



Semnan University

## Applied Chemistry Today

Journal homepage: <https://chemistry.semnan.ac.ir/>

ISSN: 2981-2437



Research Article

# Preparation and *in vitro* Evaluation of Chitosan/Alginate Hydrogel Containing Dexamethasone-Loaded Selenium Nanoparticles

Zahra Karami<sup>a,\*</sup>, Zahra Fazeli<sup>a</sup>, Mehrdad Hamidi<sup>b</sup> <sup>a</sup>Department of Pharmaceutical Nanotechnology, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran<sup>b</sup>Pharmaceutical Nanotechnology Research Center, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

## PAPER INFO

**Article history:**

Received: 08/Sep/2024

Revised: 01/Dec/2024

Accepted: 22/Dec/2024

**Keywords:**Hydrogel,  
Chitosan,  
Alginate,  
Selenium Nanoparticles,  
Dexamethasone,  
Stroke.

## ABSTRACT

In the present study, we developed a tissue engineering scaffold for brain injuries, particularly stroke treatment, by loading dexamethasone-containing selenium nanoparticles into a chitosan-alginate hydrogel. FTIR, DLS, XRD, and AFM analysis confirmed the successful preparation of dexamethasone-loaded selenium-chitosan nanocomposites (DEX@Cs-SeNPs). The nanocomposite's average hydrodynamic diameter and zeta potential were 214.2 nm and +34.1 mV, respectively. The hydrogel was then made from chitosan and alginate polymers due to the ionic interaction. Scanning electron microscopy and elemental mapping analysis confirmed the incorporation of selenium nanoparticles into the chitosan-alginate hydrogel. The encapsulation efficiency and drug loading capacity were 93.1±3.6% and 15.05±2.4%, respectively. Approximately 70% of the drug was released from hydrogel after 160 hours in phosphate-buffered saline. The percentage of swelling and porosity of the hydrogel was calculated as 196% and 65%, respectively. DEX@Cs-SeNPs@Cs/Alg Hydrogel showed a hemolysis percentage of 4.6% at a concentration of 2 mg/mL. Based on the results obtained in this study, DEX@Cs-SeNPs@Cs/Alg Hydrogel can be considered promising as a scaffold for brain tissue engineering.

DOI: <https://doi.org/10.22075/chem.2024.35106.2307>

© 2025 Semnan University.

This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)\* **Corresponding author:** Assistant Professor, Pharmaceutical Nanotechnology Department. *E-mail address:* [karami\\_z@zums.ac.ir](mailto:karami_z@zums.ac.ir)**How to cite this article:** Karami, Z., Fazeli, Z., & Hamidi, M. (2025). Preparation and *in vitro* Evaluation of Chitosan/Alginate Hydrogel Containing Dexamethasone-Loaded Selenium Nanoparticles. *Applied Chemistry Today*, 20(74), 9-24. (in Persian)

## تهیه و ارزیابی برون تن هیدروژل کیتوزان/آلژینات حاوی نانوذرات سلنیوم بارگذاری

## شده با دگزامتازون

زهرا کریمی<sup>۱\*</sup>، زهرا فاضلی<sup>۱</sup>، مهرداد حمیدی<sup>۲</sup><sup>۱</sup>گروه نانوفناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران  
<sup>۲</sup>مرکز تحقیقات نانو فناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۶/۱۸	در مطالعه حاضر با بارگذاری نانوذرات سلنیوم حاوی دگزامتازون، در هیدروژل کیتوزان-آلژینات، یک داربست مهندسی بافت برای ضایعات مغزی به ویژه در بیماری سکنه مغزی تهیه شده و خصوصیات فیزیکیوشیمیایی آن بررسی گردید. آزمون های <i>FTIR</i> ، <i>DLS</i> ، <i>XRD</i> و <i>AFM</i> تهیه موفق میانگین قطر هیدرودینامیک و پتانسیل زتای ۲۱۴/۲ و ۳۴/۱ میلی ولت بود. هیدروژل از پلیمرهای آلژینات و کیتوزان به دلیل برهم کنش یونی ساخته شد. آزمون های میکروسکوپ الکترونی روبشی و آنالیز عنصری نشان داد که نانوذرات سلنیوم در ساختار هیدروژل کیتوزان-آلژینات قرار گرفته اند. درصد احتباس و بارگذاری دارو به ترتیب ۳/۶±۹۳/۱ و ۲/۴±۱۵/۰۵ درصد محاسبه شد. آزمون رهش دارو از هیدروژل در محیط بافر فسفات با pH ۷/۴ بررسی شد که نشان داد دگزامتازون از هیدروژل آزادسازی یکنواختی داشته و بعد از ۱۶۰ ساعت حدود ۷۰ درصد از دارو رهش یافته است. درصد تورم و درصد تخلخل هیدروژل به ترتیب ۱۹۶٪ و ۶۵٪ محاسبه شد. با در نظر گرفتن درصد همولیز زیر ۵ درصد به دست آمده از آزمون همولیز برون تن، هیدروژل دارواری کاربرد بالقوه در زمینه مقاصد درمانی می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، می توان امیدوار بود که هیدروژل بارگذاری شده با نانوذرات سلنیوم حاوی دگزامتازون، داربست مناسبی برای مهندسی بافت در درمان سکنه مغزی باشد.
بازنگری مقاله: ۱۴۰۳/۰۹/۱۱	
پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۱۰/۰۲	
<b>کلمات کلیدی:</b>	
هیدروژل، کیتوزان، آلژینات، نانوذرات سلنیوم، دگزامتازون، سکنه مغزی.	

DOI: <https://doi.org/10.22075/chem.2024.35106.2307>This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

## ۱- مقدمه

بسیاری از بیماری های مغزی، با از دست رفتن پیشرفته فعالیت و مرگ نورون ها همراه است [۱]. مهندسی بافت ابزاری نوین و مؤثر برای ترکیب دارورسانی و کاشت سلول های مورد نیاز در فرآیند بازسازی آسیب های عصبی است. سکنه مغزی یکی از دلایل اصلی مرگ و میر در جوامع امروزی است. در حال حاضر درمان قطعی برای این بیماری وجود ندارد و به علت ساختار پیچیده و محافظتی سد خونی مغزی، بسیاری از داروها توانایی دستیابی به پارانشیم مغزی را ندارند [۲]. هیدروژل ها، شبکه ای پلیمری بسیار هیدراته شبیه به ماتریکس خارج سلولی هستند که توجه زیادی را برای کاربردهای مهندسی بافت و پزشکی احیا کننده به سمت خود جلب کرده اند [۳،۴]. از هیدروژل های متشکل از مواد طبیعی اغلب به عنوان داربست های مهندسی بافت استفاده شده است، زیرا آن ها می توانند ساختار ماتریکس خارج سلولی بافت بدن را شبیه سازی کرده و سیگنال های

بیوشیمیایی برای حمایت از تکثیر و تمایز سلول ها ارائه نمایند. هیدروژل های کیتوزان و آلژینات با توجه به خصوصیات منحصر بفرد می توانند به عنوان داربست زیست تطبیق پذیر، بستری مناسب برای داروسانایف انتقال و حمایت از سلول های بنیادی و پیش سازهای عصبی باشند. آلژینات یک پلی ساکارید طبیعی است که معمولا از جلبک دریایی قهوه ای و باکتری های مختلف به دست می آید. یکی از ویژگی های منحصر به فرد آلژینات، توانایی ایجاد اتصالات عرضی فیزیکی توسط کاتیون های دو ظرفیتی در دمای اتاق است، که آن را در روش های ساخت مختلف از جمله قالب گیری، اسپری یا پاشیده شدن و پرینت سه بعدی بسیار مفید می سازد [۵]. کیتوزان مشتق شده از کیتین، از منابع تجدیدپذیر مثل پوسته صدف، حشرات، قارچ و زباله های صنایع دریایی به دست می آید. کیتوزان، زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری خوبی دارد و بنابراین یک ماده رایج برای کاربردهای مهندسی بافت است [۶].

دگزامتازون (DEX) پرمصرف ترین کورتیکو استروئید سنتزی می باشد که برای کاهش پاسخ های ایمنی بدن در برابر بیماری ها استفاده می شود. دگزامتازون برای درمان بیماری های التهابی مانند آسم، مننژیت، سکتة ایسکمیک و آرتریت روماتوئید استفاده می شود [۷]. علاوه بر این، مولکول DEX در تنظیم ژنها و واکنش های سلولی مسئول رشد و تقسیم و تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی نقش دارد. با این حال، مطالعات نشان داده است که استفاده از DEX به علت اثرات جانبی نامطلوب و سمیت آن مانند پوکی استخوان، غلظت بالای قند خون، فشار خون بالا و خونریزی معده و روده محدود است. محدوده دوز موثر DEX تقریبا ۴ تا ۲۰ میلی گرم در روز است و دوز بالایی از دارو برای رسیدن به سطح درمانی در پلاسمای خون مورد نیاز است. از عوارض سکتة های مغزی در مراحل اولیه ادم مغز می باشد که هم می تواند در صورت شدت ادم باعث مرگ بیمار شده و در غیر این صورت سبب عوارض دیگری از جمله کاهش سطح هوشیاری، افزایش آسیب به سلول های مغزی و در نتیجه ایجاد عوارض نورولوژیک بیشتر در بیمار گردد [۸]. جهت کاهش ادم مغز از داروهای گوناگونی استفاده شده است. یکی از این داروهای متداول در این زمینه دگزامتازون می باشد [۹].

در سال های اخیر محققین اثرات نروتروپروکتیو نانوذرات سلنیوم را در درمان برخی از بیماری های عصبی گزارش کرده اند. از دلایل اصلی استفاده نانوذرات سلنیوم در مهندسی بافت عصبی می توان به موارد زیر اشاره کرد: تجویز نانو ذرات سلنیوم منجر به رفع ادم مغزی، محافظت از آکسون ها در ناحیه هیپوکامپ و دوباره میلین دار شدن ناحیه هیپوکامپ پس از سکتة مغزی ایسکمیک مغزی می شود [۱۰]. محققین گزارش کرده اند که نانوذرات سلنیوم از طریق مسیرهای مختلفی موجب تمایز سلول های بنیادی به سلول های عصبی می شوند. این ویژگی برای درمان آسیب های عصبی و بیماری هایی مانند آلزایمر و پارکینسون مفید است. سلنیوم به عنوان یک عنصر ضروری در بدن، در آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند گلوکوتاتیون پراکسیداز نقش مهمی دارد. بر خلاف سلینیت ( $SeO_3^{2-}$ ) و سلنات ( $SeO_4^{2-}$ ) که استرس اکسیداتیو را افزایش می دهند، نانوذرات سلنیوم می توانند به عنوان آنتی اکسیدان عمل کنند و از سلول ها در برابر آسیب محافظت کنند [۱۱]. نانوذرات سلنیوم در مقایسه با سلینیت و

سلنات سمیت کمتری دارند زیرا به تدریج سلنیوم را آزاد می‌کنند و از افزایش ناگهانی سطح یون‌های سلنیوم جلوگیری می‌کنند. سمیت سلنیوم به دوز آن بستگی دارد [۱۲]. استفاده از دوزهای پایین و کنترل شده، سمیت را به حداقل می‌رساند. همچنین، می‌توان با اصلاح سطح آن‌ها (مثل پوشش دادن با پلیمرهای زیست‌سازگار) سمیت را بیشتر کاهش داد. با اصلاح سطح نانوذرات سلنیوم، می‌توان آن‌ها را برای بهبود چسبندگی، بقای سلول و رشد نورون‌ها نیز تنظیم کرد [۱۳-۱۵].

بنابراین در مطالعه حاضر با بارگذاری نانوذرات سلنیوم حاوی دگزامتازون، در هیدروژل کیتوزان-آلژینات، یک داربست مهندسی بافت برای ضایعات مغزی به ویژه در بیماری سکتة مغزی ارائه شده است. هیدروژل کیتوزان-آلژینات به روش برهمکنش یونی ایجاد شد و نانوذرات سلنیوم حاوی دگزامتازون در آن بارگذاری شد. سپس ویژگی‌های برون تن از قبیل اندازه و بار سطحی نانوذرات، درصد تورم، نرخ تخریب درصد بارگذاری دارو، رهش دارو در بافر فسفات، مورفولوژی نانوکامپوزیت‌های تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی و درصد همولیز بررسی گردید.

## ۲- بخش تجربی

### ۲-۱- تهیه نانوکامپوزیت سلنیوم-کیتوزان بارگذاری شده با دگزامتازون (DEX@Cs-SeNPs)

مقدار ۲۰ میلی گرم دگزامتازون در ۲ میلی لیتر اتانول حل شد و به محلول آسکوربیک اسید (۱۶۰ میلی گرم) و کیتوزان ۰/۵٪ بصورت قطره ای در شرایط تاریکی و تحت هم زدن توسط همزن مغناطیسی اضافه شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه از ترکیب شدن مواد، محلول سدیم سلینیت (۴۰ میلی گرم) حل شده در آب به صورت قطره قطره در دمای اتاق و تاریکی به آن اضافه شد. نسبت مولی آسکوربیک اسید به سدیم سلینیت ۴ به ۱ بود. زمانی که محلول تغییر رنگ داد نیم ساعت به آن فرصت تبخیر اتانول و تکمیل واکنش داده شود. سپس، مخلوط نمونه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب جمع آوری شده به روش فریزدرای خشک شد. به منظور تعیین میزان بارگذاری دارو و درصد احتباس دارو، جذب محلول رویی در طول موج ۲۴۱ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. با اندازه گیری محتوای دگزامتازون آزاد در محیط آبی جدا شده از نانوذرات میزان بارگذاری دارو<sup>۱</sup> (DLC) و درصد احتباس دارو<sup>۲</sup> (EE) با فرمول‌های زیر محاسبه گردید.

$$DLC = \frac{\text{Weight of the drug in nanoparticles}}{\text{Weight of the nanoparticles}} \times 100$$

$$EE = \frac{\text{Weight of the drug in nanoparticles}}{\text{Weight of the feeding drugs}} \times 100$$

میانگین قطر نانوذرات سلنیوم حاوی دگزامتازون (قطره‌هیدرودینامیک)، شاخص پراکندگی و بار سطحی آنها به کمک دستگاه نانوزتا سایزر به روش تفرق دینامیک نور تعیین گردید. همچنین خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات با آزمون‌های پراش اشعه ایکس (XRD)، آنالیز میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) و میکروسکوپ الکترونی روبشی تعیین گردید.

<sup>1</sup> Drug loading capacity

<sup>2</sup> Encapsulation efficiency

## ۲-۲- تهیه هیدروژل کیتوزان/آلژینات حاوی نانوکامپوزیت سلنیوم-کیتوزان بارگذاری شده با دگزامتازون (DEX@Cs-SeNPs@Cs/Alg Hydrogel)

ابتدا ۴۰ میلی گرم از نانوذرات در ۲/۵ میلی لیتر محلول کیتوزان ۲/۵ درصد ریخته شد و به مدت ۲ دقیقه تحت پروب سونیکه قرار گرفت، سپس به وسیله هموژنایزر با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm مخلوط شد. در گام بعدی، ۲/۵ میلی لیتر محلول آلژینات ۲/۵ درصد قطره قطره به آن اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۱ ساعت بر روی هیتر استیرر با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت، سپس توسط محلول سدیم هیدروکسید pH آن به ۶/۷ رسانده شد. محلول فوق ۲۴ ساعت بر روی هیتر استیرر با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد باقی ماند و پس از آن در همان شرایط ۲۵۰ میکرولیتر محلول کلسیم کلرید ۷۵ میلی مولار به صورت قطره ای اضافه شد، پس از گذشت ۱ ساعت، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول سدیم تری پلی فسفات<sup>۳</sup> (TPP) با غلظت ۰/۵٪ به صورت قطره ای اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت بر روی هیتر استیرر با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد باقی ماند. سپس هیدروژل تهیه شده با روش خشک کردن انجمادی خشک شد. ساختار نانوسامانه طراحی شده توسط آزمون های طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز و میکروسکوپ الکترونی روبشی، مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲-۳- مطالعه رهایش دارو

مطالعه رهایش برون تن دارو به روش دیالیز انجام پذیرفت، بدین صورت که مقدار مشخصی از هیدروژل DEX@Cs- SeNPs@Cs/Alg که حاوی ۱ میلی گرم دگزامتازون بود درون غشای دیالیز (Cut off: 12 KDa) قرار داده شد. غشا دیالیز در ۲۵ میلی لیتر از بافر فسفات سالین<sup>۴</sup> (PBS, pH 7.4) غوطه ور گردید و در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس و سرعت 100 rpm درون شیکر-انکوباتور قرار گرفت. در فواصل زمانی معین، ۱ میلی لیتر از محیط رهایش خارج گردید و در میکروتیوب قرار گرفت. به منظور حفظ حجم ثابت در محیط رهایش، یکی میلی لیتر محلول تازه از بافر PBS به ظرف اضافه گردید. این آزمایش در ۳ تکرار انجام شد. مقدار جذب دگزامتازون در نمونه های جمع آوری شده توسط روش اسپکتروفوتومتری تعیین شد و سپس با استفاده از منحنی کالیبراسیون خطی که با غلظت های شناخته شده از دگزامتازون رسم شده بود به درصد داروی رهایش یافته تبدیل گردید.

برای تهیه بافر PBS، ۸ گرم سدیم کلراید، ۰/۲ گرم پتاسیم کلراید، ۱/۱۵ گرم سدیم فسفات دی بازیک، ۰/۲ گرم پتاسیم فسفات مونو بازیک وزن شده و پس از حل کردن در مقداری آب دیونیزه، به حجم ۱ لیتر رسانده و pH آن در ۷/۴ تنظیم گشت.

<sup>3</sup> Sodium tripolyphosphate

<sup>4</sup> Phosphate-buffered saline

**۴-۲- اندازه گیری نسبت تورم**

۵۰ میلی گرم از هیدروژل در میکروتیوب ریخته شد و به آن ۱ میلی لیتر بافر PBS اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. در فواصل زمانی معین، با دور rpm 1000 به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد، سپس هیدروژل باقی مانده وزن شد.

**۵-۲- بررسی نرخ تخریب**

جهت انجام این تست ۵۰ میلی گرم از هیدروژل در میکروتیوب قرار داده شد، سپس ۱ میلی لیتر بافر PBS به آن افزوده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور قرار گرفت. در زمان های معین، نمونه ها از انکوباتور خارج شده، به مدت ۵ دقیقه با دور rpm 1000 سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شده و هیدروژل باقی مانده فریزدرای شده و توزین گردید.

**۶-۲- آزمون اندازه گیری تخلخل**

برای اندازه گیری تخلخل نمونه های هیدروژل بدون دارو و هیدروژل حاوی دارو، از روش جایگزینی حلال استفاده شد. مقدار مشخصی از هیدروژل های فریزدرای شده را در اتانول خالص غوطه ور کرده و پس از گذشت ۲۴ ساعت، اتانول را از محیط خارج کرده و هیدروژل ها مجدداً وزن شد. طبق فرمول زیر درصد تخلخل محاسبه شد که  $M_2$ : وزن نهایی هیدروژل،  $M_1$ : وزن اولیه هیدروژل،  $p$ : دانسیته اتانول و  $V$ : حجم هیدروژل می باشد.

$$Porosity = \frac{M_2 - M_1}{\rho v} \times 100$$

**۷-۲- بررسی سازگاری خونی**

همولیز به دلیل لیز شدن غشای گلبولهای قرمز است که منجر به رها شدن هموگلوبین در پلاسما می شود. برای بررسی زیست سازگاری نمونه ها، از تست همولیز برون تن استفاده شد. خون تازه از قلب موش تهیه و در لوله ی هیپارینه به مدت ۵ دقیقه با سرعت rpm 1600 سانتریفیوژ شد. سپس بخش پلاسما جدا و دور انداخته شد. بخش گلبول قرمز ۳ مرتبه با محلول بافر فسفات شسته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون گلبول های قرمز با ۹۰۰ میکرولیتر از نمونه های آزمون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. آب دیونیزه و نرمال سالین به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی همولیز استفاده شد. بعد از انکوباسیون، مخلوط در rpm 1600 به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی برای تعیین محتوای اکسی هموگلوبین آزاد در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه گیری و طبق فرمول زیر درصد همولیز محاسبه گردید:

$$\text{The hemolysis rate (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{negative control}})}{(\text{OD}_{\text{positive control}} - \text{OD}_{\text{negative control}})} \times 100$$

## ۳- نتایج و بحث

## ۳-۱- نانوکامپوزیت سلنیوم-کیتوزان بارگذاری شده با دگزامتازون (DEX@Cs-SeNPs)

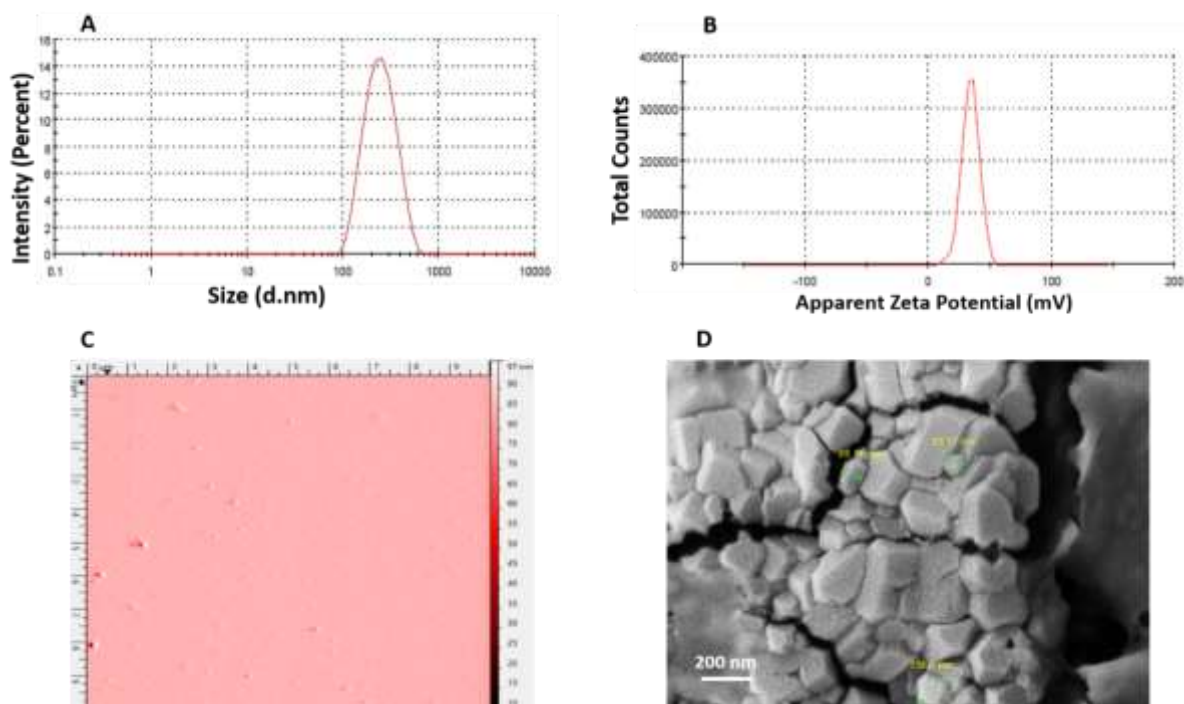
نانوذرات سلنیوم با احیای سلینیت سدیم توسط آسکوربیک اسید تشکیل می شود [۱۶]. با توجه به مساحت سطح بالا، نانوذرات سلنیوم بعد از تشکیل، سریع دچار تجمع و آگلومره شدن می شود، به همین دلیل در مطالعه حاضر از ۲/۵ سی سی کیتوزان برای پایدار کردن آن ها در حین سنتز استفاده شد. محلول مواد اولیه بیرنگ است که با گذشت زمان شروع به ایجاد رنگ قرمز می کند که مشخصه ایجاد نانوذرات سلنیوم است. اندازه قطر هیدرودینامیک نانوکامپوزیت سلنیوم-کیتوزان و نانوکامپوزیت سلنیوم-کیتوزان بارگذاری شده با دگزامتازون (DEX@Cs-SeNPs) با استفاده از دستگاه زتا سایزر تعیین گردید. نتایج حاصل در جدول ۱ ارائه شده است. میانگین قطر هیدرودینامیک نانوذرات سلنیوم-کیتوزان تهیه شده در حدود ۱۹۹/۸ نانومتر بود. این در حالی است که نانوذرات حاوی دگزامتازون میانگین قطر هیدرودینامیکی ۲۱۴/۲ نانومتر را نشان داد. تصاویر مربوط به میانگین اندازه نانوذرات DEX@Cs-SeNPs در شکل 1A ارائه شده است. شاخص پراکندگی ذره ای برای نانوذرات سلنیوم بارگذاری شده با دگزامتازون ۰/۱۸ بود که نشان دهنده یکنواختی مناسب اندازه نانوذرات تهیه شده، می باشد. پتانسیل زتا که بار سطحی نانوذرات می باشد در پایداری و سمیت آن بر دستگاه ایمنی تاثیر می گذارد [۱۷]. پتانسیل زتای نانوذرات سلنیوم بارگذاری شده با دگزامتازون ۳۴/۱+ میلی ولت بود (شکل 1B). با استفاده از دستگاه AFM مورفولوژی نانوذرات سلنیوم حاوی دگزامتازون مورد بررسی قرار گرفت و تصویر آن در شکل 1C ارائه شده است. همانگونه که مشخص است نانوذرات DEX@Cs-SeNPs به شکل کروی بوده و پراکندگی یکنواختی دارند.

جدول ۱. میانگین اندازه، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتای نانوکامپوزیت سلنیوم-کیتوزان (Cs-SeNPs) و نانوکامپوزیت سلنیوم-کیتوزان بارگذاری شده با دگزامتازون (DEX@Cs-SeNPs)

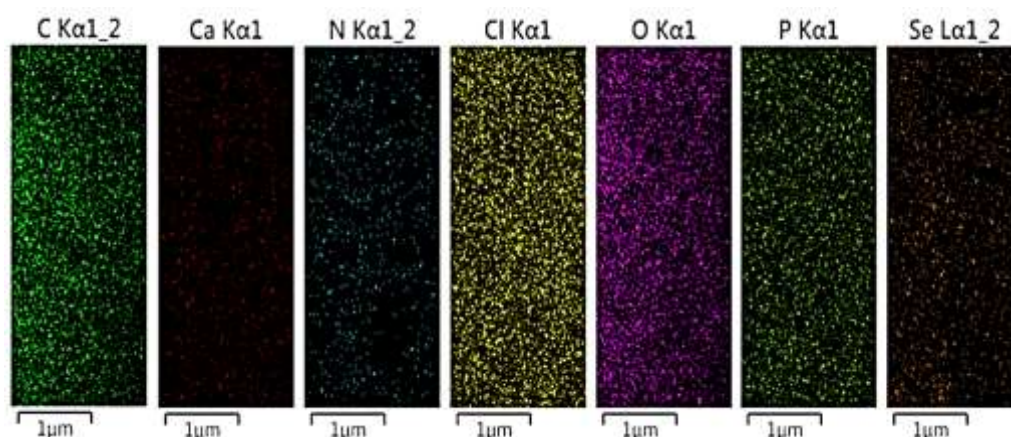
Sample	Size (nm)	PDI	Zeta Potential(mV)
Cs-SeNPs	199.8	0.213	+35.2
DEX@Cs-SeNPs	214.2	0.181	+34.1

## ۳-۲- میکروسکوپ الکترونی روبشی

شکل 1D مورفولوژی هیدروژل حاوی نانوذرات سلنیوم بارگذاری شده با دگزامتازون به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی را نمایش می دهد. حضور نانوذرات با میانگین قطر ۹۰ الی ۱۵۰ نانومتری درون ساختار هیدروژل مشاهده می شود. جهت بررسی عناصر تشکیل دهنده از آنالیز عنصری استفاده شد (شکل ۲). پراکندگی یکنواخت عناصر سلنیوم، کلسیم، کربن، فسفر، اکسیژن، نیتروژن و کربن در ساختار هیدروژل تایید شد.



شکل ۱. (A) تصویر میانگین قطر هیدرودینامیک نانوکامپوزیت سلیوم-کیتوزان (B) تصویر پتانسیل زتای نانوکامپوزیت سلیوم-کیتوزان حاوی دگزامتازون (C) تصویر AFM نانوکامپوزیت سلیوم-کیتوزان (D) تصویر SEM از هیدروژل حاوی نانوذرات سلیوم بارگذاری شده با دگزامتازون



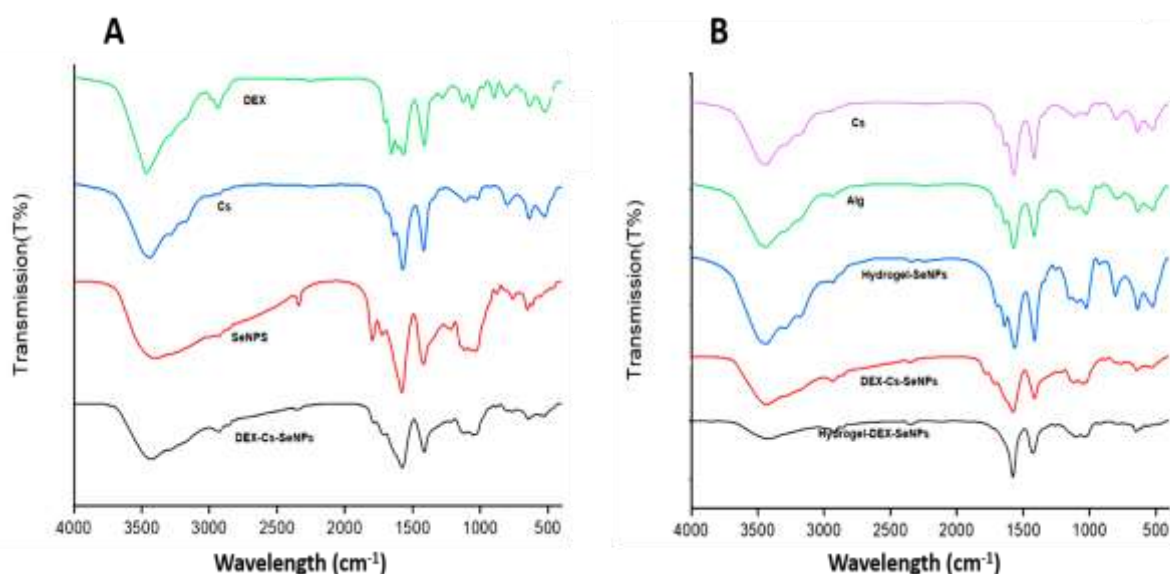
شکل ۲. عناصر تشکیل دهنده موجود در هیدروژل کیتوزان/آلژینات حاوی نانوکامپوزیت سلیوم-کیتوزان بارگذاری شده با دگزامتازون

### ۳-۳- نتایج آزمون طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ

طیف FTIR کیتوزان، آلژینات، دگزامتازون، نانوذرات سلیوم، نانوکامپوزیت سلیوم-کیتوزان بارگذاری شده با دگزامتازون، همچنین هیدروژل حاوی نانوذرات سلیوم (بدون دارو) و هیدروژل حاوی DEX@Cs-SeNPs در شکل 3A-B ارائه شده است. کیتوزان دارای گروه های هیدروکسیلی و گروه های آمینی در ساختار مولکولی می باشد، پیک در ناحیه  $1600\text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه آمیدی و پیک  $3400\text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه های OH و  $\text{NH}_2$  در کیتوزان می باشند. در طیف دگزامتازون، پیک ناحیه  $1600\text{ cm}^{-1}$  مربوط به  $\text{C}=\text{C}$  و  $1700\text{ cm}^{-1}$  و  $2900\text{ cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به گروه کربونیل و C-C می باشند



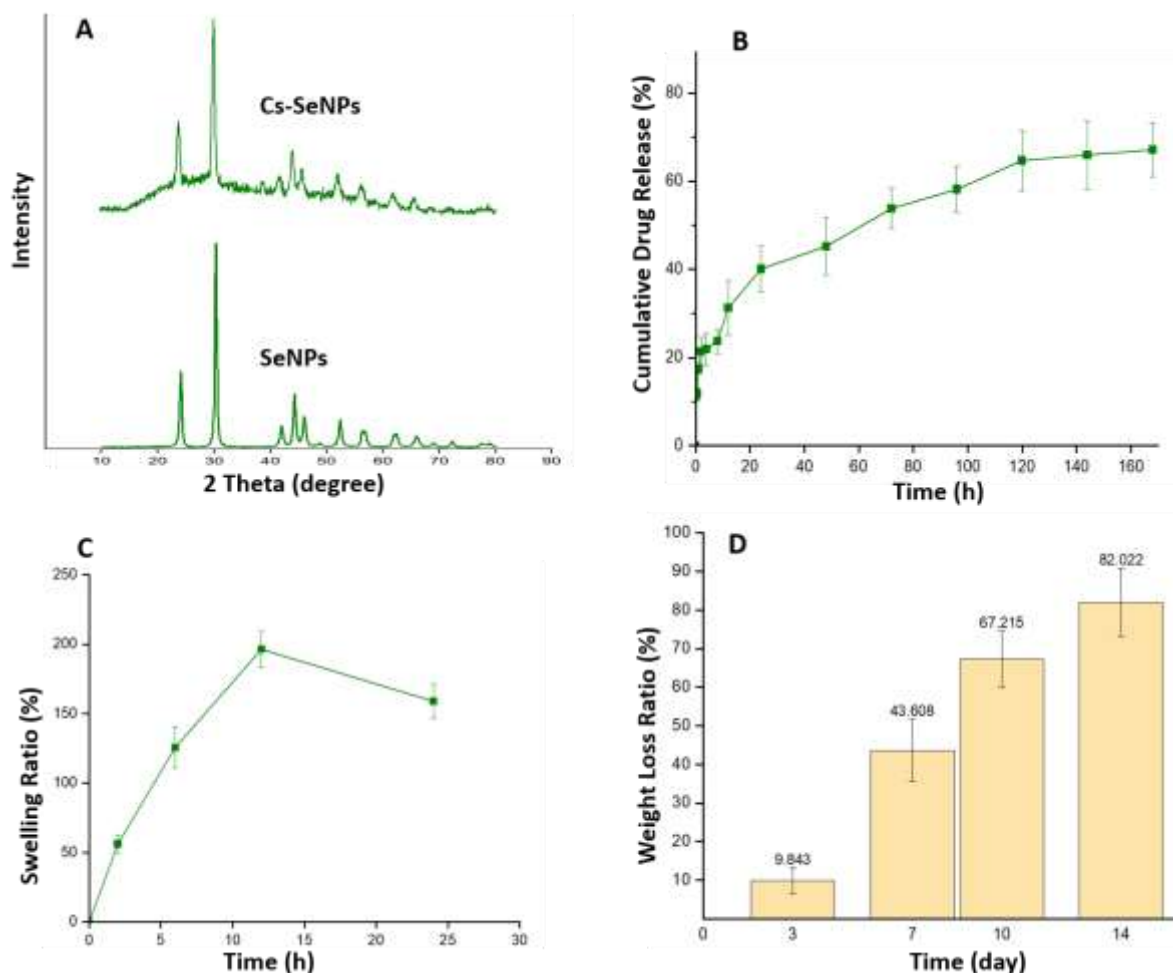
[۱۸]. نانوذرات سلنیوم-کیتوزان تمام ویژگی های پیک های جذبی کیتوزان را نشان می دهد همچنین پیک در عدد موجی ۷۵۰ مربوط به سلنیوم می باشد. در طیف FT-IR مربوط به نانوذرات سلنیوم-کیتوزان، ارتعاش های کششی C=O و C-O به ترتیب  $1600\text{ cm}^{-1}$  و  $1401\text{ cm}^{-1}$  دیده می شوند که با توجه به پیک های کیتوزان خالص به طور واضح تغییر کرده اند. پیک های طیف DEX-Cs-SeNPs عمدتاً مربوط به نانوذرات سلنیوم می باشند. همچنین در طیف مربوط به هیدروژل می توان پیک های شاخص کیتوزان و آلژینات را دید. در طیف آلژینات، پیک ناحیه  $1700\text{ cm}^{-1}$  مربوط به C=O گروه کربوکسیل و  $1020\text{ cm}^{-1}$  مربوط به C-O است [۱۹]. با توجه به اینکه این نمونه ها، پیک های مشابه در اعداد موجی مشابه دارند که با هم همپوشانی کرده اند، پیک جدیدی قابل تمیز دادن نیست.



شکل ۳. (A) طیف های FT-IR دگرامتازون، کیتوزان، نانوذرات سلنیوم-کیتوزان (SeNPs) و نانوذرات سلنیوم-کیتوزان حاوی دگرامتازون (DEX-SeNPs) و (B) طیف های FT-IR کیتوزان، آلژینات، هیدروژل کیتوزان-آلژینات حاوی نانوذرات سلنیوم بون دارو (Hydrogel-SeNPs)، نانوذرات سلنیوم-کیتوزان حاوی دگرامتازون (DEX-Cs-SeNPs) و هیدروژل کیتوزان-آلژینات حاوی نانوذرات سلنیوم بارگذاری شده با دگرامتازون

#### ۴-۳- بررسی ساختاری با الگوی پراش اشعه ایکس

طیف های XRD نانوذرات سلنیوم و نانوکامپوزیت سلنیوم-کیتوزان در شکل ۴A ارائه شده است. قله های  $24/82$  درجه،  $30/28$  درجه،  $42/11$  درجه،  $44/26$  درجه،  $46/05$  درجه،  $52/36$  درجه،  $56/25$ ،  $62/41$  و  $68/90$  درجه به ترتیب مربوط به صفحات  $100$ ،  $101$ ،  $110$ ،  $102$ ،  $201$ ،  $112$ ،  $202$ ،  $211$  و  $113$  می باشد. این پیک ها در هر دو نانوذره دیده می شوند، اما در مورد نانوذرات پوشش دار شده با کیتوزان از شدت پیک ها کاسته شده است. چنانچه ملاحظه می شود ویژگی و شدت نسبی پیک های نمونه نانوذرات سلنیوم-کیتوزان، با الگوی پراش اشعه X استاندارد نانوذرات سلنیوم مطابقت دارد که نشان دهنده سنتز موفقیت آمیز نانوذرات سلنیوم-کیتوزان می باشد [۲۰].



شکل ۴. (A) الگوی پراش اشعه X نانو ذرات سلیوم در مقایسه با نانوکامپوزیت سلیوم-کیتوزان (B) نمودار درصد رهش دارو در زمان های مختلف (C) نمودار درصد تورم هیدروژل (D) نمودار درصد تخریب هیدروژل

### ۱۱-۳- درصد بارگذاری دارو و رهایش برون تن دگزامتازون

میزان احتباس دارو و بارگذاری دارو در DEX-Cs-SeNPs به ترتیب ۹۳/۱ و ۱۵/۰۵ درصد به دست آمد. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۷ انجام شده بود مشخص شد که بارگذاری کورکومین در نانوذرات سلیوم ۶۹ درصد بوده و به این صورت است که در سطح نانوذرات سلیوم قرار می‌گیرد [۲۱]. قبل از بارگذاری کورکومین پتانسیل زتا  $-10$  mV بوده که بعد از بارگذاری با کورکومین به  $-45$  mV افزایش نشان داده است. بنابراین کورکومین در سطح نانوذرات سلیوم قرار گرفته بودند. کورکومین با تشکیل پیوندهای کوردینانسیونی سلیوم/اکسیژن و جذب فیزیکی به نانوذرات سلیوم متصل شده بود [۲۲]. پس می‌توان این پیشنهاد را ارائه کرد که دگزامتازون در سطح SeNPs قرار گرفته و با توجه به مقدار پتانسیل زتا، کیتوزان روی دارو و SeNPs را پوشش داده است. در مطالعه ای دیگر مشخص شد که میزان بارگذاری کورکومین در نانوذرات سلیوم با پوشش پکتین، بعث ایجاد پیوندهای هیدروژنی و نیروهای واندروالسی بین کورکومین و پکتین، ۶۰ درصد می‌باشد [۲۳]. بنابراین به نظر می‌رسد که دگزامتازون هم با سطح نانوذرات سلیوم و هم گروه‌های عاملی و زنجیره کیتوزان در ارتباط است.

نتایج رهایش دگزامتازون از هیدروژل کیتوزان-آلژینات حاوی نانوذرات سلنیوم بارگذاری شده با دگزامتازون در شکل ۴B نمایش داده شده است. همانطور که مشاهده می شود رهایش اولیه (رهایش ناگهانی) دارو در حدود ۲۲٪ می باشد. با گذشت زمان سرعت رهایش دارو کمتر شده و به صورت کنترل شده می باشد. بعد از گذشت حدود ۱۶۰ ساعت درصد تجمعی داروی رهایش یافته به حدود ۷۰ درصد رسیده است. نتایج تست رهایش با ۴ مدل رایج کینتیکی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در جدول ۲ گردآوری شده است [۲۴]. مدل کینتیکی برتر با در نظر گرفتن کمترین مقدار AIC و بالاترین  $R^2$  مقدار انتخاب شد که مدل کینتیکی درجه یک و Korsmeyer – Peppas بهترین نتیجه را در بر داشت. با توجه به اینکه مقدار n در رابطه Korsmeyer Peppas – برابر با ۰/۵۴ شد، پیشنهاد می گردد که مکانیسم رهایش دارو غیر فیکین بوده و ترکیبی از مکانیسم های نفوذ و فرسایش پلیمر می باشد. با توجه به معادله درجه یک نیز می توان گفت که با گذشت زمان، سرعت آزاد سازی دارو به دلیل کم شدن مقدار باقیمانده دارو در فرمولاسیون، کندتر شده است. بارگذاری دگزامتازون در نانوکامپوزیت سلنیوم-کیتوزان موجب رهایش کنترل شده دارو نیز می گردد. بنابراین دارو در یک مرحله از نانوذرات رهایش پیدا می کند و سپس از ماتریکس هیدروژل به محلول اطراف انتشار می یابد و یا تحت تخریب پلیمر آزاد می شود.

جدول ۲. مدل های کینتیکی جهت بررسی مکانیسم آزادسازی دارو از هیدروژل کیتوزان-آلژینات حاوی نانوذرات سلنیوم بارگذاری شده با دگزامتازون

Model	Equation	Parameters
Zero-order	$Q_t = Q_0 + K_0 t$	$K_0: 2.51$ $R^2: 0.14$ AIC: 91.50
First order	$\log Q_t = \log Q_0 - (K_1/2.303)t$	$K_1: 0.13$ $R^2: 0.91$ AIC: 69.12
Higuchi	$Q_t = K_H t^{(1/2)}$	$K_H: 16.08$ $R^2: 0.83$ AIC: 74.95
Korsmeyer – Peppas	$Q_t / Q_\infty = K_{KP} t^n$	$K_{KP}: 21.65$ $n: 0.54$ $R^2: 0.99$ AIC: 22.24

### ۱۲-۳- آزمون تورم هیدروژل

به منظور مطالعه جذب آب و ویژگی های تورم، تغییرات وزن و حجم هیدروژل های خشک شده اندازه گیری شد. نمونه های هیدروژل خشک شده مقدار قابل توجهی آب جذب کردند. با توجه به نمودار ۴C، با گذشت زمان هیدروژل شروع به جذب آب کرده و متورم شده است. بالاترین میزان تورم به ۱۹۶ درصد پس از گذشت ۱۲ ساعت رسیده است، که نشان دهنده آب دوستی ساختار هیدروژل می باشد [۲۵].

### ۱۳-۳- آزمون تخریب هیدروژل

همانطور که در شکل ۴D مشاهده می شود، میزان تخریب هیدروژل کیتوزان-آلژینات پس از گذشت ۳ روز حدود ۹ درصد و پس از گذشت ۷ روز حدود ۴۳ درصد می باشد که با گذشت زمان افزایش پیدا کرده است. پس از ۱۴ روز حدود ۸۲ درصد از

هیدروژل تخریب شده است. این روند سرعت تخریب، مناسب بودن هیدروژل را به منظور تهیه داربست برای مهندسی بافت و تجویز بالینی را نشان می دهد. این نانوحامل از لحاظ زیست تخریب پذیری مناسب بوده و می تواند به سیستم مناسبی جهت دارورسانی به بافت مغز تبدیل شود. در مطالعه ای میزان تخریب هیدروژل کیتوزان/آلژینات بعد از ۱۰ روز به بیش از ۸۰ درصد رسیده است که به میزان تخریب هیدروژل ما نزدیک است [۲۶]. در مهندسی بافت مغز، زمان تخریب هیدروژل باید به گونه ای تنظیم شود که هم پشتیبانی موقت مکانیکی برای بافت آسیب دیده فراهم کند و هم بافت مغزی جدید به طور کامل تشکیل شود. هیدروژل باید در مدت زمان مناسب تخریب شود و در این بازه، انتشار کنترل شده فاکتورهای درمانی و زیستی را فراهم کند. مدت زمان لازم جهت بازسازی بافت مغز در شرایط آسیب مختلف از چند روز تا چند هفته متفاوت می باشد. معمولاً برای حصول نتایج بهتر، از روش های ترکیبی همانند بارگذاری فاکتورهای رشد، پیش ساز های سلول های عصبی، سلول های بنیادی و ... می توان بهره برد.

#### ۱۴-۳- میزان تخلخل

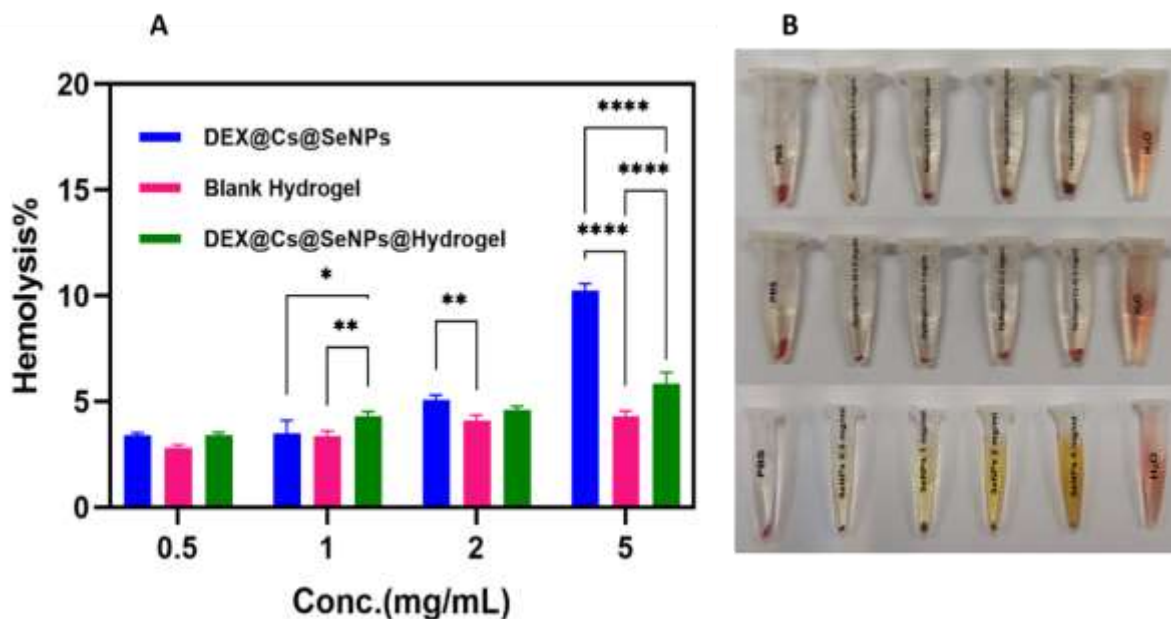
میزان تخلخل هیدروژل کیتوزان-آلژینات و هیدروژل کیتوزان-آلژینات بارگذاری شده با نانوذرات سلنیوم حاوی دگزامتازون به ترتیب  $۷۷/۰۸ \pm ۵/۳۶$  و  $۶۵/۳۱ \pm ۱۹/۴$  درصد می باشد که نشان می دهد با بارگذاری نانوذرات میزان تخلخل هیدروژل تا حدی کاهش پیدا کرده است [۲۷].

#### ۱۵-۳- آزمون همولیز

تعیین خواص همولیتیک یکی از رایج ترین آزمایش ها برای مطالعه برهمکنش نانوذرات با اجزای خون می باشد. آنالیز زیست سازگاری خونی نانوذرات بارگذاری شده با دارو و هیدروژل بدون نانوذرات و هیدروژل حاوی نانوذرات، بر اساس میزان درصد همولیز گلبول های قرمز خون نمونه ها در مقایسه با آب مقطر به عنوان کنترل مثبت انجام شد. برای غلظت های ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ میلی گرم بر میلی لیتر از نمونه ها تست همولیز انجام شد که طبق محاسبات درصد همولیز برای غلظت های زیر  $mg/mL$  ۵ مناسب و زیر ۵ درصد است. بنابراین هیدروژل کیتوزان-آلژینات بارگذاری شده با نانوذرات سلنیوم حاوی دگزامتازون و نانوذرات کایتوزان-سلنیوم حاوی دارو در غلظت های پایین تر از  $5 mg/mL$  زیست سازگاری خونی مناسبی داشته و جهت کاربردهای درون تن مناسب می باشند [۲۸].

#### ۴- نتیجه گیری

در مطالعه حاضر با بارگذاری نانوذرات سلنیوم حاوی دگزامتازون، در هیدروژل کایتوزان-آلژینات، یک داربست مهندسی بافت برای ضایعات مغزی به ویژه در بیماری سکته مغزی ارائه داده و خصوصیات فیزیکیوشیمیایی برون تن آن بررسی گردید.



شکل ۵. نمودار و تصاویر مربوط به میزان همولیز هیدروژل کیتوزان/آلژینات بارگذاری شده با نانوذرات سلنیوم حاوی دگزامتازون

میانگین قطر هیدرودینامیک نانوذرات سلنیوم بارگذاری شده با دگزامتازون ۲۱۴/۲ نانومتر بود. مقدار پتانسیل زتا نانوذرات سلنیوم حاوی دگزامتازون در حدود ۳۴/۱ میلی ولت مشاهده گردید. نتایج FTIR نشان دهنده حضور گروه های عاملی در ترکیب نهایی بود. ویژگی و شدت نسبی پیک های نمونه نانوذرات سلنیوم-کایتوزان، با الگوی پراش اشعه X استاندارد نانوذرات سلنیوم مطابقت داشت. آزمون رهش برون تن دارو نشان داد دگزامتازون از هیدروژل آزادسازی یکنواختی داشته و بعد از ۱۶۰ ساعت حدود ۷۰ درصد از دارو رهش یافته است. نتایج آزمون همولیز گلبول های قرمز برای هیدروژل و نانوذرات سلنیوم با غلظت های مختلف انجام شد که درصد همولیز زیر ۵ درصد به دست آمد که نشان دهنده مناسب بودن هیدروژل برای استفاده درمانی می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، می توان امیدوار بود که هیدروژل بارگذاری شده با نانوذرات سلنیوم حاوی دگزامتازون، حامل مناسبی برای مهندسی بافت در درمان سکته مغزی باشد. هرچند برای اثبات این فرضیه نیاز به آزمون های درون تن در مدل حیوانی خواهیم داشت.

## ۵- تقدیر و تشکر

این پژوهش توسط دانشگاه علوم پزشکی زنجان پشتیبانی شده است (کد پروژه: A-12-1381-8 و کد اخلاق: IR.ZUMS.REC.1399.408). مؤلفان هیچ وابستگی یا مشارکت مالی دیگری با هر سازمان یا نهاد با منافع مالی یا درگیری مالی با موضوع یا مطالب مورد بحث در دستنوشته جدا از موارد فاش شده، ندارند.

## ۶- فهرست منابع

[1] Wu D, Chen Q, Chen X, Han F, Chen Z, Wang Y. (2023). The blood-brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*.8(1):217.

- [2] Niazi SK. (2023). Non-invasive drug delivery across the blood–brain barrier: a prospective analysis. *Pharmaceutics*.15(11):2599.
- [3] Bruggeman KF, Williams RJ, Nisbet DR. (2018). Dynamic and responsive growth factor delivery from electrospun and hydrogel tissue engineering materials. *Advanced healthcare materials*.7(1):1700836.
- [4] Hasanzadeh E, Seifalian A, Mellati A, Saremi J, Asadpour S, Enderami SE, Nekounam H, Mahmoodi N. (2023). Injectable hydrogels in central nervous system: Unique and novel platforms for promoting extracellular matrix remodeling and tissue engineering. *Materials Today Bio*.20:100614.
- [5] Zou Z, Zhang B, Nie X, Cheng Y, Hu Z, Liao M, Li S. (2020). A sodium alginate-based sustained-release IPN hydrogel and its applications. *RSC advances*.10(65):39722-39730.
- [6] Guo S, Yao M, Zhang D, He Y, Chang R, Ren Y, Guan F. (2022). One-step synthesis of multifunctional chitosan hydrogel for full-thickness wound closure and healing. *Advanced Healthcare Materials*.11(4):2101808.
- [7] Corcoran TB, Myles PS, Forbes AB, Cheng AC, Bach LA, O’Loughlin E, Leslie K, Chan MT, Story D, Short TG. (2021). Dexamethasone and surgical-site infection. *New England Journal of Medicine*.384(18):1731-1741.
- [8] Mulley G, Wilcox R, Mitchell J. (1978). Dexamethasone in acute stroke. *Br Med J*.2(6143):994-996.
- [9] Abdelwahab NS, Ali NW, Zaki MM, Sharkawi SM, Abdelkawy MM. (2019). Simultaneous determination of thalidomide and dexamethasone in rat plasma by validated HPLC and HPTLC with pharmacokinetic study. *Journal of chromatographic science*.57(2):130-138.
- [10] Amani H, Habibey R, Shokri F, Hajmiresmail SJ, Akhavan O, Mashaghi A, Pazoki-Toroudi H. (2019). Selenium nanoparticles for targeted stroke therapy through modulation of inflammatory and metabolic signaling. *Scientific reports*.9(1):1-15.
- [11] Mittal AK, Banerjee UC. (2021). In vivo safety, toxicity, biocompatibility and anti-tumour efficacy of bioinspired silver and selenium nanoparticles. *Materials Today Communications*.26:102001.
- [12] Shakibaie M, Shahverdi AR, Faramarzi MA, Hassanzadeh GR, Rahimi HR, Sabzevari O. (2013). Acute and subacute toxicity of novel biogenic selenium nanoparticles in mice. *Pharmaceutical Biology*.51(1):58-63.
- [13] El-Badri AM, Hashem AM, Batool M, Sherif A, Nishawy E, Ayaad M, Hassan HM, Elrewainy IM, Wang J, Kuai J, Wang B, Zheng S, Zhou G. (2022). Comparative efficacy of bio-selenium nanoparticles and sodium selenite on morpho-physiochemical attributes under normal and salt stress conditions, besides selenium detoxification pathways in *Brassica napus L.* *Journal of Nanobiotechnology*.20(1):163.

- [14] Liu X, Sun J, Du J, An J, Li Y, Hu Y, Xiong Y, Yu Y, Tian H, Mei X, Wu C. (2023). Encapsulation of Selenium Nanoparticles and Metformin in Macrophage-Derived Cell Membranes for the Treatment of Spinal Cord Injury. *ACS Biomaterials Science & Engineering*.9(10):5709-5723.
- [15] Zhao H, Liu C, Song J, Fan X. (2022). Pilot study of toxicological safety evaluation in acute and 28-day studies of selenium nanoparticles decorated by polysaccharides from *Sargassum fusiforme* in Kunming mice. *Journal of Food Science*.87(9):4264-4279.
- [16] Frouhar E, Adibifar A, Salimi M, Karami Z, Shadmani N, Rostamizadeh K. (2024). Novel pH-responsive alginate-stabilized curcumin-selenium-ZIF-8 nanocomposites for synergistic breast cancer therapy. *Journal of Drug Targeting*.32(4):444-455.
- [17] Shao XR, Wei XQ, Song X, Hao LY, Cai XX, Zhang ZR, Peng Q, Lin YF. (2015). Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells. *Cell proliferation*.48(4):465-474.
- [18] Raboh ASA, El-khooly MS, Hassaan MY. (2021). Bioactivity and drug release study of dexamethasone loaded bioglass/Chitosan composites for biomedical applications. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*.31:2779-2790.
- [19] Sarmiento B, Ferreira D, Veiga F, Ribeiro A. (2006). Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate polymers*.66(1):1-7.
- [20] Karami Z, Aghajani E, Salami M, Shadmani N, Saghatchi Zanjani F, Khalili Z, Hamidi M, Masoumshahi M, Ghanbarzadeh S, Kurd M. (2024). Enhanced Antitumor and Antimetastatic Activity of pH-Responsive Curcumin-Loaded Chitosan-Selenium Nanocomposites against Breast Cancer. *BioNanoScience*.
- [21] Kumari M, Ray L, Purohit M, Patnaik S, Pant A, Shukla Y, Kumar P, Gupta K. (2017). Curcumin loading potentiates the chemotherapeutic efficacy of selenium nanoparticles in HCT116 cells and Ehrlich's ascites carcinoma bearing mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.117:346-362.
- [22] Wu Y, Liu H, Li Z, Huang D, Nong L, Ning Z, Hu Z, Xu C, Yan JK. (2019). Pectin-decorated selenium nanoparticles as a nanocarrier of curcumin to achieve enhanced physicochemical and biological properties. *IET Nanobiotechnology*.13(8):880-886.
- [23] Wu Y, Liu H, Li Z, Huang D, Nong L, Ning Z, Hu Z, Xu C, Yan J-K. (2019). Pectin-decorated selenium nanoparticles as a nanocarrier of curcumin to achieve enhanced physicochemical and biological properties. *IET Nanobiotechnology*.13(8):880-886.
- [24] Ferdose R, Zirak M, Saraei M. (2023). Cellulose Nanofibers/SiO<sub>2</sub> Nanocomposite: Preparation, Characterization and pH-Controlled Doxorubicin Delivery Properties. *Applied Chemistry*.17(65):91-100.

- [25] Qu X, Wirsen A, Albertsson A-C. (2000). Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and states of water. *Polymer*.41(12):4589-4598.
- [26] Chen X, Fan M, Tan H, Ren B, Yuan G, Jia Y, Li J, Xiong D, Xing X, Niu X. (2019). Magnetic and self-healing chitosan-alginate hydrogel encapsulated gelatin microspheres via covalent cross-linking for drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*.101:619-629.
- [27] Rassa G, Salis A, Porcu EP, Giunchedi P, Roldo M, Gavini E. (2016). Composite chitosan/alginate hydrogel for controlled release of deferoxamine: A system to potentially treat iron dysregulation diseases. *Carbohydrate polymers*.136:1338-1347.
- [28] Ehterami A, Salehi M, Farzamfar S, Samadian H, Vaez A, Ghorbani S, Ai J, Sahrapeyma H. (2019). Chitosan/alginate hydrogels containing Alpha-tocopherol for wound healing in rat model. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*.51:204-213.