

## Investigation on cross-linked nanomicrobial cellulose properties as modern wound dressing

Sahar Abbasi Geravand<sup>1</sup>, Ramin Khajavi<sup>2</sup>, Mohammad Karim Rahimi<sup>3</sup>, Manouchehr Shamsini Ghiyasvand<sup>4</sup>, Amin Meftah<sup>5</sup>

<sup>1</sup> PhD Student, Department of Biomedical Engineering, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Professor, Department of Polymer and Textile Engineering, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medical, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Assistant Professor, Faculty of Biomedical Engineering, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>5</sup> Assistant Professor, Department of Polymer and Textile Engineering, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

### Abstract

**Background:** Nanomicrobial cellulose is an important biopolymer with a three-dimensional structure that is produced by some microorganisms and has been widely used in medicine. One of the unique properties of microbial cellulose is its very high water absorption, which can be used to produce modern wound dressings. But after drying, its three-dimensional structure collapses and the amount of water reabsorption decreases. Accordingly, the aim of this project was to preserve the three-dimensional structure of nanomicrobial cellulose by networking it and improving the water reabsorption properties of this biopolymer. In addition, the cell viability, proliferation, and cell growth of the modified structure and untreated microbial cellulose were also studied.

**Materials and methods:** In this study, microbial cellulose was produced, purified, and neutralized using stationary culture. The samples were then treated with different concentrations of citric acid/sodium hypophosphite and crosslinked. Finally, the characteristics of treated and raw samples were studied by various tests including ATR-FTIR, MTT, SEM, water absorption and in vitro and in vitro tests.

**Results:** According to the results, it was found that the cross-linking operation prevents the collapse of the structure and not only does not cause toxicity, but in addition to increasing water uptake, it also increases viability, adhesion, and cell proliferation in the modified cellulose.

**Conclusion:** Cross-linked nanomicrobial cellulose has high potential as a modern wound dressing.

**Keywords** Nanomicrobial cellulose, Cross-linking, Modern wound dressing, Cell viability, Proliferation, High water absorption.

**Cited as:** Abbasi Geravand S, Khajavi R, Rahimi MK, Shamsini Ghiyasvand M, Meftah A. Investigation on cross-linked nanomicrobial cellulose properties as modern wound dressing. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2022; 32(1): 11-20.

**Correspondence to:** Ramin Khajavi

**Tel:** +98 9126359223

**E-mail:** Khajavi@azad.ac.ir

**ORCID ID:** 0000-0003-0375-2550

**Received:** 1 Sep 2021; **Accepted:** 12 Jan 2022

## بررسی خواص نانوسلولز میکروبی شبکه‌ای شده به عنوان زخم پوش نوین

سحر عباسی گراوند<sup>۱</sup>، رامین خواجوی<sup>۲</sup>، محمد کریم رحیمی<sup>۳</sup>، منوچهر شمسینی غیاثوند<sup>۴</sup>، امین مفتاحی<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری تخصصی، گروه مهندسی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران، ایران

<sup>۲</sup> پروفیسور، گروه مهندسی پلیمر و نساجی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران، ایران

<sup>۳</sup> دانشیار، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران

<sup>۴</sup> استادیار، گروه مهندسی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران، ایران

<sup>۵</sup> استادیار، گروه مهندسی پلیمر و نساجی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** نانوسلولز میکروبی نوعی بیوپلیمر مهم دارای ساختار سه بعدی است که توسط برخی میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شود و در پزشکی کاربرد زیادی یافته است. یکی از خصوصیات منحصر به فرد سلولز میکروبی، جذب آب بسیار بالای آن است که می‌تواند برای تولید زخم پوش‌های مدرن استفاده شود؛ اما پس از خشک شدن، ساختار سه بعدی آن فرو می‌ریزد و مقدار باز جذب آب آن کاهش می‌یابد. هدف این پژوهش، حفظ ساختار سه بعدی نانو سلولز میکروبی به کمک شبکه‌ای کردن آن و ارتقاء خصوصیات باز جذب آب این بیوپلیمر است. به علاوه، بررسی میزان زنده مانی، تکثیر و رشد سلولی بر روی ساختار سلولز میکروبی اصلاح شده و عمل نشده نیز مطالعه شد.

**روش بررسی:** در این تحقیق، سلولز میکروبی با استفاده از کشت ساکن تولید، تخلیص و خنثی سازی شد. سپس نمونه‌ها با غلظت‌های متفاوت اسید سیتریک/هیپوفوسفیت سدیم عمل شده و شبکه‌ای شدند. در نهایت خصوصیات نمونه‌های عمل شده و خام با آزمون‌های مختلف شامل SEM، MTT، ATR-FTIR، جذب آب و آزمایشات برون و درون تنی بررسی شد.

**یافته‌ها:** بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد عملیات ایجاد پیوند عرضی از فروپاشی ساختار جلوگیری می‌کند و نه تنها باعث سمیت نمی‌شود، بلکه علاوه بر افزایش میزان جذب آب، میزان زنده مانی، چسبندگی و تکثیر سلولی را نیز در سلولز اصلاح شده افزایش می‌دهد.

**نتیجه گیری:** سلولز میکروبی شبکه‌ای شده، دارای پتانسیل بالایی به عنوان زخم پوش مدرن است.

**واژگان کلیدی:** نانوسلولز میکروبی، پیوند عرضی، زخم پوش مدرن، زنده مانی، تکثیر سلولی، جذب آب بالا.

### مقدمه

پانسمان زخم برای تسریع التیام زخم و جلوگیری از عفونی شدن آن انجام می‌شود. پانسمان‌های مرسوم اکثراً پنبه‌ای هستند و باعث خشک شدن زخم، چسبیدن به آن و ایجاد حساسیت در برخی افراد می‌شوند و در نتیجه باعث طولانی شدن زمان ترمیم،

تعویض دردناک پانسمان و مشکلات دیگر برای بیمار خواهند شد (۱).

بنابراین محققان با کشف سلولز میکروبی که دارای ویژگی‌های مطلوب به عنوان یک پانسمان ایده آل است، دری تازه بر روی پانسمان‌های بیولوژیکی گشودند. سلولز میکروبی (MC: Bacterial Cellulose) یکی از برجسته‌ترین پلی ساکاریدهای میکروبی است (۲) که در بسیاری از بخش‌های صنعتی و تحقیقاتی، از جمله نساجی، صنایع غذایی، لوازم آرایشی، الکترونیک و صنایع پزشکی مورد توجه قرار گرفته است (۳-۷).

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه مهندسی پلیمر و نساجی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب.

رامین خواجوی (email: Khajavi@azad.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0003-0375-2550

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۶/۱۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۰/۲۲

ترشحات زخم را با توجه به نسبت سطح به حجم زیاد، جذب کرد. همچنین به علت وجود پیوندهای هیدروژنی بین الیاف، استحکام بسیار بالایی در سلولز میکروبی وجود دارد که از تغییر شکل آن جلوگیری به عمل می‌آورد. به علاوه، با توجه به وجود منافذ نانومتری موجود در ساختار آن، می‌تواند به عنوان مانعی طبیعی در برابر حمله انواع باکتری‌های عفونی به حساب آید و با تنظیم شرایط رشد استوباکتر می‌توان اندازه، شکل، تخلخل و ضخامت لایه سلولز میکروبی را کنترل کرد (۱۵).

با وجود خواص منحصر به فرد سلولز میکروبی برای کاربردهای زیست پزشکی، این بیوپلیمر با از دست دادن آب خود، ساختار سه بعدی اش در هم فرو رفته و از بین می‌رود و این اتفاق تأثیر منفی بر باز جذب و ظرفیت نگهداری آب آن دارد. بنابراین، می‌توان آن را به عنوان یک نقطه ضعف در تولید پانسما از سلولز میکروبی دانست. بر همین اساس خواجوی و همکارانش (۱۶) برای غلبه بر این ضعف، کوشیدند تا با ایجاد اتصال عرضی و شبکه‌ای نمودن ساختار سلولز میکروبی با استفاده از پلی کربوکسیلیک اسیدها، ساختار سه بعدی نانوالیافی سلولز میکروبی را حفظ کنند. با توجه به نتایج به دست آمده، ظرفیت نگهداری آب، میزان تورم و تخلخل سلولز میکروبی اصلاح شده نسبت به نمونه خام افزایش قابل توجهی نشان داد.

به همین دلیل در این پژوهش، در ادامه تحقیقات گذشته، تلاش شده است علاوه بر بررسی خواص شیمیایی، فیزیکی و مورفولوژیکی سلولز میکروبی شبکه‌ای شده، به مطالعه خواص بیوپزشکی آن با استفاده از ارزیابی‌های برون تنی و درون تنی به عنوان یک زخم پوش نوین پرداخته شود.

## مواد و روشها

### سنتز و خالص سازی سلولز میکروبی

برای تولید سلولز میکروبی از سویه *BPR2001 Komagataeibacter xylinus* (تهیه شده از مجموعه میکروارگانیسیم‌ها، دانشگاه تهران) استفاده شد. باکتری تولیدکننده سلولز، جهت تولید آن به منابع غذایی مختلفی نیازمند است؛ به همین منظور در این پژوهش از محیط کشت ساکن شارم-هیسترتین (HS: Hestrin-Schramm) شامل ترکیبات سدیم هیدروژن فسفات (۳/۳ گرم در لیتر)، اسید سیتریک (۱/۱۵ گرم در لیتر)، پپتون (۵ گرم در لیتر) و سولفات منیزیم (۰/۵ گرم در لیتر) استفاده شد. پس از تهیه محیط کشت، به منظور از بین بردن آلودگی‌های میکروبی و استریل کردن آن، از اتوکلاو (دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد/ ۶۰ دقیقه) بهره گرفته

این بیوپلیمر، به شکل یک زیست فیلم، توسط باکتری‌های مختلفی مانند استوباکتر زایلینوم که یک باکتری گرم منفی است، تولید می‌شود (**Error! Bookmark not defined.**).

در طی فرآیند بیوسنتز باکتری‌ها، آنها ترکیبات مختلف محیط کشت را مصرف کرده و زنجیره‌های خطی بتا ۱ و ۴-گلوکان را تولید می‌نمایند. زنجیره‌ها توسط منافذی از سطح سلول به خارج ترشح و با به هم پیوستن آنها نانو الیاف در محیط کشت پراکنده می‌گردند. با افزایش میزان نانو الیاف و نهایتاً اتصالشان به یکدیگر، یک لایه سه بعدی لطیف و ژلاتینی با مقاومت مکانیکی بالا تشکیل می‌شود (**Error! Bookmark not defined.**). در واقع سلولز میکروبی، از لحاظ شیمیایی ساختاری مشابه سلولز گیاهی دارد، اما از خلوص بالاتر، ترکیب الیاف ظریف‌تر، استحکام منحصر به فرد و سازگاری زیستی بیشتری برخوردار است (۸).

سلولز میکروبی، یک ساختار سه بعدی الیافی است که می‌تواند در ترکیب با انواع مختلف مواد به راحتی اصلاح شود و آن را به یک نانوکامپوزیت مناسب برای کاربردهای پزشکی تبدیل کند (۹). همچنین یک بستر سه بعدی مناسب برای اتصال سلول و رشد آن را فراهم می‌نماید (۱۰، ۱۱). غشاهای سلولز میکروبی، روند اپیتلیالیزاسیون را تسریع می‌کنند و از ایجاد عفونت جلوگیری می‌کنند (**Error! Bookmark not defined.**). بر همین اساس در سال‌های اخیر این بیوپلیمر به عنوان بستری مناسب برای رشد انواع مختلف سلول مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۲).

در واقع بهبود زخم با هدف بازبازی عملکرد ساختاری و بیولوژیکی پوست انجام می‌شود. همانطور که بیان شد، پانسماهای پنبه‌ای به دلیل ظرفیت پایین نگهداری آب بعد از مدت زمان کوتاهی آب درون زخم را جذب کرده و باعث کاهش رطوبت موضع مورد نظر می‌شوند و منجر به چسبیدن پانسما به زخم خواهند شد. این در حالی است که سلولز میکروبی، ماده‌ای مناسب در کنترل خونریزی، جذب خون و ترشحات زخم است و از بافت آسیب دیده در مقابل حمله میکروب‌ها و ویروس محافظت می‌کند و اثر مفیدی بر روی تکثیر سلولی نیز دارد (۱۳).

بر همین اساس به نظر می‌رسد که سلولز میکروبی برای ایجاد مانع محافظتی و رساندن ترکیبات درمانی بر روی زخم، جایگزین مناسبی برای پوست انسان است (۱۴). سلولز میکروبی به عنوان یک پلی ساکارید حاوی سلولز ماده‌ای استثنایی در آب دوستی است. نانو الیاف موجود در سلولز میکروبی دارای نسبت سطح به حجم بالاتری در مقایسه با میکروفیبریل‌های متشکل از سلولز گیاهی هستند و قادرند که ظرفیت جذب آب بالاتری از خود نشان دهند؛ به طوری که یک غشاء سلولزی هیدراته بیش از ۹۰٪ وزنش آب است. به همین دلیل می‌توان حجم قابل توجهی از

از میکرومتر دیجیتالی (محدوده اندازه گیری: ۰ تا ۲۵ میلی متر؛ شرکت ACCUD) برای محاسبه ضخامت استفاده شد. ضخامت در ۱۰ نقطه مختلف نمونه اندازه گیری و سپس میانگین آنها ذکر شد.

به منظور بررسی قابلیت ترشوندگی و میزان جذب آب نمونه‌ها، از روش آزمون غوطه وری استاتیک (BS 3449: 1990) بهره گرفته شد. در این روش، نمونه های خشک وزن شده و سپس برای مدت زمان مشخصی در آب مقطر غوطه ور شدند. سپس نمونه‌ها جمع آوری و آب اضافی به وسیله آویزان نمودن نمونه‌ها گرفته شد و سپس نمونه‌های مرطوب توزین شدند و برای محاسبه میزان جذب آب (Water absorption: WA) از معادله (۳) استفاده شد.

$$WA = ((W_2 - W_1) / W_1) * 100 \quad (1)$$

$W_1$  نشان دهنده وزن خشک و  $W_2$  نشان دهنده وزن تر نمونه‌ها است.



شکل ۱. تصویر سلولز میکروبی خام و پیوند عرضی شده با درصدهای متفاوت

### بخش برون تنی

#### کشت سلول

از بانک سلول موسسه پاستور ایران سلول‌های L929 (NCBI C161) تهیه شد. سلول‌ها پس از دیفریز شدن در فلاسک قرار گرفتند. فلاسک حاوی محیط کشتی با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) بود. سپس آن را در انکوباتور با ۵٪ اکسیژن و ۹۰٪ رطوبت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادند (۱۷).

#### بررسی زنده مانی سلول‌ها

زنده مانی سلولی نمونه‌ها از طریق روش غیرمستقیم MTT بررسی شد. این آزمایش در سه مرحله انجام گرفت. ابتدا ۱۰۴ سلول و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت در هر چاهک ریخته شد و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با شرایط محیطی، اکسیژن ۵٪ و CO<sub>2</sub> قرار داده شد و پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

شد. سپس افزودن سوسپانسیون باکتری و مایه تلقیح به ظروف کشت در زیر هود انجام شد و درب ظروف کاملاً بسته شد. در مرحله بعد، ظروف کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به صورت ساکن در انکوباتور نگهداری شدند و پس از ۱۰ روز، لایه‌های سلولزی از سطح محیط کشت جمع آوری شدند (ضخامت متوسط لایه‌ها حدود ۱ سانتی متر بود). در مرحله بعد به منظور تخلیص لایه‌های سلولز میکروبی از باکتری‌های گیر افتاده در بین نانوالیاف و همچنین سایر مواد اضافی باقی مانده از محیط کشت در درون ساختار سه بعدی سلولز میکروبی، از شستشوی قلیایی بهره گرفته شد. به همین منظور از محلول هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال به مدت ۹۰ دقیقه در دمای جوش، استفاده شد و در نهایت نمونه‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند. در مرحله آخر نیز، نمونه‌ها با استیک اسید خنثی سازی شدند تا pH: ۶-۷ به دست آید (Error! Bookmark not defined). لازم به ذکر است که مواد سازنده محیط کشت از شرکت مرک خریداری شد و سایر مواد شیمیایی از شرکت سیگما-آلدریج تهیه شد.

#### شبکه‌ای کردن سلولز میکروبی

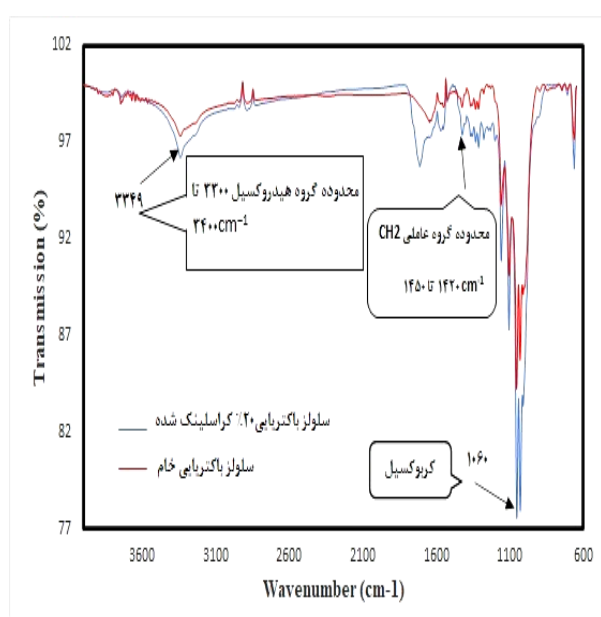
اسید سیتریک (Citric Acid: CA) به عنوان ماده اتصال دهنده عرضی و هیپوفسفیت سدیم (Sodium hypophosphite: SHP) به عنوان کاتالیزور برای اتصال زنجیره‌های نانوسلولز میکروبی استفاده شد. سلولز میکروبی خنثی شده در غلظت‌های مختلف CA / SHP غوطه ور شدند (درصدهای وزنی / حجمی ۵، ۲/۵ و ۱۰ اسید سیتریک و سدیم هیپوفسفیت با نسبت ۲:۱، در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت). سپس برای اتصال لایه های سلولز میکروبی، نمونه‌ها در دمای ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه عمل شدند و پس از آن، با آب مقطر شستشو داده شدند تا pH: ۵-۶ به دست آید. بعد از این مرحله، نمونه‌ها در دمای اتاق خشک شدند (شکل ۱) (Error! Bookmark not defined).

#### بررسی خصوصیات سلولز میکروبی

برای مطالعه خصوصیات شیمیایی سلولز میکروبی عمل شده و خام از تکنیک ATR-FTIR (Perkin Elmer model Frontier; USA) استفاده شد.

برای مشاهده مشخصات سطحی و مورفولوژی نمونه‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM VEGA || TESCAN)، جمهوری چک) استفاده شد. برای آماده سازی نمونه‌ها، سلولز میکروبی عمل شده و معمولی تحت شرایط خلاء، با فلزات طلا-پالادیوم پوشانده شدند.

از طیف سنجی ATR-FTIR برای شناسایی گروه‌های عملکردی قبل و بعد از شبکه‌ای شدن سلولز میکروبی استفاده شد. شکل ۲ طیف نمونه‌هایی را نشان می‌دهد که دارای پیک‌های مشابه در  $3300-3400\text{ cm}^{-1}$  برای گروه‌های هیدروکسیل،  $1450-1420\text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه عاملی  $\text{CH}_2$ ،  $1100-1200\text{ cm}^{-1}$  برای پیوند اتر و  $1060\text{ cm}^{-1}$  سیکلوهگزان در زنجیره‌های سلولزی هستند. در همین حال، در طیف نمونه‌های کراس‌لینک شده (CA / SHP) به دلیل پیوند استر (COO-) که پس از فرآیند اتصال عرضی ظاهر شد، یک پیک مشخص در  $1730\text{ cm}^{-1}$  وجود دارد (۱۶، ۲۷-۲۳).



شکل ۲. اسپکتروفوتوگرام مادون قرمز سلولز میکروبی ۲۰٪ کراس-لینک شده و سلولز میکروبی خام

### میکروسکوپ الکترونی روبشی

شکل ۳ نشان دهنده آرایش نانوالیاف‌های سلولز میکروبی است. تصاویر الف و د نشان می‌دهند که قطرهای متوسط الیاف نانو سلولزها کمتر از ۱۰۰ نانومتر است. به علاوه، همان طور که در تصاویر نشان داده شده است، با افزایش غلظت CA، قطر منافذ سطح افزایش می‌یابد (Error! Bookmark not defined). علاوه بر آن، اسید سیتریک به دلیل ماهیت اسیدی خود می‌تواند بر روی نانوسلولز در طی فرآیند اتصالات عرضی تأثیر بگذارد و سبب می‌شود سطح نانوالیاف‌های سلولز میکروبی که با اسید سیتریک ۲۰٪ و سدیم هیپوفسفات ۱۰٪ عمل شده‌اند، براق تر از سلولز میکروبی خام باشد.

انکوباسیون، مورفولوژی عمومی و زنده مانی سلول‌ها زیر میکروسکوپ نوری مشاهده و مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۵). در مرحله بعد، محیط سطحی سلول خارج شده و پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر محلول MTT در دستگاه انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ تا ۶ ساعت، به سلول‌ها اجازه داده شد تا تترازولیم را متابولیزه کنند. سپس مایع رویی برداشته شد و ۵۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO: Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک اضافه گردید تا فرمازان حل شود و سپس نمونه‌ها جمع‌آوری شدند.

سرانجام رنگ هر چاهک، متناسب با تعداد سلول‌ها، با دستگاه ریزخوان با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد (۱۸، ۱۹). لازم به ذکر است که محیط رشد کامل در یک چاهک خالی در نظر گرفته شد. یافته‌ها به عنوان درصدی از زنده مانی سلول (CV: Cell Viability) بیان و در معادله ۲ محاسبه شده‌اند (۲۰، ۲۱):

$$CV (\%) = \frac{(OD \text{ Sample} - OD \text{ Blank})}{(OD \text{ Control} - OD \text{ Blank})} \times 100\%$$

### بخش درون تنی

#### الفا سوختگی پوستی

مطالعات حیوانی توسط دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران با کد اخلاق (IR.IAU.PS.REC.1400.101) تایید شد. موش‌های نر (CrTac: NCr-Foxn1nu) با تزریق مخلوطی از کتامین، زیلازین و زولتیل بیهوش شدند. نواحی راست و چپ پاهای عقبی با الکل ۷۰٪ ضد عفونی شدند و سوختگی با ضخامت جزئی در ناحیه پوست با استفاده از قالب فولادی ضد زنگ به قطر ۱ سانتی متر که به مدت ۱ دقیقه در آب جوش گرم شد، ایجاد شد.

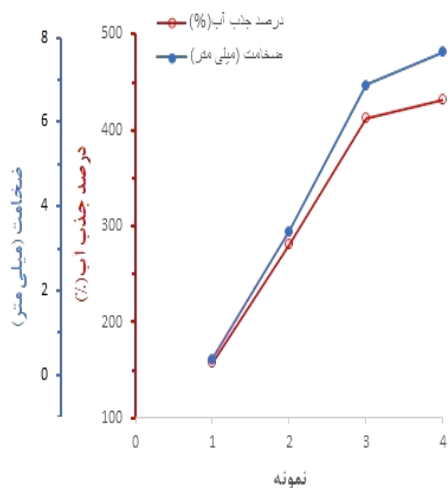
#### درمان زخم‌های سوختگی

دو موش (سوری) اندکی پس از ایجاد زخم سوختگی از آنها استفاده شد. برای درمان بعد از به وجود آمدن سوختگی، با بتادین رقیق شده (۱٪ حجمی بتادین و ۵٪ درصد حجمی سرم نرمالی سالین) محل زخم ضد عفونی شد. موش اول، با سلولز میکروبی خام و موش دوم، با سلولز میکروبی شبکه‌ای شده تیمار شدند و تحت درمان قرار گرفتند. موش‌ها در یک سیستم قفس تهویه شده به صورت جداگانه نگهداری شدند. در روز سیزدهم، بافت از ناحیه زخم سوختگی هر یک از موش‌ها نمونه برداری شد و سپس بررسی هیستوپاتولوژی بر روی آنها صورت گرفت (۲۲).

### یافته‌ها

#### طیف سنجی مادون قرمز

سلول می‌شود. در نتیجه، تعداد سلول‌های زنده بر روی نمونه‌ها در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شد. شکل ۶ نشان می‌دهد که اتصالات عرضی بر زنده ماندن سلول بر روی نمونه‌های کراسلینک شده اثر سوء ندارند. علاوه بر این، هیچ سمیتی در نمونه‌ها مشاهده نشد و زنده ماندن فیبروبلاست L929 بر روی نمونه‌های کراسلینک شده بیشتر از سلولز میکروبی خام بود.

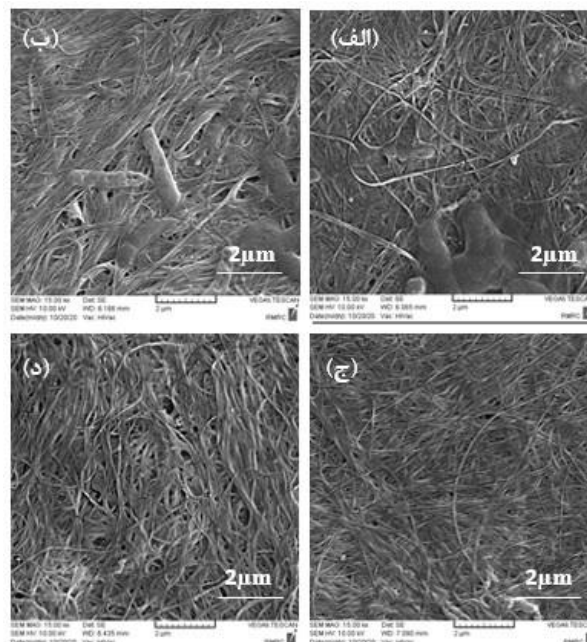


شکل ۴. مقایسه ضخامت و جذب آب نمونه ۱ (سلولز میکروبی خام)، نمونه ۲ (سلولز میکروبی + اسید سیتریک ۰.۵٪ و سدیم هیپوفسفیت ۰.۲/۵٪)، نمونه ۳ (سلولز میکروبی + اسید سیتریک ۰.۱٪ و سدیم هیپوفسفیت ۰.۵٪) و نمونه ۴ (سلولز میکروبی + اسید سیتریک ۰.۲٪ و سدیم هیپوفسفیت ۰.۱٪).

#### مطالعات بالینی

زخم‌ها را در دو محیط می‌توان درمان کرد: محیط خشک و محیط مرطوب. اما در حال حاضر، در بسیاری از مطالعات به این نتیجه رسیدند که بهبود زخم در یک محیط مرطوب فیزیولوژیکی سریع‌تر صورت می‌گیرد و با حفظ و کنترل رطوبت در زخم فرآیند بهبودی را تسهیل می‌کند. روند اپیتلیزاسیون و بسته شدن زخم در روش مرطوب، دو برابر سریع‌تر شده، تولید کلاژن افزایش یافته و تشکیل بافت گرانوله سرعت می‌یابد و تشکیل عروق خونی جدید با سرعت و شدت بیشتری صورت می‌گیرد (۲۸).

همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود، روند درمان سلولز میکروبی خام نسبت به پانسمان سریع‌تر صورت گرفته است و نیز سلولز میکروبی ۲۰ درصد کراسلینک شده سریع‌تر از سلولز میکروبی خام درمان را انجام داد؛ در نتیجه سلولز میکروبی ۲۰ درصد کراسلینک شده، آب بیشتری در محیط قرار دارد و محیط دارای رطوبت بیشتری است.



شکل ۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانوسلولز میکروبی خام و شبکه‌ای شده. الف) سلولز میکروبی خام، ب) سلولز میکروبی + اسید سیتریک ۰.۵٪ و سدیم هیپوفسفیت ۰.۲/۵٪، ج) سلولز میکروبی + اسید سیتریک ۰.۱٪ و سدیم هیپوفسفیت ۰.۵٪، د) سلولز میکروبی + اسید سیتریک ۰.۲٪ و سدیم هیپوفسفیت ۰.۱٪.

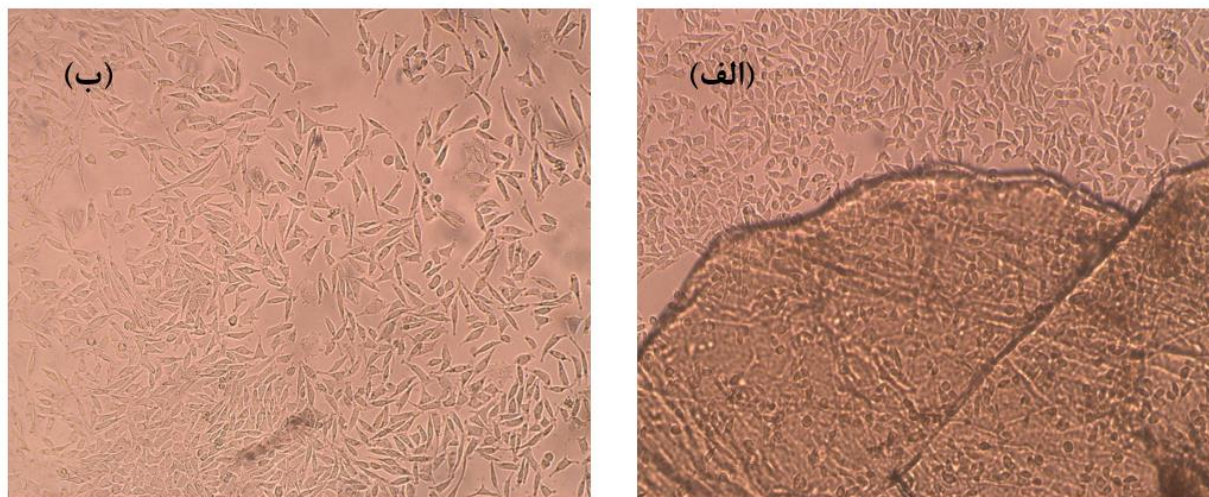
#### بررسی جذب آب و ضخامت

همان‌گونه که در شکل ۱ نیز مشاهده شد، با افزایش درصد اسید سیتریک، ضخامت نمونه‌ها بیشتر شده و میزان تخلخل نیز افزایش می‌یابد. همین امر موجب می‌گردد تا فضای بیشتری در لایه‌های سلولز میکروبی عمل شده برای جذب آب به وجود آید و منجر به افزایش میزان جذب آب نمونه‌های عمل شده در مقایسه با سلولز میکروبی خام می‌شود (شکل ۴). بر همین اساس سلولز میکروبی کراسلینک شده، آب بیشتری را در خود حبس نموده و دیرتر خشک می‌شود و بنابراین آب بیشتری پیرامون زخم وجود دارد که منجر به تسریع مدت درمان زخم می‌شود.

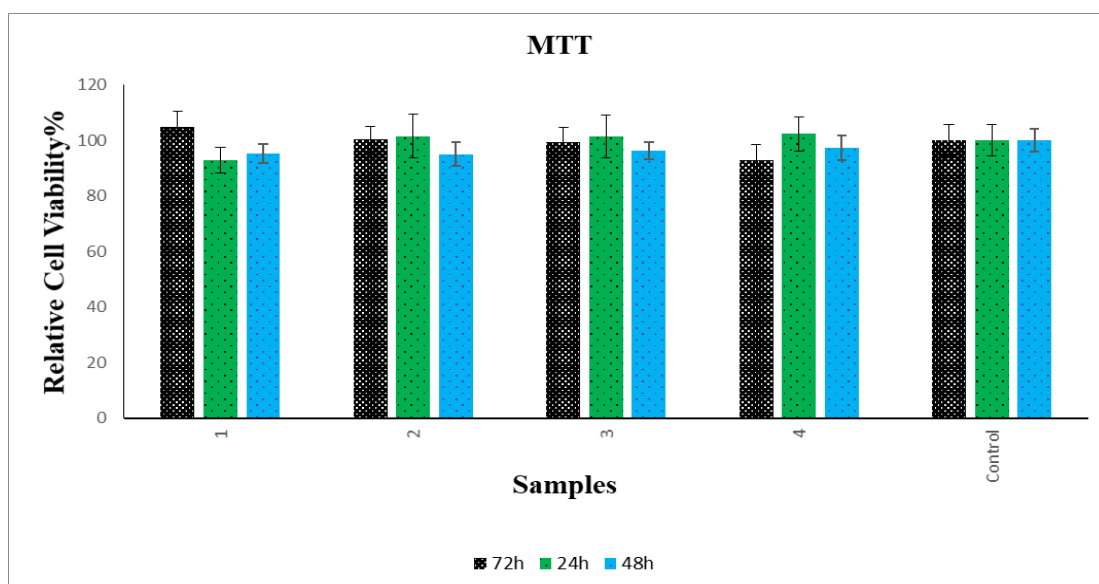
نتایج نشان داد که واکنش با استفاده از اسید سیتریک بر ساختار شیمیایی و آب دوستی سلولز میکروبی تأثیر دارد. بنابراین، با جایگزین شدن گروه‌های استر با هیدروکسیل سلولز، ویژگی آبدوستی سلولز میکروبی به صورت فیزیکی و شیمیایی افزایش یافت و این امر می‌تواند در استفاده از سلولز میکروبی به عنوان جاذب مزایایی ایجاد کند (شکل ۵).

#### سمیت سلولی

از این روش، برای ارزیابی زنده ماندن سلول پانسمان زخم و داربست در مهندسی بافت استفاده می‌شود. سمیت بستر، از تکثیر سلول جلوگیری می‌کند و با گذشت زمان باعث مرگ



شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ نوری داربست به همراه سلول (الف) و چاهک کنترل (ب)



شکل ۶. بررسی سمیت سلولی داربست‌های نانوسلولز میکروبی خام و شبکه‌ای شده؛ نمونه ۱ (سلولز میکروبی + اسید سیتریک ۰.۵٪ و سدیم هیپوفسفیت ۰.۲/۵٪)، نمونه ۲ (سلولز میکروبی + اسید سیتریک ۰.۱٪ و سدیم هیپوفسفیت ۰.۵٪)، نمونه ۳ (سلولز میکروبی + اسید سیتریک ۰.۲٪ و سدیم هیپوفسفیت ۰.۱٪) و نمونه ۴ (سلولز میکروبی خام)



شکل ۷. تصاویر بهبود زخم (کاهش زخم) در فاصله زمانی روزهای سوم تا پانزدهم و بسته شدن زخم‌های سوختگی نمونه های سلولز میکروبی خام و ۲۰ درصد کراسلینک شده

## بحث

قابلیت نگهداری آب آن می شود و در نتیجه استفاده از آن را با چالش هایی روبرو کرده است.

در حال حاضر، مطالعاتی در جهت اصلاح این مشکل انجام شده است تا بتوان سلولز میکروبی را به عنوان پانسمان قوی استفاده کرد؛ از جمله با تغییرات ساختاری، واکنش های شیمیایی یا گنجاندن اجزای ثانویه در ساختار سلولز میکروبی که این اصلاحات را می توان در طول فرآیند بیوسنتز و یا پس از آن انجام داد (۲۹).

در واقع در این روش ها تلاش شده است تا ظرفیت نگهداری آب در سلولز میکروبی را از طریق افزودن ترکیبات ثانویه آبدوست یا تغییر ویژگی های ساختاری سلولز میکروبی از جمله افزایش تخلخل و اندازه ی حفره ها بهبود یابد.

با توجه مطالعاتی که در سال های اخیر در زمینه سلولز میکروبی به عنوان پانسمان زخم انجام شد (۲۱، ۲۲، ۳۶-۳۰)، در این پژوهش تلاش شد با ایجاد اتصالات عرضی بین زنجیره های سلولز با استفاده از اسید سیتریک، توانایی این بیوپلیمر در باز جذب آب آن ارتقا یابد تا آن را به پانسمان ایده آل زخم تبدیل کند و سرعت بهبود زخم سوختگی را افزایش دهد. از نتایج به دست آمده مشخص شد که حفظ منافذ و ساختار سه بعدی در ماتریس سلولز میکروبی، نقش اساسی در تسهیل باز جذب آب دارد. این خصوصیت باعث می شود که سلولز میکروبی برای استفاده به عنوان پانسمان زخم، نه تنها برای زخم های مزمن، بلکه برای زخم های خشک بسیار امیدوار کننده باشد و محیط مناسبی را برای بهبود سریع این نوع زخم ها فراهم نماید و در عین حال ترشحات اضافی احتمالی را نیز جذب کند. بنابراین سلولز میکروبی کراسلینک شده یک ماده کاربردی منحصر به فرد است که پتانسیل بالایی برای کاربردهای پزشکی از جمله پانسمان زخم دارد.

التیام زخم ها، از جمله زخم های ناشی از سوختگی در حال حاضر فشار زیادی را بر سیستم های مراقبت های بهداشتی در سراسر جهان وارد می کنند. از میان مواد مختلفی که برای درمان این نوع زخم ها مورد استفاده قرار می گیرد، هیدروژل ها به طور گسترده ای به عنوان پانسمان زخم و در زمینه مهندسی بافت مورد استفاده قرار می گیرند. در واقع رطوبت محتوی هیدروژل ها، یک عامل اساسی در روند بهبود زخم است. بر همین اساس، محبوبیت سلولز میکروبی به عنوان یک هیدروژل طبیعی، به دلیل خواص منحصر بفردی چون جذب آب بالا و سازگاری زیستی آن افزایش یافته است. این ویژگی های ساختاری سلولز میکروبی، آن را به عنوان پانسمانی مطلوب تضمین می کند، در حالی که جایگزین مقرون به صرفه ای برای سایر پانسمان های مرطوب و معمولی نیز است؛ چرا که ایجاد محیط مرطوب توسط پانسمان زخم سلولز میکروبی می تواند روند بهبود را تسریع کرده و درد بیمار را کاهش دهد.

به کمبود مواد بیولوژیکی مناسب برای پانسمان زخم های خاص، سلولز میکروبی این امکان را دارد که در آینده به طور گسترده به عنوان ماده اولیه در مراقبت از زخم مورد استفاده قرار گیرند.

شبکه نانو الیافی سلولز میکروبی، هیدروژل منحصر به فرد است که با توجه به ساختار سه بعدی خود کاربردهای متنوعی را در درمان زخم و مهندسی بافت یافته است. این بیوپلیمر پس از خشک شدن، به دلیل تبخیر آب از فضای بین الیافی و در نتیجه درهم تنیدگی زنجیره های پلیمری سلولز، ساختار سه بعدی خود را از دست می دهد و منجر به از دست رفتن

## REFERENCES

1. Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown RM Jr. Microbial cellulose--the natural power to heal wounds. *Biomaterials* 2006;27:145-51.
2. Meftahi A, Khajavi R, Rashidi A, Sattari M, Yazdanshenas ME, Torabi M. The effects of cotton gauze coating with microbial cellulose. *Cellulose* 2010;17:199-204.
3. Gorgieva S, Trček J. Bacterial cellulose: Production, modification and perspectives in biomedical applications. *Nanomaterials* 2019;9:1-20.
4. Khajavi R, Meftahi A, Alibakhshi S, Samih L. Investigation of Microbial cellulose/Cotton/Silver nanobiocomposite as a modern wound dressing. *Adv Mater Res* 2014;829:616-621.
5. Lin D, Liu Z, Shen R, Chen S, Yang X. Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects. *Int J Biol Macromol* 2020;158:1007-1019.
6. Bianchet RT, Vieira Cubas AL, Machado MM, Siegel Moecke EH. Applicability of bacterial cellulose in cosmetics – bibliometric review. *Biotechnol Reports* 2020;27:e00502-e00502.
7. Kumar A, Cardia R, Cappellini G. Electronic and optical properties of chromophores from bacterial cellulose. *Cellulose* 2018;25:2191-2203.

8. Rosyida VT, Indrianingsih AW, Hayati SN, Apriyana W. The effect of different drying temperature on crystallinity and morphology structure of bacterial cellulose. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 2020;462.
9. Cao Y meng, Liu M yu, Xue Z wei, et al. Surface-structured bacterial cellulose loaded with hUSCs accelerate skin wound healing by promoting angiogenesis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;516:1167-1174.
10. Eslahi N, Mahmoodi A, Mahmoudi N, Zandi N, Simchi A. Processing and Properties of Nanofibrous Bacterial Cellulose-Containing Polymer Composites: A Review of Recent Advances for Biomedical Applications. *Polym Rev* 2020;60:144-170.
11. Picheth GF, Pirich CL, Sierakowski MR, Woehl MA, Sakakibara CN, de Souza CF, et al. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. *Int J Biol Macromol* 2017;104:97-106.
12. Sharma C, Bhardwaj NK. Bacterial nanocellulose: Present status, biomedical applications and future perspectives. *Mater Sci Eng C* 2019;104:109963.
13. Lynd LR, Weimer PJ, Zyl WH Van, Isak S. Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66:506-577.
14. 1 .Huang Y, Zhu C, Yang J, Nie Y, Chen C, Sun D. Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose* 2014;21:1-30.
15. Wang J, Zhu Y, Du J. Bacterial cellulose: A natural nanomaterial for biomedical applications. *J Mech Med Biol* 2011;11:285-306.
16. Meftahi A, Khajavi R, Rashidi A, Rahimi MK, Bahador A. Preventing the collapse of 3D bacterial cellulose network via citric acid. *J Nanostructure Chem* 2018;8:311-320.
17. Zahedi E, Esmaeili A, Eslahi N, Shokrgozar MA, Simchi A. Fabrication and characterization of core-shell electrospun fibrous mats containing medicinal herbs for wound healing and skin tissue engineering. *Mar Drugs* 2019;17:1-13.
18. Qiu Y, Qiu L, Cui J, Wei Q. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-vaccarin membranes for wound healing. *Mater Sci Eng C* 2016;59:303-309.
19. Mosmann T, DNAX. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
20. Sayed SM, Jia H, Jiang Y, Zhu Y, Ma L, Yin F. Supporting Information Photostable AIE Probes for Wash-Free, Ultrafast, and High-Quality. *J Mater Chem B* 2021;9: 4303-4308.
21. Ciecholewska-Juško D, Żywicka A, Junka A, Drozd R, Sobolewski P, Migdał P, et al. Superabsorbent crosslinked bacterial cellulose biomaterials for chronic wound dressings. *Carbohydr Polym* 2021;253:117247.
22. Mohamad N, Loh EYX, Fauzi MB, Ng MH, Mohd Amin MCI. In vivo evaluation of bacterial cellulose/acrylic acid wound dressing hydrogel containing keratinocytes and fibroblasts for burn wounds. *Drug Deliv Transl Res* 2019;9:444-452.
23. Gil Giraldo GA, Mantovan J, Marim BM, Kishima JOF, Mali S. Surface Modification of Cellulose from Oat Hull with Citric Acid Using Ultrasonication and Reactive Extrusion Assisted Processes. *Polysaccharides* 2021; 2:218-233.
24. Awada H, Montplaisir D, Daneault C. Cross-Linking of Papers Based on Thermomechanical Pulp Fibers by Polycarboxylic Acids: In fl uence on the Wet Breaking Length. *Ind Eng Chem Res* 2014; 11: 4312-4317.
25. Widsten P, Dooley N, Parr R, Capricho J, Suckling I. Citric acid crosslinking of paper products for improved high-humidity performance. *Carbohydr Polym* 2014;101:998-1004.
26. Grande CJ, Torres FG, Gomez CM, Troncoso OP, Canet-ferrer J, Martínez-pastor J. Development of self-assembled bacterial cellulose – starch nanocomposites. *Mater Sci Eng C* 2009;29:1098-1104.
27. Wang J, Wan YZ, Luo HL, Gao C, Huang Y. Immobilization of gelatin on bacterial cellulose nano fi bers surface via crosslinking technique. *Mater Sci Eng C* 2012;32:536-541.
28. Herndon DN, Editor. *Total Burn Care*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 2012. P.808.
29. Sulaeva I, Henniges U, Rosenau T, Potthast A. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. *Biotechnol Adv* 2015;33:1547-1571.
30. Khalid A, Khan R, Ul-Islam M, Khan T, Wahid F. Bacterial cellulose-zinc oxide nanocomposites as a novel dressing system for burn wounds. *Carbohydr Polym* 2017;164:214-221.
31. Dmitrović S, Matović B, Tasić N, Maksimović V, Sosnin M, Radotić K. Bacterial cellulose-lignin composite hydrogel as a promising agent in chronic wound healing. *Int J Biol Macromol* 2018;118:494-503.

32. Rodrigues P, Sousa F De, Saska S, Barud H, Lima LR De, Amaro Martins V De, et al. Bacterial Cellulose / Collagen Hydrogel for Wound Healing. *Materials Research* 2016; 19: 106-116.
33. Lin WC, Lien CC, Yeh HJ, Yu CM, Hsu SH. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. *Carbohydr Polym* 2013;94:603-611.
34. Volova TG, Shumilova AA, Nikolaeva ED, Kirichenko AK, Shishatskaya EI. Biotechnological wound dressings based on bacterial cellulose and degradable copolymer P(3HB/4HB). *Int J Biol Macromol* 2019;131:230-240.
35. Cacicedo ML, Pacheco G, Islan GA, Alvarez VA, Barud HS, Castro GR. Chitosan-bacterial cellulose patch of ciprofloxacin for wound dressing: Preparation and characterization studies. *Int J Biol Macromol* 2020;147:1136-1145.
36. Wichai S, Chuysinuan P, Chairwut S, Ekabutr P, Supaphol P. Development of bacterial cellulose/alginate/chitosan composites incorporating copper (II) sulfate as an antibacterial wound dressing. *J Drug Deliv Sci Technol* 2019;51:662-671.