



Preparation and Characterization of Hyaluronic Acid-based Composite Films for Wound Dressing Applications

Farhad Ahmadi^{1*}, Seyed Mojtaba Hosseini Fard², Mohammad Reza Vaezi Jazeh³, Leila Mohammadi³ and Mohammad Ali Nilforoushzadeh⁴

1- Biomaterials Group, Nano and Advanced Materials Research Institute, Materials and Energy Research Center, Alborz, Iran

2- Environmental and Energy Group, Energy Research Institute, Materials and Energy Research Center, Alborz, Iran

3- Nanomaterials Group, Nano and Advanced Materials Research Institute, Materials and Energy Research Center, Alborz, Iran

4- Dermatology Group, Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author, Email: farhadahmadi6767@gmail.com

(Received: 12 March 2025; Revised: 26 April 2025; Accepted: 30 April 2025; Available online: 30 July 2025)

ABSTRACT

Introduction and Objectives: Hyaluronic acid is widely used in wound dressings due to its biocompatibility, moisture retention, and wound healing properties. However, its poor mechanical strength, limited stability in moist environments, and insufficient antibacterial activity restrict its clinical applications. This study aims to improve the performance of hyaluronic acid-based films by incorporating chitosan and employing glutaraldehyde and tannic acid as dual crosslinking agents. The novelty of this work lies in the simultaneous use of the two chemical modifiers.

Materials and Methods: Composite films were prepared by blending hyaluronic acid and chitosan at a defined ratio and chemically modified using glutaraldehyde and tannic acid. FTIR spectroscopy was used to evaluate chemical interactions and bond formation. Mechanical properties were assessed via tensile testing. Water contact angle, swelling ratio, cytotoxicity, and antibacterial activity were examined to evaluate biological performance.

Results: FTIR analysis confirmed new covalent and hydrogen bonding interactions leading to a stable crosslinked structure. Modified films exhibited a Young's modulus of 1.5–2 MPa, tensile strength of 2 MPa, and a water contact angle of 45°, indicating enhanced mechanical strength and moderate hydrophilicity. The water absorption capacity reached 733%, and cell viability remained within 85–90% at the optimized glutaraldehyde concentration, confirming good biocompatibility. However, no significant antibacterial activity was observed.

Conclusion: The incorporation of chitosan and dual crosslinking with glutaraldehyde and tannic acid significantly enhanced the mechanical, wetting, and biocompatibility properties of hyaluronic acid-based films, making them promising candidates for wound dressing applications. Further enhancement of antibacterial activity, possibly by incorporating antibacterial nanoparticles, is recommended for broader clinical use.

Keywords: Hyaluronic acid, Chitosan, Chemical modification, Polymeric films, Wound dressing.

How to Cite: Ahmadi F, Hosseini Fard SM, Vaezi Jazeh MR, Mohammadi L, Nilforoushzadeh MA. Preparation and characterization of hyaluronic acid-based composite films for wound dressing applications. J Adv Mater Eng. 2025;44(4):55–73. <https://doi.org/10.47176/jame.44.4.1119>

Copyright © 2025 Isfahan University of Technology, Published by IUT press.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.



تهیه و مشخصه‌یابی فیلم‌های کامپوزیتی پایه هیالورونیک اسید برای کاربردهای زخم‌پوش

فرهاد احمدی^{۱*}، سید مجتبی حسینی فرد^۲، محمدرضا واعظی جزه^۳، لیلا محمدی^۳ و محمدعلی نیلفروش‌زاده^۴

۱- گروه بیومواد، پژوهشکده نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، البرز، ایران

۲- گروه محیط زیست و انرژی، پژوهشکده انرژی، پژوهشگاه مواد و انرژی، البرز، ایران

۳- گروه نانومواد، پژوهشکده نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، البرز، ایران

۴- گروه پوست، مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: farhadahmadi6767@gmail.com

(دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۲، بازنگری: ۱۴۰۴/۲/۶، پذیرش: ۱۴۰۴/۲/۱۰، انتشار: ۱۴۰۴/۵/۸)

چکیده

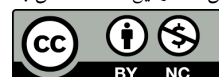
مقدمه و اهداف: هیالورونیک اسید، به دلیل ویژگی‌های زیست‌سازگاری، نگهداشت رطوبت و ترمیم زخم، یکی از مواد پرکاربرد در زخم‌پوش‌ها است؛ اما محدودیت‌هایی نظیر ضعف مکانیکی، پایداری پایین در محیط مرطوب و فقدان خاصیت ضدباکتریایی دارد. در این پژوهش، با هدف ارتقاء کارایی این فیلم‌ها، از ترکیب هیالورونیک اسید با کیتوسان و به‌کارگیری گلو تار آل‌دئید و تانیک اسید به‌عنوان عوامل پیوند عرضی استفاده شده است. نوآوری اصلی این تحقیق، استفاده هم‌زمان از دو عامل اصلاح شیمیایی است.

مواد و روش‌ها: فیلم‌های کامپوزیتی هیالورونیک اسید/کیتوسان با نسبت مشخص ترکیب و با استفاده از گلو تار آل‌دئید و تانیک اسید اصلاح شدند. آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری برای بررسی برهم‌کنش‌های شیمیایی و ساختار پیوندها، آزمون کشش برای ارزیابی خواص مکانیکی و آزمون‌های زاویه تماس، جذب آب، سمیت سلولی و ضدباکتری، برای بررسی عملکرد زیستی فیلم‌ها انجام شد.

یافته‌ها: طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری بیانگر تشکیل پیوندهای جدید و ساختار شبکه‌ای پایدار در اثر اصلاح شیمیایی بود. نمونه‌های اصلاح‌شده مدول یانگ ۱/۵-۲ MPa، تنش کششی ۲ MPa و زاویه تماس ۴۵ درجه از خود نشان دادند که نشانگر افزایش استحکام و آب‌دوستی است. درصد جذب آب بالا (۷۳۳ درصد) و بقای سلولی ۸۵-۹۰ درصد در غلظت بهینه گلو تار آل‌دئید، دلالت بر زیست‌سازگاری مطلوب دارد. با این حال، خواص ضدباکتریایی قابل توجهی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده ترکیبی از کیتوسان و عوامل پیوند عرضی گلو تار آل‌دئید و تانیک اسید، منجر به بهبود چشمگیر خواص مکانیکی، آب‌دوستی و زیست‌سازگاری فیلم‌های هیالورونیک اسید شده و آن‌ها را به گزینه‌ای مناسب برای کاربرد در زخم‌پوش‌ها تبدیل کرده است. برای افزایش اثربخشی ضدباکتریایی، پیشنهاد می‌شود از نانوذرات با خاصیت ضدباکتری استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: هیالورونیک اسید، کیتوسان، اصلاح شیمیایی، فیلم‌های پلیمری، زخم‌پوش.



۱- مقدمه

فیلم‌های زیست‌بنیاد پلیمری، به‌ویژه آن‌هایی که از پلی‌ساکاریدهایی چون هیالورونیک اسید^۱ ساخته می‌شوند، به سبب ویژگی‌های ممتاز از جمله سازگاری زیستی، توانایی حفظ رطوبت، ویژگی‌های ضدالتهابی و نقش مؤثر در تحریک فرآیند بازسازی بافت، جایگاهی شایسته در طراحی و تولید زخم‌پوش‌های نوین یافته‌اند. هیالورونیک اسید که یکی از مؤلفه‌های اصلی ماتریکس خارج سلولی در بافت‌های بدن است، با ایفای نقش در فرآیندهایی نظیر مهاجرت سلولی، تکثیر فیروبلست‌ها، شکل‌گیری رگ‌های خونی تازه و تنظیم پاسخ‌های التهابی، سهمی بنیادی در ترمیم و بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده دارد. بهره‌گیری از فیلم‌های پایه هیالورونیک اسید با فراهم آوردن محیطی مرطوب و پایدار، زمینه تسریع روند ترمیم زخم را فراهم می‌آورد و از بروز آسیب‌های ثانویه نظیر تشکیل اسکارهای ضخیم و غیرطبیعی جلوگیری می‌کند. کاربری این گروه از زخم‌پوش‌ها به‌ویژه در مدیریت زخم‌های مزمن و عفونی، همچون زخم‌های دیابتی، زخم‌های فشاری، سوختگی‌ها و زخم‌های ناشی از اعمال جراحی که روند بهبودی در آن‌ها به علل گوناگون دچار اختلال شده است، از اهمیت فزاینده‌ای برخوردار گشته است (۲۱).

با وجود مزایای قابل توجه، استفاده از فیلم‌های هیالورونیک اسید با چالش‌هایی مواجه است. یکی از مشکلات اصلی، استحکام مکانیکی پایین این فیلم‌ها است که در محیط‌های مرطوب و در برابر کشش و فشار، ممکن است پایداری خود را از دست دهند (۳و۴). همچنین، ساختار پلیمری هیالورونیک اسید در معرض تجزیه آنزیمی و هیدرولیتیک قرار دارد که می‌تواند منجر به کاهش عمر مفید فیلم در شرایط زیستی شود. از سوی دیگر، عدم وجود خواص ضدباکتریایی کافی در فیلم‌های HA، به‌ویژه در درمان زخم‌های عفونی، محدودیت‌هایی ایجاد کرده است (۵). این مشکلات موجب می‌شود تا فیلم‌های HA، در درمان زخم‌های مزمن و عفونی و همچنین در کاربردهای طولانی‌مدت، عملکرد مطلوبی نداشته باشند (۶و۷)؛ بنابراین،

یافتن راهکارهای مناسب برای بهبود این خصوصیات ضروری به نظر می‌رسد.

در پژوهش‌های گوناگون، تلاش شده است تا از راه آمیختن HA با پلیمرهای طبیعی یا سنتزی، کاستی‌هایی همچون استحکام مکانیکی پایین و پایداری ضعیف در محیط‌های زیستی بهبود یابد. این راهکارها عمدتاً با هدف ارتقاء ویژگی‌هایی چون مقاومت کششی، پایداری ساختاری و کاهش تجزیه‌پذیری هیدرولیتیکی^۲ یا آنزیمی^۳، به‌کار گرفته شده‌اند. در این میان، پلیمرهایی نظیر پلی‌وینیل الکل، آلژینات، ژلاتین و کیتوسان، از کاربرد گسترده‌تری برخوردار بوده‌اند (۸). همچنین، به‌منظور بهبود خواص ضدباکتریایی و افزایش دوام و کارایی فیلم‌ها در شرایط مرطوب، استفاده از راهبردهایی چون افزودن نانوذرات فلزی (مانند نقره و اکسید روی)، بهره‌گیری از عوامل پیوند عرضی، همچون گلو تار آل‌دئید^۴ یا تانیک اسید^۵ و نیز اصلاح سطحی با مواد زیست‌فعال، مورد بررسی قرار گرفته است. این اصلاحات می‌توانند به ایجاد ساختارهای پایدار سه‌بعدی، کاهش جذب رطوبت بیش از حد و همچنین کنترل آزادسازی مواد دارویی یا ضد میکروبی منجر شوند و در نهایت، کارایی درمانی زخم‌پوش‌ها را افزایش دهند (۶و۹).

در این پژوهش، ما با هدف بهبود خواص فیلم‌های هیالورونیک اسید، ترکیب آن با کیتوسان را به‌عنوان یک پلیمر با خواص ضدباکتری و زیست‌تخریب‌پذیر پیشنهاد می‌دهیم. علاوه بر این، استفاده از GTA و TA، به‌عنوان عوامل پیوند عرضی می‌تواند به افزایش پایداری و بهبود استحکام مکانیکی و خواص ضدباکتریایی فیلم‌ها کمک کند. به‌ویژه، ترکیب هم‌زمان این دو عامل شیمیایی می‌تواند پیوندهای کووالانسی و هیدروژنی را در ساختار فیلم ایجاد کرده و باعث بهبود قابل‌توجه خواص مکانیکی، آب‌دوستی، زیست‌سازگاری و پایداری آن‌ها در محیط‌های مرطوب شود (۸و۹). این راهکار می‌تواند موجب بهبود چشمگیر عملکرد فیلم‌های HA و استفاده مؤثرتر از آن‌ها در درمان زخم‌ها و بهبود سرعت ترمیم بافت‌ها گردد.

۲- مواد و روش تحقیق

زخم را بدون برداشتن پانسمان فراهم می‌کند. ظرفیت جذب رطوبت این فیلم‌ها، به کنترل رطوبت زخم و تسریع ترمیم کمک می‌کند. همچنین، آزادسازی کنترل‌شده ترکیبات دارویی ضدباکتری یا ضدالتهابی ویژگی مهم این فیلم‌هاست که به کاهش عفونت و تحریک فرآیندهای ترمیمی کمک می‌کند. این فیلم‌ها باید ساختار پایداری داشته و در برابر تغییرات محیطی مقاوم باشند و همچنین زیست‌سازگاری مناسبی برای جلوگیری از تحریک سیستم ایمنی بدن داشته باشند (۱۰-۱۳).

آزمون طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR):

برای تحلیل ساختار شیمیایی و پیوندهای موجود در فیلم‌ها، نمونه‌ها تحت آزمایش FTIR قرار گرفتند. آزمون با استفاده از دستگاه FTIR مدل Thermo Nicolet iS10 انجام شد. نمونه‌ها به‌صورت خشک و به شکل فیلم‌های نازک تهیه شده و در محدوده طول موج $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ اسکن شدند. داده‌های طیفی به‌دست‌آمده برای شناسایی گروه‌های عاملی، بررسی پیوندهای شیمیایی و تحلیل تعاملات میان اجزای تشکیل‌دهنده فیلم شامل هیالورونیک اسید، کیتوسان، گلوکارآلدئید و تانیک اسید، مورد بررسی قرار گرفتند.

آزمون استحکام کششی^۹ فیلم‌های پلیمری:

آزمون استحکام کششی، برای ارزیابی خواص مکانیکی فیلم‌های کامپوزیتی، از جمله استحکام کششی و مدول الاستیسیته فیلم‌های پلیمری، با استفاده از دستگاه Instron 5944 انجام شد. این آزمون طبق استاندارد ASTM D882 انجام گردید. نمونه‌ها به‌صورت فیلم‌های نازک با ابعاد مشخص و مطابق با دستورالعمل استاندارد تهیه شدند. ابتدا فیلم‌ها در دمای محیط خشک شده و سپس بر اساس استاندارد مذکور، نمونه‌ها به‌صورت با ابعاد 10×100 میلی‌متر قرار گرفته و با نرخ کشش معمولاً در محدوده 50 میلی‌متر در دقیقه (یا 2 اینچ در دقیقه) تحت کشش قرار گرفتند تا مقدار استحکام کششی تا نقطه پاره‌شدن اندازه‌گیری شود. نتایج

در این پژوهش، از هیالورونیک اسید با وزن مولکولی بالا ($M_w \approx 1.5 \text{ MDa}$)، خلوص $\geq 99\%$ ، (Sigma-Aldrich، آمریکا) و کیتوسان با وزن مولکولی متوسط ($M_w \approx 200-400 \text{ kDa}$)، درجه استیل $\leq 85\%$ ، (Sigma-Aldrich، آمریکا) استفاده شد. گلوکارآلدئید 25% محلول آبی (Merck، آلمان) و تانیک اسید (TA، خلوص $\geq 98\%$ ، Sigma-Aldrich، آمریکا) به‌عنوان عوامل پیوند عرضی به کار رفتند. اسید استیک گلاسیال (Merck، آلمان)، برای حل کردن کیتوسان استفاده شد. آب دیونیزه نیز به عنوان حلال پایه به کار گرفته شد.

در فرآیند تهیه و مشخصه‌یابی نمونه‌ها از تجهیزات مختلفی استفاده شد. برای هم‌زدن و حرارت‌دهی محلول‌ها، از هیتر استیرر مدل IKA C-MAG HS7 ساخت آلمان بهره گرفته شد. آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز^۶ توسط دستگاه FTIR مدل Thermo Nicolet iS10 ساخت آمریکا انجام گرفت. آزمون‌های مکانیکی به‌وسیله دستگاه آزمون کشش^۷ مدل Instron 5944 ساخت آمریکا صورت پذیرفت و جهت اندازه‌گیری زاویه تماس آب^۸، از گونیومتر مدل Krüss DSA25 ساخت آلمان استفاده شد.

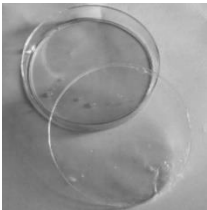
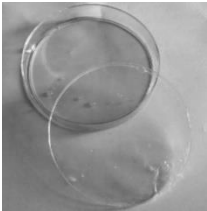
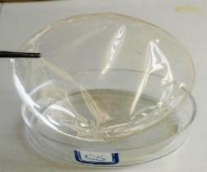
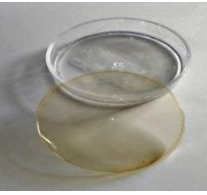
۲-۱- تهیه فیلم‌ها

در این پژوهش، فیلم‌های کامپوزیتی زیست‌پایه با استفاده از ترکیبات مختلف هیالورونیک اسید، کیتوسان، گلوکارآلدئید و تانیک اسید تهیه شدند. جزئیات مربوط به نوع نمونه‌ها، ترکیبات به‌کاررفته، نسبت‌ها و روش تهیه در جدول (۱) ارائه شده است.

۲-۲- ارزیابی خواص و مشخصه‌یابی فیلم‌های پلیمری

استفاده از فیلم‌های پلیمری، به‌عنوان پانسمان‌های زخم در حال افزایش است؛ اما استاندارد دقیقی برای ارزیابی عملکرد و ایمنی آن‌ها وجود ندارد. پژوهش‌ها بر مشخصه‌یابی این فیلم‌ها متمرکز شده‌اند تا شرایط بهینه برای بهبود زخم فراهم شود. این فیلم‌ها باید استحکام مکانیکی کافی و انعطاف‌پذیری مناسب داشته باشند تا به پوست بچسبند. شفافیت آن‌ها امکان مشاهده روند بهبود

جدول ۱ - انواع فیلم‌های پلیمری تهیه‌شده و اجزای تشکیل‌دهنده

ردیف	نوع فیلم	اجزای اصلی	عامل(های) پیوند عرضی	روش تهیه	تصویر
۱	HA	هیالورونیک اسید	ندارد	حل کردن ۰/۲۵ گرم HA در ۹/۷۵ میلی لیتر آب دیونیزه، خشک‌سازی	
۲	HA-GTA	هیالورونیک اسید	گلوتارآلدئید ۲٪	حل کردن ۰/۲۵ گرم HA در ۹/۷۵ میلی لیتر محلول ۲٪ GTA، خشک‌سازی	
۳	HA-GTA-TA	هیالورونیک اسید و گلوتار آلدئید	تانیک اسید (۰/۵٪)	غوطه‌وری فیلم حاصل از مرحله قبلی در محلول تانیک اسید	
۴	Cs	کیتوسان	ندارد	حل کردن Cs در اسید استیک ۶٪، خشک‌سازی	
۵	HA-Cs	هیالورونیک اسید و کیتوسان	ندارد	ترکیب (1:1) محلول‌های HA و Cs، خشک‌سازی	
۶	HA-Cs-GTA	هیالورونیک اسید و کیتوسان	گلوتارآلدئید ۲٪	افزودن ۰/۷۵ میلی لیتر GTA به ۹/۲۵ میلی لیتر محلول HA-Cs و خشک‌سازی	
۷	HA-Cs-GTA-TA	هیالورونیک اسید، کیتوسان و گلوتارآلدئید	تانیک اسید (۰/۵٪)	تیمار فیلم خشک‌شده مرحله قبل در محلول تانیک اسید	

کششی در برابر کرنش تبدیل شدند تا رفتار مکانیکی فیلم‌ها مشخص گردد (۱۴-۱۷).

به‌صورت نیروی کششی با واحد نیوتون (N) و کرنش با واحد میلی متر (mm)، ثبت شده و سپس داده‌ها به نمودار استحکام

آزمون جذب آب و تورم:

برای ارزیابی میزان جذب آب و تورم فیلم‌های پلیمری، نمونه‌ها در آب دیونیزه غوطه‌ور شدند. به منظور محاسبه دقیق میزان جذب آب، وزن نمونه‌ها پیش از و پس از غوطه‌ور شدن در آب اندازه‌گیری گردید. در این روش، نمونه‌های خشک فیلم‌های پلیمری در آب دیونیزه با دمای ثابت (معمولاً ۳۷ درجه سانتی-گراد) قرار گرفت. پس از گذشت مدت زمان مشخص، نمونه‌ها از آب خارج شده و آب اضافی سطحی آن‌ها با استفاده از کاغذ فیلتر جذب شد. در نهایت، نمونه‌های مرطوب دوباره وزن‌کشی شده و میزان جذب آب با استفاده از رابطه (۱) محاسبه می‌گردد:

$$S\% = \frac{W_w - W_d}{W_d} \times 100 \quad (1)$$

که در آن (S/%)، درصد جذب آب است و (W_w) و (W_d)، به ترتیب، وزن نمونه پس از غوطه‌ور شدن در آب (وزن مرطوب) و وزن نمونه پیش از غوطه‌ور شدن در آب (وزن خشک) را نشان می‌دهند (۱۸ و ۱۹).

خواص آب‌دوستی - آزمون زاویه تماس (WCA):

خواص آب‌دوستی فیلم‌های پلیمری برای پانسمان زخم، از اهمیت بالایی برخوردار است؛ زیرا به جذب رطوبت و تسریع ترمیم زخم کمک می‌کند. این ویژگی از طریق اندازه‌گیری زاویه تماس تعیین می‌شود. زاویه تماس آب بر سطح فیلم‌های زیستی، شاخص مهمی در ارزیابی ویژگی‌های آب‌دوستی و تعامل با محیط زیستی است که نقش کلیدی در جذب رطوبت، چسبندگی سلولی و عملکرد زیستی ایفا می‌کند. اگر زاویه تماس کمتر از ۹۰ درجه باشد، سطح آب‌دوست است که به معنای جذب بالاتر آب است. فیلم‌های آب‌دوست، کمتر مستعد آلودگی میکروبی بوده و به جلوگیری از رشد باکتری‌ها کمک می‌کنند (۲۰-۲۳).

آزمون زاویه تماس، با استفاده از دستگاه گونیومتر Krüss DSA25 انجام شد. در این روش، یک قطره آب یون‌زدایی‌شده، روی سطح فیلم پلیمری قرار داده شد و زاویه بین سطح فیلم و قطره آب اندازه‌گیری شد. دستگاه گونیومتر قادر است زاویه تماس را با دقت بالا تعیین کند. نتایج به صورت فیلم و عکس

ثبت و برای تحلیل‌های بیشتر به صورت نمودار زاویه تماس ارائه شد.

آزمون‌های ضد باکتریایی:

خواص ضدباکتریایی فیلم‌های پلیمری، با استفاده از روش کشت میکروبی و آزمون انتشار دیسک^{۱۰} انجام شد. برای این منظور، باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس^{۱۱} و اشرشیا کلی^{۱۲} که از جمله باکتری‌های رایج در زخم‌ها هستند، به عنوان موجودات زنده مدل انتخاب شدند. ابتدا محیط کشت مناسب آماده و پس از گندزدایی، باکتری‌ها در آن کشت داده شدند. سپس فیلم‌های پلیمری بر روی سطح آگار قرار داده شده و به مدت مشخصی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت زمان نگهداری در شرایط کنترل‌شده، قطر هاله مهار رشد اطراف فیلم‌ها اندازه‌گیری شد. این هاله نشان‌دهنده میزان فعالیت ضدباکتریایی فیلم‌های پلیمری است. اندازه‌گیری قطر هاله، به عنوان معیاری برای ارزیابی قدرت مهار رشد میکروب‌ها، انجام شد (۲۴ و ۲۵).

آزمون سمیت سلولی^{۱۳}:

آزمون‌های سمیت سلولی و زیست‌سازگاری، برای ارزیابی تأثیر مواد بر سلول‌ها و استفاده آن‌ها در پانسمان زخم ضروری هستند. یکی از روش‌های رایج برای این ارزیابی، آزمون MTT است که به بررسی فعالیت سوخت‌وساز سلول‌ها می‌پردازد. در این روش، ماده MTT توسط آنزیم‌های سلولی به بلورهای فرمازان تبدیل می‌شود و میزان تیرگی محلول به تعداد سلول‌های زنده و فعال بستگی دارد. برای تست سمیت سلولی فیلم‌های پلیمری، از سلول‌های فیبروبلاست موشی (L929) استفاده شد. این سلول‌ها در محیط کشت استاندارد کشت داده شده و پس از ۲۴ ساعت تماس با فیلم‌های پلیمری، محلول MTT به محیط کشت افزوده می‌شود. سپس میزان تیرگی محلول از طریق طیف‌سنجی در طول موج ۵۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و درصد زیست‌پذیری سلولی محاسبه می‌شود. فیلم‌هایی با زیست‌سازگاری بالای ۸۰٪،

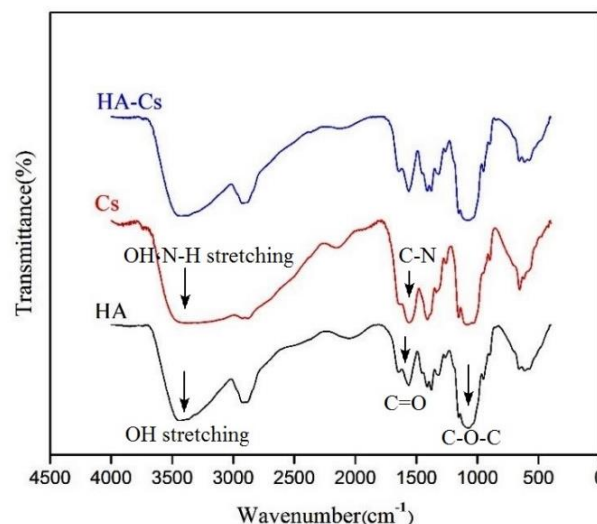
با ترکیب این دو پلیمر و تشکیل فیلم پلیمری HA-CS، تغییرات معناداری در طیف FTIR مشاهده شد. کاهش پهنای پیک در ناحیه $3200-3600\text{ cm}^{-1}$ و جابه‌جایی آن به سمت فرکانس‌های پایین‌تر، نشان‌دهنده برقراری پیوندهای هیدروژنی میان گروه‌های هیدروکسیل HA و گروه‌های آمین CS است. این برهم‌کنش‌ها، منجر به کاهش آزادی حرکت این گروه‌ها و در نتیجه جابه‌جایی فرکانس جذب آن‌ها می‌شود. همچنین، تغییر شکل و جابه‌جایی پیک‌های مربوط به گروه‌های کربونیل و آمین ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$) نشان‌دهنده تعاملات الکترواستاتیکی و ایجاد پیوندهای یونی و کووالانسی بین این گروه‌ها است.

مطالعه الخورسانی و همکاران (۲۸)، نیز تغییرات مشابهی را گزارش کرده‌اند. آن‌ها نشان دادند که در ترکیب HA-CS، پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های OH و آمین و پیوندهای یونی بین گروه‌های کربونیل و آمین شکل می‌گیرند که منجر به تغییر در شدت و موقعیت پیک‌ها در طیف FTIR می‌شود. همچنین، در تحقیق چن و همکاران (۲۹)، مشاهده شد که تعاملات میان گروه‌های فعال دو پلیمر، نقش کلیدی در ایجاد ساختار منسجم و پایدار ایفا می‌کنند و تغییرات طیفی مشابهی را در نواحی مرتبط گزارش کردند.

نتایج FTIR، نشان می‌دهند که ترکیب هیالورونیک اسید و کیتوسان تحت تأثیر اندرکنش هیدروژنی و پیوندهای یونی، ساختاری شبکه‌ای و پایدار ایجاد می‌کند. این نتایج با تحقیقات پیشین هم‌راستا است.

نمودار FTIR شکل (۲)، شامل سه طیف است که به ترتیب مربوط به هیالورونیک اسید خالص (HA)، هیالورونیک اسید اصلاح‌شده با گلوټارآلدئید (HA-GTA) و هیالورونیک اسید اصلاح‌شده با گلوټارآلدئید و تانیک اسید (HA-GTA-TA) می‌باشد. این نمودارها، برای بررسی تغییرات ساختاری ناشی از اصلاح شیمیایی با گلوټارآلدئید و تانیک اسید بر ساختار هیالورونیک اسید تهیه شده است.

در طیف FTIR نمونه ترکیبی هیالورونیک اسید و گلوټارآلدئید (HA-GTA)، کاهش شدت و پهنای پیک OH در



شکل ۱- نمودار طیف FTIR سه نمونه هیالورونیک اسید، کیتوسان و ترکیب آن‌ها.

برای کاربردهای پزشکی مناسب هستند. نتایج به صورت درصد زیست‌پذیری در قالب نمودارهای میله‌ای ارائه شد (۲۶ و ۲۷).

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری (FT-IR)
در نمودار FTIR شکل (۱)، سه طیف مربوط به هیالورونیک اسید (HA)، کیتوسان (CS) و ترکیب آن‌ها (HA-CS)، نمایش داده شده است. هدف از تحلیل این طیف‌ها، مقایسه پیوندهای شیمیایی در مواد خالص و ترکیب‌شان و شناسایی تغییرات ساختاری و پیوندهای جدید است.

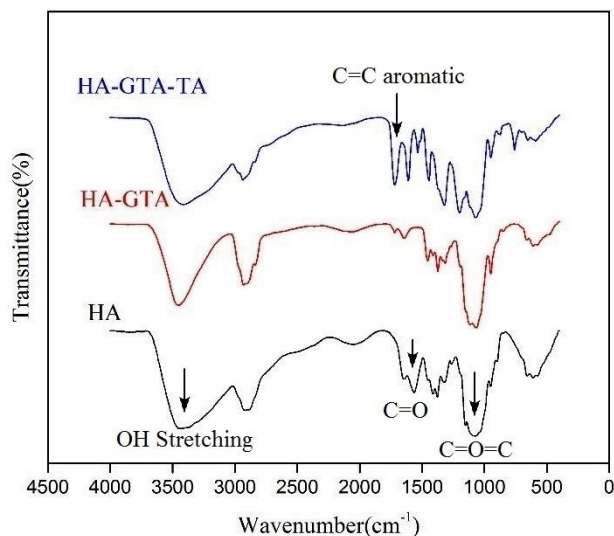
در طیف‌سنجی FTIR هیالورونیک اسید، حضور یک پیک پهن در ناحیه $3200-3600\text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات کششی گروه‌های هیدروکسیل (OH) است که با طبیعت آب‌دوست HA مرتبط است. همچنین، پیک‌های مشخصه در بازه $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ به گروه‌های کربونیل (C=O) و در $1000-1100\text{ cm}^{-1}$ به پیوندهای گلیکوزیدی (C-O-C) نسبت داده می‌شوند. در طیف کیتوسان (CS)، نیز، پیک پهن $3200-3500\text{ cm}^{-1}$ ناشی از ارتعاشات کششی گروه‌های OH و N-H و پیک $1500-1600\text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه‌های N-H یا C-N است.

بروز تغییرات قابل توجهی در ناحیه‌های مشخصی از طیف، به‌ویژه در ناحیه C-O-C شده که نشان‌دهنده واکنش‌های پیچیده‌تر در ماتریس پلیمری است.

مطالعات پیشین به‌خوبی این یافته‌ها را تأیید می‌کنند. بای و همکاران (۳۰)، گزارش کردند که در هیدروژل‌های ترکیبی HA-CS اصلاح‌شده، واکنش‌های شیمیایی منجر به ایجاد پیوندهای کووالانسی جدید، به‌ویژه بین گروه‌های هیدروکسیل و آمین شده که به‌طور مستقیم با تغییرات در نواحی OH و C=O طیف FTIR مرتبط است. آن‌ها نشان دادند که این برهم‌کنش‌ها، نه تنها ساختار فیزیکی شبکه پلیمری را پایدارتر می‌کند، بلکه خواص مکانیکی و عملکرد ترمیمی را نیز بهبود می‌بخشد. همچنین، یافته‌های السیخان و فرهود (۳۱) که به بررسی ترکیبات HA-GTA-TA پرداخته‌اند، بیانگر آن است که تانیک اسید با ایفای نقش به‌عنوان عامل پیونددهنده چند نقطه‌ای، موجب تقویت اتصال بین زنجیره‌های پلیمری از طریق برهم‌کنش‌های فنولی-کربونیل و تشکیل پیوندهای پایدار می‌شود. آن‌ها نیز کاهش پیک OH و جابه‌جایی پیک‌های C=O و C-O-C را نشانه‌ای از این پیوندهای جدید معرفی کرده‌اند.

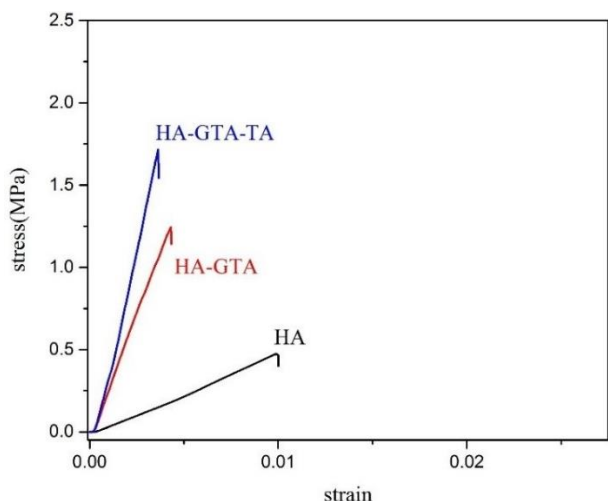
درمجموع، تحلیل‌های طیفی حاضر نه تنها تأییدکننده تشکیل پیوندهای عرضی و ساختارهای شیمیایی جدید در اثر واکنش‌های هدفمند HA، GTA و TA است، بلکه نشان می‌دهد که این تغییرات طیفی با مکانیسم‌های شیمیایی شناخته‌شده هم‌خوانی داشته و با یافته‌های سایر پژوهشگران نیز هم‌راستا است.

نمودار FTIR در شکل (۳)، شامل دو طیف ترکیب هیالورونیک اسید-کیتوسان-گلو تار آلدئید (HA-Cs-GTA) و دیگری مربوط به نمونه مشابه با تفاوت در اعمال تانیک اسید (HA-Cs-GTA-TA) است. مقایسه بین دو طیف به‌منظور بررسی اثر اعمال تانیک اسید به ترکیب قبلی انجام می‌شود. طیف FTIR ترکیب HA-Cs-GTA-TA (آبی) و HA-Cs-GTA (سیاه)، نشان‌دهنده تغییرات قابل توجه در ساختار شیمیایی است. در طیف HA-Cs-GTA-TA، کاهش شدت و جابه‌جایی پیک‌های $3200-3500\text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه‌های هیدروکسیل و آمین

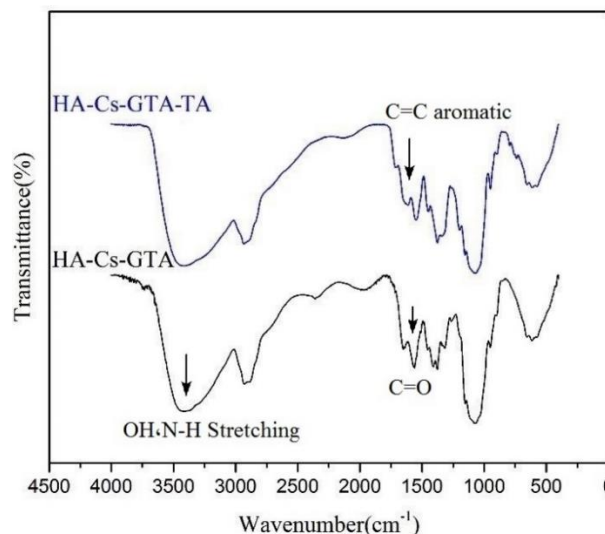


شکل ۲- نمودار طیف FTIR سه نمونه (HA)، (HA-GTA) و (HA-GTA-TA).

ناحیه $3200-3500\text{ cm}^{-1}$ نشان‌دهنده برهم‌کنش گروه‌های هیدروکسیل در واکنش‌های شیمیایی با گروه‌های آلدهیدی گلو تار آلدئید است. این واکنش، منجر به تشکیل پیوندهای کووالانسی نیمه استال یا استال شده و از دست رفتن جزئی آزادی ارتعاشی گروه‌های OH را به دنبال دارد. افزایش شدت و جابه‌جایی پیک C=O در ناحیه $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ نیز تأییدکننده مشارکت گروه‌های کربونیل آزاد و احتمالی در تشکیل پیوندهای جدید بین زنجیره‌های HA است. همچنین تغییرات در ناحیه $1000-1100\text{ cm}^{-1}$ ، مرتبط با پیوندهای C-O-C، به بازآرایی ساختار گلیکوزیدی زنجیره پلی‌ساکاریدی پس از برقراری اتصالات عرضی اشاره دارد. افزودن تانیک اسید (TA) به ترکیب HA-GTA و تشکیل کمپلکس سه‌جزئی HA-GTA-TA، موجب تقویت این تغییرات طیفی می‌شود. کاهش بیشتر پهنای پیک OH بیانگر افزایش برهم‌کنش‌های هیدروژنی ناشی از حضور فراوان گروه‌های فنولی در ساختار تانیک اسید است؛ درحالی‌که افزایش و جابه‌جایی پیک‌های C=O ناشی از تشکیل پیوندهای کووالانسی جدید بین گروه‌های کربونیل گلو تار آلدئید و گروه‌های فعال تانیک اسید (مانند فنول یا کربوکسیلیک) است. حضور ساختارهای آروماتیک حاوی پیوند C=C در تانیک اسید نیز باعث



شکل ۴- نمودار تنش- کرنش فیلم‌های HA-GTA، HA-GTA-TA و HA



شکل ۳- نمودار طیف FTIR دو ترکیب (HA-Cs-GTA) و (HA-Cs-GTA-TA)

HA-CS-GTA-TA نه تنها تأییدی بر برهم‌کنش‌های شیمیایی چندگانه در حضور تانیک اسید است، بلکه نقش آن را در تقویت ساختار شبکه‌ای، افزایش پایداری شیمیایی و بهبود خواص عملکردی سامانه پلیمری نشان می‌دهد.

۳-۲- بررسی نتایج خواص مکانیکی (استحکام کششی)

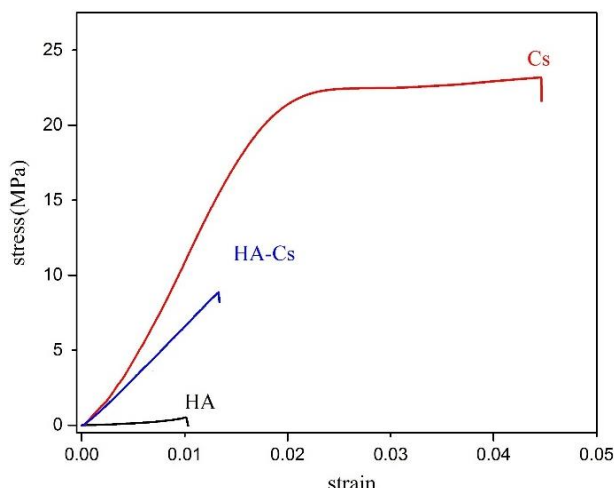
برای تحلیل و بررسی تاثیر اصلاح با گلو تار آلدئید و تانیک اسید بر خواص مکانیکی پلیمر هیالورونیک اسید، همان‌طور که در شکل (۴) مشاهده می‌شود نمودار تنش کرنش سه فیلم پلیمری HA، HA-GTA و HA-GTA-TA، مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

نتایج نشان داد که فیلم پایه HA با مدول یانگ ۴۰-۵۰ کیلو پاسکال، استحکام کششی کمتر از ۵٪ مگاپاسکال و کرنش شکست ۱٪ درصد، دارای ضعیف‌ترین رفتار مکانیکی است. این ضعف، به ساختار خطی و فاقد اتصالات عرضی HA نسبت داده می‌شود که منجر به چقرمگی پایین و شکنندگی بالا می‌گردد. با افزودن گلو تار آلدئید (HA-GTA)، افزایش مدول یانگ تا ۱۰۰-۱۵۰ کیلو پاسکال و استحکام کششی تا ۱/۵ مگاپاسکال مشاهده شد که به دلیل ایجاد پیوندهای کووالانسی بین گروه‌های آلدهیدی و گروه‌های عاملی (به‌ویژه هیدروکسیل و آمین) در زنجیره‌های

مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده برهم‌کنش‌های هیدروژنی بیشتر با تانیک اسید است. همچنین، در ناحیه $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ افزایش شدت پیک کربونیل به دلیل حضور گروه‌های کربونیل اضافی در پوشش تانیک اسید و تعامل آن با ساختار اصلی، به وضوح مشاهده می‌شود. در ناحیه $1500-1600\text{ cm}^{-1}$ ، پیک جدیدی که مربوط به پیوند (C=C) آروماتیک تانیک اسید است، تقویت شده و حضور گروه‌های فنولی تانیک اسید را تأیید می‌کند.

یافته‌های این مطالعه با نتایج و شریعت‌نیا و همکاران (۳۲)، هم‌راستا است؛ آن‌ها نیز کاهش و جابه‌جایی پیک‌های OH و NH را در اثر برهم‌کنش‌های هیدروژنی میان HA و CS گزارش کرده‌اند. بای و همکاران (۳۰)، نیز در ترکیبات حاوی گلو تار آلدئید، افزایش مشخصی در شدت گروه‌های کربونیل را به تشکیل پیوندهای عرضی نسبت داده‌اند که با مشاهدات حاضر در طیف FTIR سازگار است. افزون‌براین، کاپوتسا و همکاران (۳۳)، نشان دادند که تانیک اسید از طریق گروه‌های فنولی خود با زنجیره‌های پلیمری تعامل داشته و پایداری شبکه را افزایش می‌دهد؛ حضور پیک‌های مشخص C=C آروماتیک در این مطالعه نیز مؤید چنین برهم‌کنش‌هایی است.

در مجموع، تغییرات طیفی مشاهده‌شده در نمونه



شکل ۵- نمودار تنش-کرنش فیلم‌های HA، HA-Cs و Cs.

نتایج نشان می‌دهد که افزودن کیتوسان به هیالورونیک اسید در نمونه HA-CS (آبی)، منجر به افزایش چشمگیر مدول یانگ (۱۰۰-۱۵۰ کیلوپاسکال)، افزایش تنش نهایی تا حدود ۱.۵ مگاپاسکال و ارتقاء کرنش شکست تا ۰/۸-۰/۶ درصد شده است. این تغییرات ناشی از تعاملات بین مولکولی قوی‌تر، از جمله پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های آمین کیتوسان و گروه‌های هیدروکسیل هیالورونیک اسید است که موجب ایجاد شبکه پلیمری متراکم‌تر و پایدارتر می‌شود. از طرفی، کیتوسان خالص (نمونه قرمز) با دارا بودن بالاترین مدول یانگ (۱۵۰۰-۲۵۰۰ کیلوپاسکال)، تنش نهایی حدود ۲۵ مگاپاسکال و کرنش شکست ۰/۴ درصد، نشان‌دهنده بیشترین مقاومت کششی در کنار حفظ نسبی انعطاف‌پذیری در بین نمونه‌ها است. ساختار نیمه‌بلوری کیتوسان، به همراه وجود پیوندهای داخلی قوی، عامل اصلی در ایجاد چنین خواصی تلقی می‌شود.

مطالعه لواندوسکا و همکاران (۳۷)، نیز حاکی از آن است که افزودن کیتوسان به فیلم‌های هیالورونیک اسید، از طریق بهبود اتصال بین زنجیره‌های پلیمری، استحکام مکانیکی و انعطاف‌پذیری فیلم‌ها را به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌دهد؛ نتایجی که کاملاً با یافته‌های حاضر هم‌راستا هستند. همچنین در مطالعه‌ای از سیونکوسکا و همکاران (۳۸)، تأثیر کیتوسان در افزایش کشسانی و مقاومت مکانیکی فیلم‌های هیالورونیک اسید

پلیمر است. این اتصالات عرضی باعث تقویت ساختار شبکه‌ای و در نتیجه افزایش سختی و مقاومت مکانیکی شدند. درحالی‌که کرنش شکست نیز تا حدود ۰/۸-۰/۶ درصد افزایش یافت و نشان‌دهنده بهبود جزئی انعطاف‌پذیری در اثر کنترل ساختار است. افزایش بیشتر مدول یانگ تا ۱/۲-۱/۵ مگاپاسکال و استحکام کششی تا ۲ مگاپاسکال در ترکیب HA-GTA-TA، به نقش تقویتی تانیک اسید بازمی‌گردد که از طریق گروه‌های فنولی خود با پلیمر تعامل برقرار کرده و اتصالات شبکه‌ای را افزایش داده است. بااین‌حال، کاهش کرنش شکست به کمتر از ۰/۵ درصد بیانگر محدودیت‌های حرکتی زنجیره‌ها و کاهش انعطاف‌پذیری ناشی از تراکم بیش‌ازحد شبکه پلیمری است.

این یافته‌ها با نتایج لو و همکاران (۳۴)، هم‌راستا هستند که نشان دادند گلو تار آل‌دئید از طریق ایجاد پیوندهای کووالانسی در ساختار HA، موجب افزایش سختی و استحکام فیلم‌ها می‌شود. همچنین، ویکویت و همکاران (۳۵)، گزارش کردند که تانیک اسید با ایجاد تعاملات هیدروژنی و آروماتیک پایدار، به‌طور مؤثری مدول یانگ و استحکام کششی فیلم‌های پلیمری را افزایش می‌دهد، اما به‌واسطه محدود کردن حرکت زنجیره‌ها، منجر به کاهش انعطاف‌پذیری می‌شود. ژو و همکاران (۳۶)، نیز به اثر هم‌افزای گلو تار آل‌دئید و تانیک اسید در افزایش مقاومت مکانیکی و کاهش کرنش شکست در فیلم‌های هیدروژلی اشاره کرده‌اند.

در مجموع، تحلیل داده‌های مکانیکی نشان می‌دهد که افزودن عوامل اتصال‌دهنده، مانند گلو تار آل‌دئید و تانیک اسید، با ایجاد پیوندهای شیمیایی و فیزیکی در ماتریس پلیمری، استحکام و سختی فیلم‌ها را به‌طور مؤثری افزایش می‌دهد، اما این افزایش همراه با کاهش نسبی انعطاف‌پذیری است که باید در طراحی کاربردی سامانه‌های زخم‌پوش مدنظر قرار گیرد.

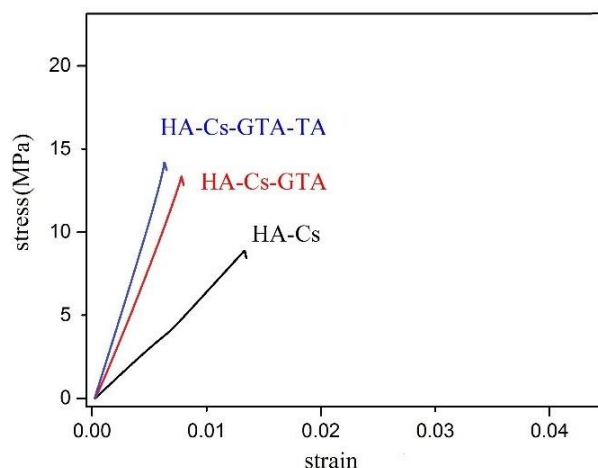
برای بررسی تأثیر افزودن کیتوسان به هیالورونیک اسید و تشکیل ترکیب پلیمری و تعاملات احتمالی بین آن‌ها بر خواص مکانیکی فیلم‌های پلیمری، در شکل (۵) نمودار تنش-کرنش سه فیلم پلیمری هیالورونیک اسید (HA)، کیتوسان (Cs) و هیالورونیک اسید-کیتوسان (HA-Cs)، مورد مقایسه قرار گرفتند.

کاهش کرنش شکست به حدود $0/8-0/6$ درصد نیز دلالت بر افزایش استحکام و کاهش انعطاف‌پذیری دارد که می‌تواند ناشی از ایجاد پیوندهای عرضی کووالانسی بین گروه‌های آمین کیتوسان و آلدئیدی گلووتارآلدئید باشد. این اتصالات عرضی موجب محدودیت حرکات زنجیره‌ای و ایجاد شبکه پلیمری متراکم‌تر شده‌اند.

افزودن تانیک اسید در نمونه HA-Cs-GTA-TA نیز، منجر به افزایش بیشتر مدول یانگ تا $1/5-1/2$ مگاپاسکال و تنش نهایی تا حدود 20 مگاپاسکال شد. کاهش بیشتر کرنش شکست به کمتر از $0/5$ درصد نشان‌دهنده افزایش چشمگیر سختی و کاهش انعطاف‌پذیری است. حضور تانیک اسید به عنوان پلی‌فنولی، با گروه‌های فنولی و آروماتیک متعدد، از طریق برهم‌کنش‌های هیدروژنی و پیوندهای یونی با زنجیره‌های پلیمری، موجب تقویت ساختار و افزایش مقاومت کششی شده است.

این یافته‌ها با نتایج مطالعه پاونی و همکاران (۴۰) هم‌راستا هستند که در آن، اصلاح شیمیایی کیتوسان با گلووتارآلدئید باعث تقویت ساختار مکانیکی فیلم‌ها و افزایش مقاومت در برابر کشش گزارش شده است. همچنین، وارد هونو و همکاران (۴۱)، نشان دادند که تانیک اسید با ایجاد پیوندهای قوی با زنجیره‌های پلیمری، خواص مکانیکی را تقویت کرده ولی انعطاف‌پذیری را کاهش می‌دهد؛ امری که در نمونه‌های حاضر نیز به وضوح مشاهده شد. نتایج مطالعه بالدوین و بوث (۴۲) نیز بر قابلیت تقویت‌کنندگی تانیک اسید در سیستم‌های پلیمری تأکید دارند که با کاهش کرنش شکست و افزایش مدول یانگ همراه بوده است.

درمجموع، داده‌های مکانیکی این تحقیق نشان می‌دهد که اصلاح دوگانه با گلووتارآلدئید و تانیک اسید، نه تنها موجب افزایش استحکام و سختی فیلم‌های HA-CS می‌شود، بلکه ساختاری متراکم و پایدارتر را فراهم می‌سازد که برای کاربردهایی چون مهندسی بافت و پانسمان‌های زخم که نیازمند خواص مکانیکی بالاتر هستند، مناسب خواهد بود.



شکل ۶- نمودار تنش-کرنش فیلم‌های HA-Cs-GTA ، HA-Cs-GTA-TA و HA-Cs.

در محلول‌های رقیق بررسی شد و اثرات مشابهی گزارش شد. در ادامه، همین محققین در پژوهش دیگری استفاده از دی‌آلدئید نشاسته را به عنوان عامل پیوند عرضی بررسی کرده و نشان دادند که افزودن آن در کنار کیتوسان، منجر به افزایش تراکم شبکه و ارتقاء خواص مکانیکی فیلم‌ها می‌شود (۳۹).

درمجموع، ترکیب هیالورونیک اسید با کیتوسان منجر به ایجاد یک ماتریس مکانیکی متعادل با بهبود هم‌زمان در استحکام و انعطاف‌پذیری شده که ناشی از افزایش تعاملات بین‌زنجیره‌ای و پایداری ساختار پلیمری است. چنین ترکیباتی برای کاربردهایی چون زخم‌پوش‌های زیستی که به ویژگی‌های مکانیکی بهینه نیاز دارند، مناسب تلقی می‌شوند.

برای بررسی تأثیر اصلاح با گلووتارآلدئید و تانیک اسید بر خواص مکانیکی فیلم‌های پلیمری ترکیب هیالورونیک اسید و کیتوسان، در شکل (۶) سه فیلم مختلف شامل HA-Cs-GTA و HA-Cs-GTA-TA مورد مقایسه قرار گرفتند.

در مقایسه با نمونه HA (سیاه) که دارای مدول یانگ حدود $80-100$ کیلوپاسکال، تنش نهایی کمتر از 10 مگاپاسکال و کرنش شکست ناچیز است، افزودن گلووتارآلدئید در ترکیب HA-Cs-GTA باعث افزایش مدول یانگ به حدود $150-200$ کیلوپاسکال و ارتقاء تنش نهایی تا حدود 15 مگاپاسکال شد.

۳-۳- نتایج آنالیز تورم (جذب آب)

برای تحلیل جذب آب یا تورم فیلم پلیمری هیالورونیک اسید و کیتوسان اصلاح شده با گلو تار آل‌دئید و تانیک اسید، با استفاده از مقادیر داده شده، ابتدا محاسبات زیر را انجام خواهیم داد:

مقدار جذب آب از رابطه (۱) محاسبه شد:

$$S\% = \frac{W_w - W_d}{W_d} \times 100 = \frac{500 - 60}{60} \times 100 = 733.33\% \quad (1)$$

وزن فیلم در حالت خشک ۶۰ میلی گرم و پس از جذب آب (یعنی در حالت مرطوب) برابر با ۵۰۰ میلی گرم اندازه‌گیری شد. براین اساس، درصد جذب آب یا میزان تورم فیلم پلیمری ساخته شده از هیالورونیک اسید و کیتوسان که با استفاده از گلو تار آل‌دئید و تانیک اسید بهینه سازی شده، حدود ۷۳۳/۳۳ درصد به دست آمد. با وجود آنکه این عدد نسبت به برخی پژوهش‌های مشابه کمتر است، اما همچنان نشان‌دهنده توان خوب این فیلم در جذب رطوبت است.

در پژوهشی که میز-فرناندز و همکاران (۴۳) انجام دادند، ژل‌های هیالورونیک اسید/کیتوسان که با پیوندهای عرضی پویا (دینامیک) ساخته شده بودند، توانایی جذب آبی بین ۵۰۰ تا ۸۰۰ درصد داشتند. این تفاوت می‌تواند به دلیل ساختار سه‌بعدی این ژل‌ها و همچنین به‌کارگیری پیوندهای برگشت‌پذیر باشد که امکان نفوذ بیشتر آب را فراهم می‌کنند. در مقابل، در ترکیب حاضر که از گلو تار آل‌دئید به عنوان عامل پیونددهنده استفاده شده، به نظر می‌رسد شبکه‌ای متراکم‌تر ایجاد شده که تا اندازه‌ای از ورود آب جلوگیری می‌کند. در مطالعه دیگری که وکویت و همکاران (۳۵) انجام دادند، فیلم‌هایی بر پایه هیالورونیک اسید و تانیک اسید توانایی جذب آبی در حدود ۶۰۰ تا ۷۰۰ درصد نشان دادند. این موضوع نشان می‌دهد که تانیک اسید، به دلیل داشتن گروه‌های فنولی، می‌تواند با پلیمرهای زیستی واکنش دهد و خاصیت جذب آب آن‌ها را افزایش دهد. اگرچه در ترکیب حاضر نیز تانیک اسید به کار رفته، اما حضور هم‌زمان آن با گلو تار آل‌دئید ممکن است انعطاف‌پذیری زنجیره‌های پلیمری را کاهش داده و در نتیجه جذب آب را محدودتر کرده باشد. در پژوهشی دیگر، السیخان و

همکاران (۳۱)، هیدروژل‌هایی از کیتوسان و هیالورونیک اسید را برای درمان سرطان بررسی کردند که ظرفیت جذب آب آن‌ها حدود ۷۰۰ درصد گزارش شده است. نزدیکی این عدد به مقدار به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر را می‌توان به ساختار شیمیایی و ویژگی‌های آب‌دوستی مشترک بین این ترکیبات نسبت داد، اگرچه نوع و مقدار عامل پیونددهنده همچنان نقش تعیین‌کننده‌ای در میزان نهایی جذب آب دارد.

درمجموع، جذب آب به میزان ۷۳۳/۳۳ درصد در این فیلم، نشان‌دهنده توان بالای آن در نگه‌داشت رطوبت است؛ قابلیت‌هایی که در محیط زخم به حفظ رطوبت و در نتیجه، تسهیل روند ترمیم بافت کمک شایانی می‌کند. همچنین، تنظیم میزان تورم با انتخاب مناسب عامل‌های پیونددهنده، می‌تواند امکان بهینه‌سازی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی فیلم را برای کاربردهای گوناگون درمانی فراهم آورد.

۳-۴- بررسی نتایج زاویه تماس آب (آب‌دوستی)

در این مطالعه، زاویه تماس سطحی برای فیلم‌های هیالورونیک اسید خالص، کیتوسان خالص و فیلم ترکیبی اصلاح‌شده با گلو تار آل‌دئید و تانیک اسید اندازه‌گیری شد. طبق شکل (۷)، نتایج نشان داد که هیالورونیک اسید خالص دارای زاویه تماسی در حدود ۳۳ درجه است که بیانگر آب‌دوستی بالا به دلیل حضور فراوان گروه‌های هیدروفیل کربوکسیل و هیدروکسیل در ساختار آن می‌باشد. در مقابل، کیتوسان خالص زاویه تماسی در حدود ۶۷ درجه نشان داد که ناشی از وجود گروه‌های آمینی با آب‌دوستی کمتر و ساختار نسبتاً متراکم‌تر این پلیمر است. در ترکیب نهایی اصلاح‌شده، زاویه تماس حدود ۴۵ درجه به‌دست آمد. این مقدار، نتیجه تعادل بین ساختارهای هیدروفیل هیالورونیک اسید و ساختار نسبتاً آبگریزتر کیتوسان است، در کنار نقش اصلاح‌کننده‌هایی مانند گلو تار آل‌دئید که موجب پیوند عرضی و کاهش تورم آزاد سطحی می‌شود و تانیک اسید که با دارا بودن گروه‌های فنولی، قابلیت تعامل با آب و پروتئین‌های سطح سلولی را افزایش می‌دهد؛ بنابراین، کاهش زاویه تماس نسبت به کیتوسان



شکل ۷- تصویر زاویه تماس قطره مایع با سطح سه فیلم پلیمری ترکیبی پیوند عرضی شده، هیالورونیک اسید و کیتوسان.

جدول ۲- مقایسه زاویه تماس آب در نمونه‌های مختلف پلیمری مورد بررسی

ردیف	نوع نمونه / ترکیب	زاویه تماس (درجه)	ویژگی‌های سطحی و تحلیل
۱	هیالورونیک اسید	۳۳	آب‌دوستی بالا به دلیل گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل
۲	کیتوسان	۶۷	آب‌دوستی کمتر به علت گروه‌های آمینی و ساختار متراکم‌تر
۳	HA/CS اصلاح شده	۴۵	تعادل میان آب‌دوستی و پایداری ساختاری

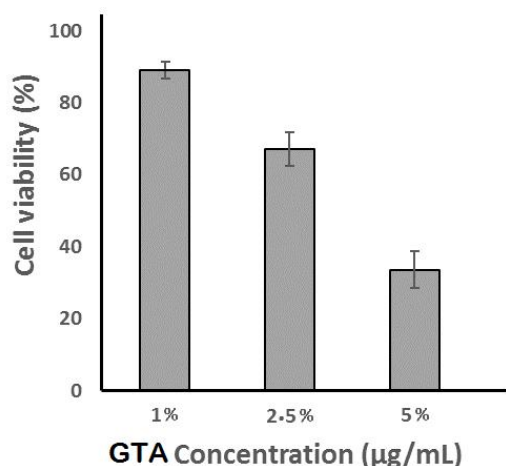
۵۰ درجه کاهش دهد که این مقدار را برای ایجاد شرایط بهینه در تماس با محیط زیستی، مناسب ارزیابی کردند. در مجموع، زاویه تماس ۴۵ درجه به دست آمده در این پژوهش نه تنها نشان‌دهنده بهبود قابل توجه آب‌دوستی نسبت به کیتوسان خالص است، بلکه از نظر ساختاری و عملکردی، تعادلی بین جذب رطوبت، پایداری فیلم و چسبندگی سلولی ایجاد می‌کند. این تعادل برای کاربردهایی چون پانسمان زخم و بازسازی بافت که نیازمند رطوبت کنترل شده و تعامل مؤثر با سلول‌ها هستند، بسیار ارزشمند تلقی می‌شود.

۳-۵- بررسی نتایج ضدباکتری

مطابق با نتایج حاصل از آزمون ضدباکتری همانطور که در شکل (۸) مشاهده می‌شود، هیچ ناحیه‌ای از مهار رشد میکروبی در اطراف فیلم مشاهده نشد. این یافته نشان می‌دهد که فیلم پلیمری ترکیبی شامل هیالورونیک اسید، کیتوسان و گلو تار آلدئید به تنهایی اثر ضدباکتری قابل توجهی از خود نشان نداده است. در حالی که کیتوسان به طور معمول دارای خواص ضدباکتری است، به نظر می‌رسد که ترکیب آن با هیالورونیک اسید و به ویژه گلو تار آلدئید، موجب کاهش این خاصیت شده باشد. این اثر احتمالاً به دلیل

و افزایش آن نسبت به هیالورونیک اسید، گویای ایجاد سطحی با آب‌دوستی متعادل و کنترل شده است؛ ویژگی‌ای که برای کاربردهای ترمیم زخم بسیار مطلوب تلقی می‌شود، زیرا جذب و نگهداری مناسب رطوبت را تضمین می‌کند.

این یافته‌ها و مقادیر موجود در جدول (۲)، با مطالعات پیشین نیز هم‌راستا است. به عنوان مثال، میز-فرناندز و همکاران (۴۳)، زاویه تماس ۳۰-۴۰ درجه را برای هیدروژل‌های هیالورونیک اسید/کیتوسان گزارش کردند که به علت محتوای بالاتر هیالورونیک اسید و ساختار متخلخل‌تر هیدروژلی، آب‌دوستی بیشتری نشان می‌دادند. مطالعه ویکویت و همکاران (۳۵)، نیز فیلم‌های هیالورونیک اسید/تانیک اسید با زاویه تماس ۴۲-۴۷ درجه بررسی کرد و بهبود آب‌دوستی ناشی از تعامل گروه‌های فنولی تانیک اسید با سطح را تأیید نمود. همچنین، در پژوهش الکبلی و همکاران (۴۴)، فیلم‌های ترکیبی هیالورونیک اسید/کیتوسان دارای زاویه تماس ۴۰-۵۰ درجه بودند که مشابه نتایج پژوهش حاضر است و نشان‌دهنده ایجاد تعادل بین آب-دوستی، ساختار فیزیکی متراکم و پایداری مکانیکی بود. در نهایت، مطالعه السیخان و همکاران (۳۱)، تأکید کرد که اصلاح شیمیایی با گلو تار آلدئید می‌تواند زاویه تماس سطحی را به ۳۵-



شکل ۹- نمودار نتایج سمیت سلولی (درصدزنده‌مانی سلول).

مانند نانوذرات ضدباکتری استفاده شود. به‌عنوان نمونه، نانوذرات نقره، اکسید روی یا سایر نانوذرات مشابه، با آزادسازی یون‌های فعال می‌توانند در کنترل رشد باکتری‌ها و پیشگیری از عفونت در محیط زخم مؤثر باشند.

۳-۶- بررسی نتایج تست سمیت سلولی (زیست‌سازگاری)

برای بررسی سمیت سلولی فیلم ترکیبی هیالورونیک اسید، کیتوسان و گلووتارآلدئید، آزمون MTT بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی انجام شد. هدف از این آزمایش، تعیین اثر غلظت‌های مختلف گلووتارآلدئید بر بقای سلولی و زیست‌سازگاری فیلم بود. مطابق با نتایج به‌دست‌آمده (شکل ۹)، فیلم حاوی ۲٪ گلووتارآلدئید زنده‌مانی سلولی حدود ۶۰٪ را نشان داد که حاکی از سمیت نسبی است. در مقابل، کاهش غلظت گلووتارآلدئید به ۱٪ موجب افزایش چشمگیر بقای سلول‌ها تا حدود ۸۵-۹۰٪ شد که بیانگر زیست‌سازگاری مناسب این ترکیب در این غلظت است.

با توجه به نمودار درصد زنده‌مانی در شکل (۹) در آزمایش‌های اولیه، فیلم حاوی غلظت بالای گلووتارآلدئید حدود ۲ درصد (وزنی-حجمی)، تقریباً ۶۰ درصد بقای سلولی را نشان داد که دلالت بر سمیت سلولی نسبی داشت. اما با کاهش غلظت گلووتارآلدئید به ۱ درصد، میزان بقای سلولی به حدود ۸۵-۹۰٪



شکل ۸- تصویر آزمون مهار رشد میکروب با اندازه‌گیری قطر هاله.

واکنش‌های شیمیایی بین گروه‌های عاملی کیتوسان و گلووتارآلدئید است که ممکن است مانع از عملکرد موثر گروه‌های فعال ضدباکتری کیتوسان شوند.

یافته‌های حاضر با مطالعات پیشین نیز هم‌راستا است. برای مثال، دینگ و همکاران (۴۵)، گزارش کردند که هیدروژل‌های مبتنی بر هیالورونیک اسید، به‌ویژه در ترکیب با سایر مواد مانند کیتوسان و گلووتارآلدئید، خاصیت ضدباکتری قابل‌ملاحظه‌ای ندارند. وانگ و همکاران (۴۶)، نیز بیان کردند که اگرچه کیتوسان به‌تنهایی اثرات ضدباکتریایی مطلوبی دارد، اما زمانی که با هیالورونیک اسید و گلووتارآلدئید ترکیب می‌شود، این اثر تا حدی تضعیف می‌گردد. مطالعه الوی و همکاران (۴۷)، نیز به همین موضوع اشاره داشت و نشان داد که واکنش‌های بین کیتوسان و سایر پلیمرها، به‌ویژه در حضور گلووتارآلدئید، می‌تواند کارایی ضدباکتری کیتوسان را کاهش دهد. همچنین، گربسکا-زیلینسکا (۴۸) تأکید کرد که گلووتارآلدئید می‌تواند بسته به نوع ترکیب و شرایط، تأثیرات متفاوتی بر خواص مواد داشته باشد و در برخی موارد باعث کاهش ویژگی‌های ضدباکتریایی شود.

براین‌اساس می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب سه‌گانه هیالورونیک اسید، کیتوسان و گلووتارآلدئید، به دلیل تعاملات شیمیایی میان اجزای سازنده، ممکن است اثر ضدباکتری هر یک از ترکیبات را خنثی یا تضعیف کند. برای ارتقای خاصیت ضدباکتری این نوع فیلم‌ها، پیشنهاد می‌شود از عوامل تقویت‌کننده

جدول ۳- مقایسه اثر غلظت گلو تار آلدئید بر زنده‌مانی سلولی

غلظت گلو تار آلدئید (% وزنی-حجمی)	درصد زنده‌مانی سلول‌ها $\pm$ انحراف معیار	نتیجه آماری (ANOVA, $p < 0.05$)
۵	40 ± 3	تفاوت معنادار نسبت به گروه ۲/۵٪ و ۱٪
۲/۵	65 ± 4	تفاوت معنادار نسبت به گروه ۱٪ و ۵٪
۱	88 ± 2	تفاوت معنادار نسبت به گروه ۲/۵٪ و ۵٪

درصد افزایش یافت که نشان‌دهنده زیست‌سازگاری مناسب در این شرایط بود.

برای بررسی معناداری اختلاف میان گروه‌ها، از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. نتایج این تحلیل نشان داد همان‌طور که در جدول (۳) مشاهده می‌شود، اختلاف میان گروه‌ها از نظر آماری معنی‌دار است ($p < 0.05$) به‌منظور مشخص‌سازی گروه‌های دارای تفاوت معنادار، از آزمون Tukey به‌عنوان آزمون تعقیبی استفاده گردید.

این یافته‌ها نشان می‌دهند که غلظت گلو تار آلدئید تأثیر مستقیمی بر سمیت سلولی دارد. با کاهش میزان این عامل اتصال عرضی، می‌توان زیست‌سازگاری فیلم را به‌طور مؤثری بهبود بخشید، بدون آنکه عملکرد مکانیکی فیلم به‌طور محسوسی کاهش یابد.

در مطالعه ای یان و همکاران (۴۹)، در بررسی خود نشان دادند که استفاده از ۵/۰٪ تا ۱٪ گلو تار آلدئید در پیوند عرضی ساختار رشته‌ای ژل، سمیت سلولی نسبی و بهبود زیست‌سازگاری را در پی دارد. دروزدوا و همکاران (۵۰)، نیز گزارش کرده‌اند که ترکیب‌های هیدروژل بر اساس کیتوسان و هیالورونیک اسید با گلو تار آلدئید در غلظت‌های بالاتر از ۱٪ به سمیت سلولی منجر می‌شوند و کاهش غلظت گلو تار آلدئید به زیر ۱٪ منجر به بهبود زیست‌سازگاری می‌شود. گربسکا-زیلینسکا (۵۱)، این نکته اشاره کرده است که استفاده از گلو تار آلدئید در غلظت‌های بالای ۲٪ می‌تواند خواص زیست‌سازگاری را کاهش دهد و برای بهبود این ویژگی‌ها، تنظیم دقیق غلظت گلو تار آلدئید ضروری است.

مطالعات نشان می‌دهند که غلظت‌های بالای گلو تار آلدئید

باعث سمیت سلولی می‌شوند و کاهش آن به غلظت‌های پایین‌تر، مانند ۱٪ یا کمتر، موجب بهبود زیست‌سازگاری می‌شود. بهینه‌سازی غلظت گلو تار آلدئید، گامی کلیدی در طراحی فیلم‌های پلیمری ایمن و کارآمد برای استفاده در کاربردهای زیست‌پزشکی به‌ویژه زخم‌پوش‌ها به‌شمار می‌رود.

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، فیلم‌های پلیمری ترکیبی بر پایه هیالورونیک اسید و کیتوسان با هدف توسعه زخم‌پوش‌هایی با عملکرد چندگانه، طراحی، تهیه و مورد ارزیابی جامع قرار گرفتند. یکی از نوآوری‌های کلیدی این مطالعه، استفاده هم‌زمان از دو عامل پیوند عرضی گلو تار آلدئید (GTA) و تانیک اسید (TA) بود که در کنار ترکیب دو پلی‌ساکارید زیست‌سازگار، ساختاری شبکه‌ای و متراکم ایجاد کرد که عملکرد مکانیکی، زیستی و سطحی فیلم‌ها را به‌طور قابل‌توجهی ارتقا داد. تحلیل‌های FTIR بیانگر تشکیل پیوندهای شیمیایی مؤثر بین اجزای پلیمری و عوامل پیوند عرضی بود که منجر به افزایش پایداری ساختاری فیلم‌ها گردید. در آزمون‌های مکانیکی، افزایش چشم‌گیر مدول یانگ و استحکام کششی در نمونه‌های اصلاح‌شده، نسبت به فیلم‌های خالص مشاهده شد که حاکی از تقویت مقاومت در برابر نیروهای محیطی است—ویژگی‌ای حیاتی برای کاربرد در بستر زخم، به‌ویژه در نواحی دارای تحرک بالا مانند مفاصل. همچنین، بررسی خواص سطحی نشان داد که زاویه تماس کنترل‌شده و جذب آب مناسب، شرایط ایده‌آلی برای حفظ رطوبت بستر زخم و تسهیل فرآیند ترمیم فراهم می‌کنند. از نظر زیستی، فیلم‌های اصلاح‌شده در غلظت‌های بهینه گلو تار آلدئید، زیست‌سازگاری مناسبی از

تشکر و سپاسگزاری

این تحقیق به عنوان بخشی از پایان‌نامه اینجانب در پژوهشگاه مواد و انرژی انجام شده است. بدین‌وسیله مراتب قدردانی خود را از اعضای محترم هیئت علمی و کارکنان آزمایشگاه‌های آن پژوهشگاه که در انجام این پژوهش همکاری داشتند، ابراز می‌دارم.

این تحقیق حمایت مالی مستقیمی از مؤسسات عمومی، صنعتی یا غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اذعان دارند هیچ نوع تضاد منافی با شخص، شرکت یا سازمانی برای این پژوهش ندارند.

سهم نویسندگان

فرهاد احمدی: طراحی و ایده‌پردازی مطالعه، جمع‌آوری داده‌ها، تحلیل و تفسیر داده‌ها، اعتبارسنجی نتایج و نگارش مقاله. **سید مجتبی حسینی‌فرد:** طراحی مطالعه، تحلیل داده‌ها، راهنمایی علمی و بازبینی و اصلاح محتوای مقاله. **محمدرضا واعظی:** تحلیل داده‌ها، هدایت علمی پروژه و بازبینی مقاله. **لیلا محمدی:** ارائه مشاوره در طراحی و تفسیر نتایج، بازبینی محتوای علمی. **محمدعلی نیلفروش‌زاده:** مشاوره تخصصی در جنبه‌های کاربردی و پزشکی پروژه، بازبینی مقاله.

خود نشان دادند (۸۵-۹۰٪ زنده‌مانی سلولی) که این ویژگی، آن‌ها را برای تماس مستقیم با بافت زنده قابل‌اطمینان می‌سازد. با این حال، برخلاف انتظار، فعالیت ضدباکتریایی مؤثری در فیلم‌های ترکیبی مشاهده نشد. احتمال می‌رود که تعاملات شیمیایی میان کیتوسان و گلو تار آل‌دئید، موجب غیرفعال شدن گروه‌های آمینی کیتوسان و تضعیف عملکرد ضدباکتریایی آن شده باشد؛ بنابراین، گرچه این فیلم‌ها از لحاظ ساختاری و عملکرد فیزیکی، مکانیکی، آب‌دوستی و زیست‌سازگاری پتانسیل قابل توجهی برای جایگاه‌یابی به عنوان زخم‌پوش‌های نوین دارند، اما نبود اثر ضدباکتریایی مؤثر، یک نقطه ضعف مهم تلقی می‌شود. در این راستا، پیشنهاد می‌شود در مراحل آتی تحقیق، ترکیب این سامانه با نانوذرات ضدباکتری (مانند نانوذرات نقره، اکسید روی یا نانوکیتوسان) بررسی شود تا از نظر ممانعت از رشد میکروبی نیز، سطح عملکرد فیلم‌ها ارتقا یابد.

در مجموع، این تحقیق گامی مؤثر در مسیر توسعه سامانه‌های پلیمری چندکاره برای کاربرد در درمان زخم‌های مزمن، دیابتی و عفونی بوده و نشان می‌دهد که طراحی هوشمندانه ساختار و اصلاحات شیمیایی هدفمند می‌تواند پلیمرهای طبیعی را به زخم‌پوش‌هایی با ویژگی‌های فیزیکی و زیستی پیشرفته تبدیل نماید. ادامه این مسیر می‌تواند به تولید نسل جدیدی از پانسمان‌های زیستی منتهی شود که نه تنها محافظ زخم‌اند، بلکه فعالانه در فرآیند ترمیم آن مشارکت می‌کنند.

واژه‌نامه

1. hyaluronic acid (HA)
2. hydrolytic degradation
3. enzymatic degradation
4. glutaraldehyde (GTA)
5. tannic acid (TA)
6. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)
7. tensile test
8. water contact angle (WCA)
9. tensile strength (TS)
10. disk diffusion assay
11. *Staphylococcus aureus*
12. *Escherichia coli*
13. MTT assay

مراجع

- Jin M, Shi J, Zhu W, Yao H, Wang DA. Polysaccharide-based biomaterials in tissue engineering: a review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2021;27(6):604-26. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2020.0208>
- Petrila LM, Bucatariu F, Mihai M, Teodosiu C. Polyelectrolyte multilayers: An overview on fabrication, properties, and biomedical and environmental applications. *Materials*. 2021;14(15): 4152. <https://doi.org/10.3390/ma14154152>
- Wang CG, Suratman NE, Chang JJ, Ong ZL, Li B, Fan X, Loh XJ, Li Z. Polyelectrolyte hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine. *Chemistry—An Asian J*. 2022;17(18):e202200604. <https://doi.org/10.1002/asia.202200604>
- Sivakumar PM, Yetisgin AA, Demir E, Sahin SB, Cetinel S. Polysaccharide-bioceramic composites for bone tissue engineering: A review. *Int J Biol Macromol*. 2023;126:237. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.01.174>
- Kastania G, Campbell J, Mitford J, Volodkin D. Polyelectrolyte multilayer capsule (PEMC)-based scaffolds for tissue engineering. *Micromachines*. 2020;11(9):797. <https://doi.org/10.3390/mi11090797>
- Niziolek K, Słota D, Sobczak-Kupiec A. Polysaccharide-based composite systems in bone tissue engineering: A review. *Materials*. 2024;17(17): 4220. <https://doi.org/10.3390/ma17174220>
- Lin Y, Wang X, Liu Q, Fang Y. Preparation and application of chitosan-based polyelectrolyte complex materials: An overview. *Paper & Biomaterials*. 2022; 7(4). <https://doi.org/10.53594/pb.2022.7.4.014>
- Fourie J, Taute F, du Preez L, De Beer D. Chitosan composite biomaterials for bone tissue engineering—a review. *Regen Eng Transl Med*. 2022;1-21. <https://doi.org/10.1007/s40810-022-00141-1>
- Zheng Z, Patel M, Patel R. Hyaluronic acid-based materials for bone regeneration: A review. *React Funct Polym*. 2022;171:105151. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105151>
- Savencu I, Iurian S, Porfire A, Bogdan C, Tomuța I. Review of advances in polymeric wound dressing films. *React Funct Polym*. 2021;168:105059. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105059>
- Gonçalves MM, Carneiro J, Justus B, Espinoza JT, Budel JM, Farago PV, Paula JP. Preparation and characterization of a novel antimicrobial film dressing for wound healing application. *Braz J Pharm Sci*. 2021;56:e18784. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902021000318784>
- da Silva TN, Cardoso SA, da Silva FF, de Carvalho Patricio BF, Gonçalves RP, Weissmuller G, El-cheikh MC, Carneiro K, Barradas TN. Chitosan-based films filled with nanoencapsulated essential oil: Physical-chemical characterization and enhanced wound healing activity. *Int J Biol Macromol*. 2024;261: 129049. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.12.099>
- Kuddushi M, Shah AA, Ayranci C, Zhang X. Recent advances in novel materials and techniques for developing transparent wound dressings. *J Mater Chem B*. 2023;11(27):6201-24. <https://doi.org/10.1039/d3tb00547b>
- Borbolla-Jiménez FV, Peña-Corona SI, Farah SJ, Jiménez-Valdés MT, Pineda-Pérez E, Romero-Montero A, Del Prado-Audelo ML, Bernal-Chávez SA, Magaña JJ, Leyva-Gómez G. Films for wound healing fabricated using a solvent casting technique. *Pharmaceutics*. 2023;15(7):1914. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071914>
- Saraiva MM, Campelo MD, Camara Neto JF, Lima AB, Silva GD, Dias AT, Ricardo NM, Kaplan DL, Ribeiro ME. Alginate/polyvinyl alcohol films for wound healing: Advantages and challenges. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2023;111(1):220-33. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34993>
- Koshy JT, Vasudevan D, Sangeetha D, Prabu AA. Biopolymer based multifunctional films loaded with anthocyanin rich floral extract and ZnO nanoparticles for smart packaging and wound healing applications. *Polymers*. 2023;15(10):2372. <https://doi.org/10.3390/polym15102372>
- Savencu I, Iurian S, Porfire A, Bogdan C, Tomuța I. Review of advances in polymeric wound dressing films. *React Funct Polym*. 2021;168:105059. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105059>
- Moholkar DN, Sadalage PS, Peixoto D, Paiva-Santos AC, Pawar KD. Recent advances in biopolymer-based formulations for wound healing applications. *Eur Polym J*. 2021;160:110784. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110784>
- de Souza RF, de Souza FC, Bierhalz AC, Pires AL, Moraes ÂM. Biopolymer-based films and membranes as wound dressings. In: *Biopolymer Membranes and Films*. Elsevier. 2020;165-94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817227-2.00009-6>
- MohammadKarimi S, Ershad-Langroudi A, Alizadegan F. Surface analysis and water contact angle of modified natural biopolymers. In: *Handbook of Natural Polymers*, Volume 2. Elsevier. 2024;473-500. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819471-7.00022-0>
- Kumar A, Mishra RK, Verma K, Aldosari SM, Maity CK, Verma S, Patel R, Thakur VK. A comprehensive review of various biopolymer composites and their applications: from biocompatibility to self-healing. *Mater Today Sustain*. 2023;23:100431. <https://doi.org/10.1016/j.mtsust.2023.100431>
- Priya S, Choudhari M, Tomar Y, Desai VM, Innani S, Dubey SK, Singhvi G. Exploring polysaccharide-based bio-adhesive topical film as a potential platform for wound dressing application: A review. *Carbohydr Polym*. 2023;121:121655.

- <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121655>
23. Kozłowska J, Skopińska-Wisniewska J, Kaczmarek-Szczepańska B, Grabska-Zielińska S, Makurat-Kasprolewicz B, Michno A, Ronowska A, Wekwejt M. Gelatin and gelatin/starch-based films modified with sorbitol for wound healing. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2023;148:106205. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2023.106205>
 24. Kumar M, Mahmood S, Chopra S, Bhatia A. Biopolymer based nanoparticles and their therapeutic potential in wound healing—A review. *Int J Biol Macromol.* 2024;131:131335. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.01.070>
 25. Gobi R, Ravichandiran P, Babu RS, Yoo DJ. Biopolymer and synthetic polymer-based nanocomposites in wound dressing applications: a review. *Polymers.* 2021;13(12):1962. <https://doi.org/10.3390/polym13121962>
 26. Savencu I, Iurian S, Porfire A, Bogdan C, Tomuță I. Review of advances in polymeric wound dressing films. *React Funct Polym.* 2021;168:105059. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105059>
 27. Abourehab MA, Rajendran RR, Singh A, Pramanik S, Shrivastav P, Ansari MJ, Manne R, Amaral LS, Deepak A. Alginate as a promising biopolymer in drug delivery and wound healing: A review of the state-of-the-art. *Int J Mol Sci.* 2022;23(16):9035. <https://doi.org/10.3390/ijms23169035>
 28. Alkhursani SA, Ghobashy MM, Al-Gahtany SA, Meganid AS, Abd El-Halim SM, Ahmad Z, Khan FS, Atia GA, Cavalu S. Application of nano-inspired scaffolds-based biopolymer hydrogel for bone and periodontal tissue regeneration. *Polymers.* 2022;14(18):3791. <https://doi.org/10.3390/polym14183791>
 29. Chen Y, Song H, Wu M, Lu Y, Guan X. Application of protein-polysaccharide complex system in the delivery of active ingredients. *Prog Chem.* 2022;34(10):2267. <https://doi.org/10.53560/pc.2022.34.10.2267>
 30. Bai Q, Gao Q, Hu F, Zheng C, Chen W, Sun N, Liu J, Zhang Y, Wu X, Lu T. Chitosan and hyaluronic-based hydrogels could promote the infected wound healing. *Int J Biol Macromol.* 2023;232:123271. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.03.045>
 31. Alsaikhan F, Farhood B. Recent advances on chitosan/hyaluronic acid-based stimuli-responsive hydrogels and composites for cancer treatment: A comprehensive review. *Int J Biol Macromol.* 2024;135:135893. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.01.106>
 32. Shariatnia Z, Jalali AM. Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications. *Int J Biol Macromol.* 2018;115:194-220. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.103>
 33. Kapusta O, Jarosz A, Stadnik K, Giannakoudakis DA, Barczyński B, Barczak M. Antimicrobial natural hydrogels in biomedicine: Properties, applications, and challenges—A concise review. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3):2191. <https://doi.org/10.3390/ijms24032191>
 34. Luo Y, Tan J, Zhou Y, Guo Y, Liao X, He L, Li D, Li X, Liu Y. From crosslinking strategies to biomedical applications of hyaluronic acid-based hydrogels: A review. *Int J Biol Macromol.* 2023;231:123308. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.03.111>
 35. Wekwejt M, Małek M, Ronowska A, Michno A, Pałubicka A, Zasada L, Klimek A, Kaczmarek-Szczepańska B. Hyaluronic acid/tannic acid films for wound healing application. *Int J Biol Macromol.* 2024;254:128101. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.12.157>
 36. Zhu L, Ouyang F, Fu X, Wang Y, Li T, Wen M, Zha G, Yang X. Tannic acid modified keratin/sodium alginate/carboxymethyl chitosan biocomposite hydrogels with good mechanical properties and swelling behavior. *Sci Rep.* 2024;14(1):12864. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-36114-5>
 37. Lewandowska K, Sionkowska A, Grabska S, Michalska M. Characterisation of chitosan/hyaluronic acid blend films modified by collagen. *Prog Chem Appl Chitin Deriv.* 2017;22:125-34. <https://doi.org/10.1515/pca-2017-0012>
 38. Sionkowska A, Michalska-Sionkowska M, Walczak M. Preparation and characterization of collagen/hyaluronic acid/chitosan film crosslinked with dialdehyde starch. *Int J Biol Macromol.* 2020;149:290-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.145>
 39. Sionkowska A, Grabska S, Lewandowska K, Michalska M. The miscibility of collagen/hyaluronic acid/chitosan blends investigated in dilute solutions and solids. *J Mol Liq.* 2016;220:726-30. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.05.091>
 40. Pavoni JM, dos Santos NZ, May IC, Pollo LD, Tessaro IC. Impact of acid type and glutaraldehyde crosslinking in the physicochemical and mechanical properties and biodegradability of chitosan films. *Polym Bull.* 2021;78:981-1000. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03394-0>
 41. Wardhono EY, Pinem MP, Susilo S, Siom BJ, Sudrajat A, Pramono A, Meliana Y, Guénin E. Modification of physio-mechanical properties of chitosan-based films via physical treatment approach. *Polymers.* 2022;14(23):5216. <https://doi.org/10.3390/polym14235216>
 42. Baldwin A, Booth BW. Biomedical applications of tannic acid. *J Biomater Appl.* 2022;36(8):1503-23. <https://doi.org/10.1177/08853282221077914>
 43. Maiz-Fernández S, Pérez-Álvarez L, Silván U, Vilas-Vilela JL, Lanceros-Méndez S. Dynamic and self-healable chitosan/hyaluronic acid-based in situ-forming hydrogels. *Gels.* 2022;8(8):477. <https://doi.org/10.3390/gels8080477>
 44. Alkabli J. Recent advances in the development of chitosan/hyaluronic acid-based hybrid materials for skin protection, regeneration, and healing: A review.

- Int J Biol Macromol. 2024;135357. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.09.006>
45. Ding YW, Wang ZY, Ren ZW, Zhang XW, Wei DX. Advances in modified hyaluronic acid-based hydrogels for skin wound healing. *Biomater Sci.* 2022;10(13):3393-409. <https://doi.org/10.1039/d2bm00383d>
 46. Wang Y, Wang Z, Lu W, Hu Y. Review on chitosan-based antibacterial hydrogels: preparation, mechanisms, and applications. *Int J Biol Macromol.* 2024;255:128080. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.12.033>
 47. Lv S, Zhang S, Zuo J, Liang S, Yang J, Wang J, Wei D. Progress in preparation and properties of chitosan-based hydrogels. *Int J Biol Macromol.* 2023;242:124915. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.04.045>
 48. Grabska-Zielińska S. Cross-linking agents in three-component materials dedicated to biomedical applications: A review. *Polymers.* 2024;16(18):2679. <https://doi.org/10.3390/polym16182679>
 49. Yan M, An X, Duan S, et al. A comparative study on cross-linking of fibrillar gel prepared by tilapia collagen and hyaluronic acid with EDC/NHS and genipin. *Int J Biol Macromol.* 2022;213:639-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.081>
 50. Drozdova M, Vodyakova M, Tolstova T, et al. Composite hydrogels based on cross-linked chitosan and low molecular weight hyaluronic acid for tissue engineering. *Polymers.* 2023;15(10):2371. <https://doi.org/10.3390/polym15102371>
 51. Grabska-Zielińska S. Cross-linking agents in three-component materials dedicated to biomedical applications: A review. *Polymers.* 2024;16(18):2679. <https://doi.org/10.3390/polym16182679>