkevych O, Rusyn I, Kohut A. Biologically active substances of Malva sylvestris L. extracts as sources of safe phytotherapeutic agents. *Chem J* 2025;19:805-12. doi: 10.23939/chcht19.04.805
15. Mohaghegh Z, Gholami M, Ghasemi M, Rahimi M, Ghezelbash S, Asadi J, et al. The effect of Malva sylvestris cream on episiotomy pain and healing: a randomized controlled clinical trial. *Int J Community Based Nurs Midwifery* 2022;10:248-57. doi: 10.30476/IJCBNM.2022.94142.1952
16. Karimi M, Parsaei P, Shahzamani S, Changae F. Evaluation the effect of use of different levels of mallow (Malva Sylvestris) derived extracts on cutaneous skin lesions healing in Simmental heifers. *Rev Bras Hig Sanid Anim* 2023;17:4. doi: 10.5935/1981-2965.20230006
17. Salehi M, Ehterami A, Farzamfar S, Vaez A, Ebrahimi-Barough S. Accelerating healing of excisional wound with alginate hydrogel containing naringenin in rat model. *Drug Deliv Transl Res* 2021;11:142-53. doi: 10.1007/s13346-020-00778-1
18. Archana D, Singh BK, Dutta J, Dutta PK. In vivo evaluation of chitosan-PVP-titanium dioxide nanocomposite as wound dressing material. *Carbohydr Polym* 2013;95:530-9. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.03.034

می‌بخشد. بنابراین، هیدروژل حاوی عصاره پنیرک با کاهش التهاب، تسریع رگزایی و بهبود بازسازی اجزای پوستی، فرآیند ترمیم را به سمت بازسازی کامل تر هدایت می‌کند.

نتایج این مطالعه به وضوح نشان داد که هیدروژل کربوکسی متیل سلولز-ژلاتین حاوی عصاره آبی پنیرک (CMC-Gel-Malva) دارای زیست‌سازگاری خونی و سلولی عالی، قابلیت جذب آب بالا، تخریب کنترل‌شده و pH مناسب است. در مدل حیوانی زخم پوستی، این هیدروژل به‌طور معنی‌داری درصد بسته شدن زخم را افزایش داده و با کاهش التهاب، بهبود رگزایی و بازسازی فولیکول‌های مو و غدد چربی، کیفیت ترمیم را ارتقا بخشید. این یافته‌ها با مجموع گزارش‌های معتبر پیشین در مورد اثرات مفید پنیرک بر ترمیم همخوانی کامل دارد. بنابراین، هیدروژل CMC-Gelatin حاوی عصاره پنیرک می‌تواند به عنوان یک پانسمان زیستی مؤثر، ارزان‌قیمت و در دسترس برای کاربردهای بالینی به ویژه در زخم‌های مزمن و سوختگی پیشنهاد گردد. انجام مطالعات تکمیلی برای ارزیابی اثرات ضد عفونی‌کنندگی و سینتیک رهایش ترکیبات فعال توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله از طرح دانشگاه علوم پزشکی شاهرود می‌باشد. بدین‌وسیله از حمایت مالی این دانشگاه در طرح پژوهشی با کد ۱۴۰۱۰۰۴۵ قدردانی می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شاهرود (کد اخلاق: IR.SHMU.AEC.1401.006) انجام شد. تمامی مراحل کار با حیوانات بر اساس دستورالعمل‌های اخلاقی کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شاهرود صورت گرفت.

تعارض منافع

نویسندگان این مطالعه هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

حمایت مالی

این پژوهش توسط دانشگاه علوم پزشکی شاهرود حمایت مالی شد.

مشارکت نویسندگان

نعیمه ماه‌حیدری (نویسنده اول): انجام آزمایش‌ها، تحلیل داده‌ها و نگارش پیش‌نویس مقاله.
نریمان رضائی کلاریجانی، قاسم عباس‌زاده گودرزی، سیدرضا موسوی: مشارکت در انجام آزمایش‌های تکمیلی، تحلیل آماری داده‌ها و بازبینی انتقادی مقاله.
مجید صالحی (نویسنده مسئول): طراحی و نظارت بر مطالعه، ناظر و ویرایش نهایی مقاله.

19. Sperling C, Maitz M, Werner C. Test methods for hemocompatibility of biomaterials. In: Hemocompatibility of Biomaterials for Clinical Applications. Elsevier;2018.p.77-104.
20. Aguilera Flores MM, López Velázquez J, Ávila Vázquez V, Medellín Castillo NA, Rivera De la Rosa J, González Martínez A. Effectiveness of a natural coagulant based on common mallow (*Malva sylvestris*) in urban wastewater treatment. Environ Technol 2025;46:151-64. doi: 10.1080/09593330.2024.2380376
21. Hosseini SMR, Zare E, Hoveizi E, Pournia S, Ghorbani M, Nasiri N, et al. Carboxymethyl cellulose/sodium alginate hydrogel with anti-inflammatory capabilities for accelerated wound healing; In vitro and in vivo study. Eur J Pharmacol 2024;976:176671. doi: 10.1016/j.ejphar.2024.176671
22. Conforti F, Sosa S, Marrelli M, Menichini F, Statti GA, Uzunov D, et al. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. J Ethnopharmacol 2008;116:144-51. doi: 10.1016/j.jep.2007.11.015
23. Afshar M, Ravarian B, Zardast M, Moallem SA, Fard MH, Valavi M. Evaluation of cutaneous wound healing activity of *Malva sylvestris* aqueous extract in BALB/c mice. Iran J Basic Med Sci 2015;18:616-22. doi: 10.22038/ijbms.2015.4766
24. Belkhdja H, Bouhadi D, Sedjrari K, Sehanine S. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-hemolytic potential of polyphenolic components of common mallow (*Malva sylvestris*). Asian J Dairy Food Res 2024;43. doi: 10.18805/ajdfr.DRF-314
25. Li A, Wang Y, Xin J, Lao L, Ren K, Berman BM, et al. Serotonin receptor 2A/C is involved in electroacupuncture inhibition of pain in an osteoarthritis rat model. Evid Based Complement Alternat Med 2011;2011:619650. doi: 10.1093/ecam/nep218
26. Moualek I, Benarab K, Houali K. Evaluation of the in-vitro anti-inflammatory activity of *Malva sylvestris* leaves extract. Int J Second Metabolite 2025;12:181-7. doi: 10.21448/ijsm.1510607
27. Nasiri E, Hosseinimehr SJ, Azadbakht M, Akbari J, Enayati-Fard R, Azizi S. Effect of *Malva sylvestris* cream on burn injury and wounds in rats. Avicenna J Phytomed 2015;5:341-9.
28. Samavati V, Manoochehrizade A. Polysaccharide extraction from *Malva sylvestris* and its anti-oxidant activity. Int J Biol Macromol 2013;60:427-36. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.06.030
29. Barros L, Carvalho AM, Ferreira ICFR. Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: a comparative study of the nutraceutical potential and composition. Food Chem Toxicol 2010;48:1466-72. doi: 10.1016/j.fct.2010.03.013
30. Mogoșanu G, Popescu FC, Busuioc CJ, Lascăr I, Mogoantă L. Comparative study of microvascular density in experimental third-degree skin burns treated with topical preparations containing herbal extracts. Rom J Morphol Embryol 2013;54:107-13.
31. Fahimi S, Abdollahi M, Mortazavi SA, Hajimehdipoor H, Abdolghaffari AH, Rezvanfar MA. Wound healing activity of a traditionally used poly herbal product in a burn wound model in rats. Iran Red Crescent Med J 2015;17:e19960. doi: 10.5812/ircmj.19960





Investigating the Effect of Carboxymethyl Cellulose-Gelatin Hydrogel Containing Malva Sylvestris Extract On Wound Healing

Naimeh Mahheidari (Ph.D.)¹, Nariman Rezaei (Ph.D.)², Ghasem Abaszadeh Goudarzi (Ph.D.)³, Seyed Reza Mousavi (Ph.D.)⁴, Majid Salehi (Ph.D.)^{5,6*}

1- Stem Cells and Regenerative Medicine Innovation Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

2- Health Technology Incubator center, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

3- Department of Biotechnology, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

4- School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

5- Regenerative medicine Research Center, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

6- Department of Tissue Engineering, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

Received: 27 June 2025, Accepted: 16 May 2026

Abstract:

Introduction: Skin wound healing remains a clinical challenge, and biocompatible dressings containing natural compounds may enhance the healing process. Common mallow (*Malva sylvestris*), with anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial properties, is a promising candidate for biological dressings. This study aimed to synthesize and evaluate a carboxymethyl cellulose-gelatin hydrogel containing *Malva sylvestris* aqueous extract (CMC-Gel-Malva) and investigate its effect on wound healing in an animal model.

Methods: A carboxymethyl cellulose-gelatin hydrogel containing *Malva sylvestris* aqueous extract was synthesized and characterized for morphology (SEM), water absorption, biodegradability, and pH. Hemocompatibility and cytocompatibility were assessed using hemolysis, blood clotting index, and MTT assays, respectively. The healing effect was evaluated in a rat skin wound model with negative control, CMC-Gel, and CMC-Gel-Malva groups over 14 days by assessing wound closure and histopathological changes.

Results: Both hydrogels exhibited favorable hemocompatibility with hemolysis rates below 5%. Although the BCI was lower in the CMC-Gel group (20.46%) than in the CMC-Gel-Malva group (31.10%), both significantly reduced clotting compared with the control. Malva incorporation increased water absorption, accelerated initial biodegradability, and enhanced cell viability (107.2% vs. 99.2%). In the animal model, CMC-Gel-Malva significantly improved wound closure on day 14 (85.44% vs. 78.22%) and promoted tissue regeneration, including reduced inflammation, increased vascularization, hair follicle and sebaceous gland regeneration, and organized collagen deposition.

Conclusion: The carboxymethyl cellulose-gelatin hydrogel containing mallow extract shows excellent biocompatibility, high water absorption, and promising wound healing effects. This hydrogel may serve as an effective biological dressing for accelerating skin wound healing, particularly in chronic wounds and second-degree burns.

Keywords: Malva sylvestris, Hydrogel, Carboxymethyl cellulose, Gelatin, Wound healing, Biocompatibility.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: M. Salehi, Email: Salehi.m@shmu.ac.ir, Msalehi.te1392@gmail.com

Citation: Mahheidari N, Rezaei N, Abaszadeh Goudarzi Gh, Mousavi SR, Salehi M. Investigating the effect of carboxymethyl cellulose-gelatin hydrogel containing Malva sylvestris extract on wound healing. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2026;21(1):40-54.

