

Điều chế hydrogel kết dính sinh học trên cơ sở chitosan để dán vết thương

• **Phạm Thị Mỹ Diễm**

Trường Đại học Lạc Hồng

• **Hoàng Thị Hoa**

Trường Đại học Tôn Đức Thắng

• **Đặng Đình Vũ**

Trường Đại học Cần Thơ

• **Trần Ngọc Quyên**

Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Hồ Chí Minh

(Bài nhận ngày 18 tháng 12 năm 2014, nhận đăng ngày 12 tháng 06 năm 2015)

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi giới thiệu một loại hydrogel trên cơ sở chitosan oxy hóa để kết dính mô. Chitosan – polyethyleneglycol - tyramine hydrogel được hình thành nhanh chóng trong sự hiện diện của enzyme horseradish peroxidase (HRP) và hydrogen peroxide (H_2O_2). Thử nghiệm in vitro với tế bào fibroblast bằng kit live/dead cho thấy khả năng tương hợp sinh học cao.

Từ khóa: Horseradish peroxidase, chitosan, hydrogel.

Đánh giá khả năng kết dính mô được thực hiện trên da heo cho thấy cường độ kết dính mô lớn nhất của hydrogel chitosan là 88 kPa và 105 kPa đối với hydrogel chitosan oxy hóa. Vật liệu hydrogel này được kỳ vọng sẽ trở thành một loại vật liệu có hiệu quả kết dính mô cao và được ứng dụng rộng rãi trong phẫu thuật.

MỞ ĐẦU

Hydrogel là loại vật liệu gồm các mạng polymer ba chiều, có tính chất ưa nước và có khả năng hấp thụ một lượng nước rất lớn [3]. Hydrogel có nhiều tính chất đặc trưng như gần giống mô tự nhiên, độ tương thích sinh học và khả năng kết dính cao. Nhờ những tính chất đó mà hydrogel đã được nghiên cứu nhiều để ứng dụng mang nhà thuốc trong tế bào, công nghệ cấy ghép và tái tạo mô. Ngoài ra, hydrogel còn ứng dụng trong cầm máu và chữa lành vết thương [4]. Hydrogel sinh học được sử dụng như một chất kết dính vết thương được dùng trong phẫu thuật để gắn kết hoặc giữ các mô bên trong hay ngoài cơ thể như da, mạch máu sau phẫu thuật hay chấn thương. Sử dụng chất kết dính này thường mang lại sự dễ chịu, hài lòng cho bệnh nhân và góp phần thúc đẩy quá trình chữa lành vết thương

cũng như tăng tính thẩm mỹ cho vết thương được xử lý [1-6].

Gần đây, các nhà nghiên cứu đã tập trung nghiên cứu điều chế hydrogel dựa trên cơ sở polymer thiên nhiên có các đặc tính như khả năng tương thích và phân hủy sinh học cao. Theo định hướng trên, hydrogel trên cơ sở chitosan hứa hẹn là một vật liệu tiềm năng để điều chế keo kết dính sinh học sử dụng trong phẫu thuật. Chitosan là một polysaccharid mạch thẳng, là dẫn xuất deacetyl hóa của chitin, được tạo thành từ các D-glucosamine liên kết tại vị trí β -(1,4) glycoside [7]. Chitosan sở hữu nhiều đặc tính sinh học cho tái tạo mô như khả năng tương thích sinh học, phân hủy sinh học, khả năng kết dính sinh học, có tác dụng cầm máu và kháng khuẩn.

Ngoài ra, chitosan còn giúp kích thích sản xuất macrophage và fibroblast để tạo ra các nhân tố phát triển có lợi để tăng cường chữa lành vết thương [4].

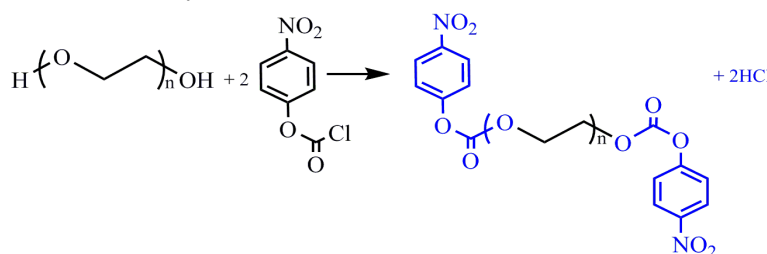
Khả năng kết dính của hydrogel trên da được giải thích là do sự tương tác tĩnh điện của điện tích dương cao trên sườn chitosan với điện tích âm trong mô của người. Chitosan được biết đến với khả năng tương tác chặt chẽ với tế bào biểu mô [2].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi điều chế hydrogel trên cơ sở chitosan oxi hóa bởi sodium periodate. Hydrogel được tạo thành nhanh chóng trong vài giây trong sự hiện diện của enzyme horseradish peroxidase (HRP) và hydrogen peroxide (H_2O_2). Khả năng tương hợp sinh học của hydrogel được đánh giá bằng kit live/dead, khả năng kết dính mô của hydrogel được thực hiện trên da heo. Thử nghiệm kết dính trên vết thương thỏ và đánh giá chữa lành vết thương bằng phương pháp nhuộm hóa mô Hematoxylin – Eosin.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chitosan (MW=100.000-300.000 Dalton), *p*-nitrophenyl chloroformate (NPC), tyramine (TA),



Hình 1. PEG hoạt hóa với NPC

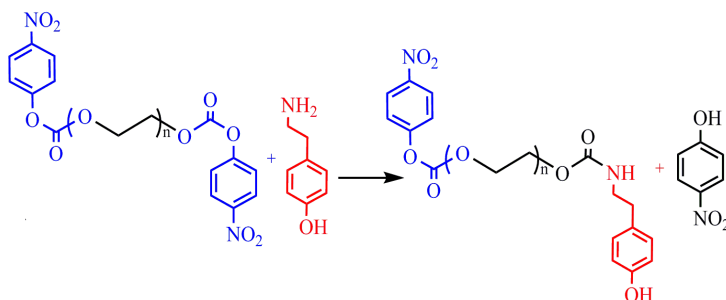
Để thu được polymer NPC-PEG-TA, tyramine (TA, 0.0028 mol) được hòa tan trong 5 mL DMF và 25 ml THF và nhỏ từng giọt vào NPC-PEG-NPC (10 g, 0.0023 mol) được hòa tan trong 40 mL THF, khuấy trong 24 giờ. Hỗn hợp được tạo tủa với diethyl ether dư, lọc hút chân

polyethyleneglycol (PEG, MW=4000 g/mol) có xuất xứ từ Acros Organics. HRP và H_2O_2 xuất xứ từ Sigma-Aldrich. Màng thẩm tách Spectra Por Ester Cellulose Membrane MWCO 14000 Dalton của Aldrich.

Tổng hợp *p*-nitrophenyl chloroformate-polyethylene glycol-tyramine (NPC-PEG-TA)

Polymer được điều chế qua 2 giai đoạn. Đầu tiên, hai nhóm cuối của PEG được hoạt hóa với NPC. Giai đoạn 2, PEG được hoạt hóa NPC sẽ được thay thế một phần bằng tyramine. 10 g PEG (0,0025 mol) được đun nóng chảy ở 70 °C và sau đó thêm NPC (1,512 g, 0,0075 mol), khuấy hỗn hợp trong 3 giờ và được lọc hút chân không. Thêm 10 ml THF vào hỗn hợp và khuấy trong 1 giờ, đưa về nhiệt độ phòng. Hỗn hợp được tạo tủa với diethyl ether, lọc rửa kết tủa nhiều lần bằng diethyl ether, sau đó đem cô quay chân không thu được PEG hoạt hóa NPC. Mũi đơn ở $\delta = 2,00$ ppm chứng tỏ sự có mặt của proton methyl trong nhóm $COCH_3$ trên mạch chitosan. Mũi đơn ở $\delta = 3,64$ ppm là tín hiệu nhóm methylene của mạch PEG. Hai tín hiệu mũi ở $\delta = 6,77$ ppm và $\delta = 7,02$ pm là tín hiệu proton liên hợp vòng thơm của tyramine. Mức độ hoạt hóa đạt khoảng 94 %.

không và cô quay thu được polymer NPC-PEG-TA. Khoảng 50 % NPC hoạt hóa PEG được thay thế bởi TA. 1H NMR ($CDCl_3$) của NPC-PEG-TA, $\delta_{ppm} = 3,64$ (s, $-CH_2-CH_2-$, PEG); 6,77 và 7,02 (d, $-CH=CH-$, TA); 8,29 và 8,38 (d, $-CH=CH-$, NPC)



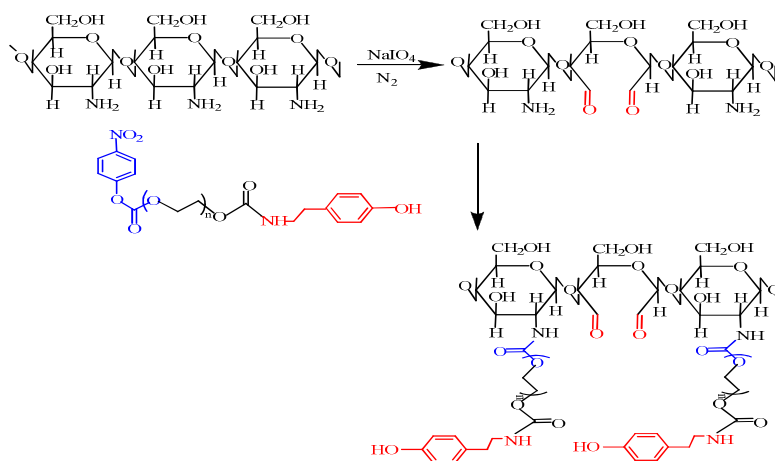
Hình 2. Một phần tyramine thay thế PEG hoạt hóa NPC

Điều chế chitosan oxi hóa ghép

1 g chitosan được hòa tan với 40 mL nước cất, điều chỉnh pH = 2÷3 bằng dung dịch HCl 10 %. Sau khi chitosan tan hoàn toàn thì chỉnh pH của dung dịch lên 4 bằng dung dịch NaOH 1M, giữ ở nhiệt độ phòng. Hòa tan NaIO₄ (0,272 g) trong 40 mL nước cất ở 4 °C, nhỏ từng giọt vào dung dịch chitosan. Hỗn hợp được khuấy trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng, tránh tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng. Dung dịch được thẩm tách trong nước muối trong 3 ngày với màng MW 14000 Da thu được chitosan oxi hóa.

Để gắn NPC-PEG-TA vào sườn chitosan, hòa tan NPC-PEG-TA (3,8 g) trong 30 mL nước cất, nhỏ từng giọt vào bình cầu chứa chitosan oxi

hóa, khuấy liên tục trong 24 giờ. Dung dịch được thẩm tách bằng màng MW 14000 Da với nước cất trong 3 ngày, sau đó được đông sâu rồi đông khô thu được chitosan oxi hóa-PEG-TA. Mức độ oxi hóa periodate được đánh giá bằng phổ ¹H NMR và hàm lượng tyramine được ghép trong copolymer được xác định bởi phổ UV-Vis. Mức độ oxi hóa đạt khoảng 14 % được tính bằng độ suy giảm proton H_a (glucosamine) trong mẫu chitosan và mẫu chitosan oxi hóa ghép TA – PEG. Hiệu suất tổng hợp được khoảng 81 %. ¹H NMR (D₂O)/δ_{ppm}: δ = 2,00 (s, -COCH₃, chitosan); 3,63 (s, -CH₂-CH₂-, PEG); 6,77 và 7,02 (d, -CH=CH-, TA).



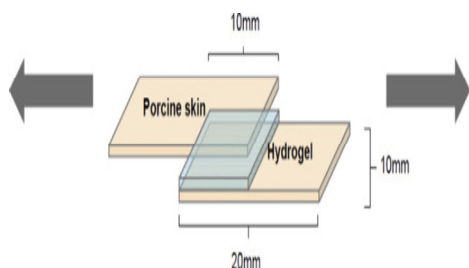
Hình 3. Quá trình oxi hóa periodate và gắn NPC-PEG-TA vào sườn chitosan oxi hóa Tổng hợp hydrogel và thời gian gel hóa

Tổng hợp hydrogel và thời gian gel hóa

Hydrogel được điều chế trong sự hiện diện của enzyme horseradish peroxidase (HRP) và hydrogen peroxide (H_2O_2). Cân 15 mg chitosan oxi hóa-PEG-TA hòa tan trong 135 μ L HRP 0,07 mg/ml (dung dịch A). Cân 15 mg chitosan oxi hóa-PEG-TA hòa tan trong 135 μ L H_2O_2 có nồng độ khác nhau từ 0,03 % đến 0,055 % (dung dịch B). Hydrogel được tạo thành nhanh chóng khi trộn hai dung dịch A và B lại với nhau. Thời gian tạo gel được xác định từ thời điểm trộn lẫn hai mẫu vào nhau cho đến khi gel đã đông rắn và dốc ngược dung dịch không còn chảy ngược xuống.

Cường độ kết dính mô

Cường độ kết dính mô của hydrogel chitosan oxi hóa được đo trên máy Universal (Hounsfield model H5KT, Tinius Olsen, Anh) với da heo. Mẫu da heo được cắt và loại bỏ phần chất béo. Keo cyanoacrylate, hydrogel chitosan oxi hóa, không oxi hóa ở các nồng độ khác nhau được chuẩn bị và tiêm vào giữa hai lớp da heo. Trong thời gian thử nghiệm, hai lớp da chồng lên nhau và được giữ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, sau đó đo cường độ kết dính trên máy Universal với tốc độ trượt 10 mm.phút⁻¹. Cường độ kết dính lớn nhất được ghi nhận tại thời điểm hai lớp da bị tách rời ra.



Hình 4. Hình minh họa đo cường độ kết dính mô [1]

Đánh giá độ tương hợp sinh học của hydrogel

Đánh giá độ tương hợp sinh học của hydrogel với tế bào fibroblast bằng bộ khảo

nghiệm live/dead, trong đó bao gồm Calcein AM và Ethidium homodimer-1. Sau khi ủ 6 giờ và 24 giờ, các hydrogel chứa tế bào được rửa với PBS và nhuộm màu trong 45 phút kết hợp với tác nhân thử live/dead ở 37 °C trong bóng tối. Hydrogel chứa tế bào đã nhuộm màu được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang.

Đánh giá khả năng kết dính mô của hydrogel trên vết thương thỏ

Đánh giá khả năng kết dính mô được thực hiện trên ba con thỏ khác nhau với keo cyanoacrylate, chỉ khâu và hydrogel chitosan oxi hóa. Thỏ được gây mê bằng thuốc gây mê ketamin, vùng da dùng để thí nghiệm được cạo sạch lông và khử trùng bằng ethanol.

Tại vùng da đã xử lý tạo một vết thương dài khoảng 2 cm. Hydrogel được chuẩn bị trong xy lanh đôi được tiêm vào vết thương, giữ 30 phút cho hydrogel kết dính vết thương lại. Cuối cùng cố định vết thương bằng keo cyanoacrylate. Sau phẫu thuật, thỏ được nuôi trong điều kiện bình thường, cung cấp thức ăn và nước uống đầy đủ. Quan sát quá trình lành vết thương sau 3 ngày và 14 ngày. Tương tự, thực hiện kết dính mô trên thỏ bằng keo cyanoacrylate và chỉ khâu.

Đánh giá chữa lành vết thương bằng phương pháp nhuộm hóa mô Hematoxylin - Eosin

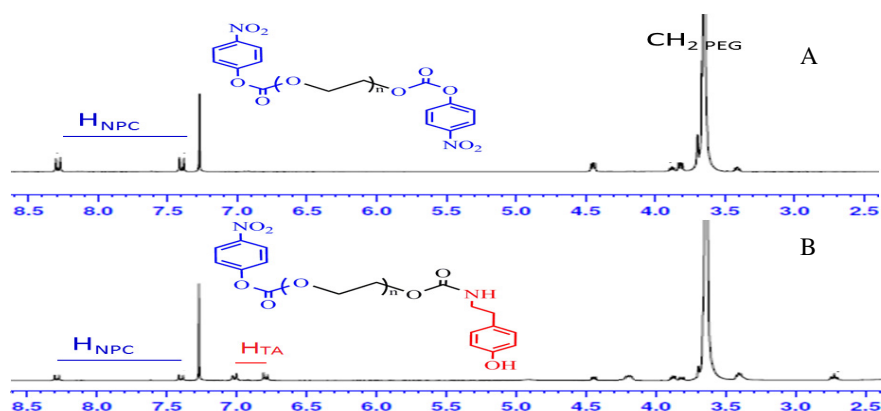
Sau 14 ngày, phần vết thương của thỏ được cắt ra và được cố định trong dung dịch formalin và sau đó được nhúng trong dầu parafin để xử lý mô học. Một phần khoảng 3 mm của mẫu đã nhúng parafin được nhuộm với Hematoxylin và Eosin và được đánh giá quan sát bằng kính hiển vi ánh sáng với phần mềm phân tích hình ảnh đặc biệt. Từ kết quả thu được, tiến hành đánh giá khả năng chữa lành vết thương của vết thương được xử lý bằng chỉ khâu, keo cyanoacrylate và hydrogel chitosan oxi hóa.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

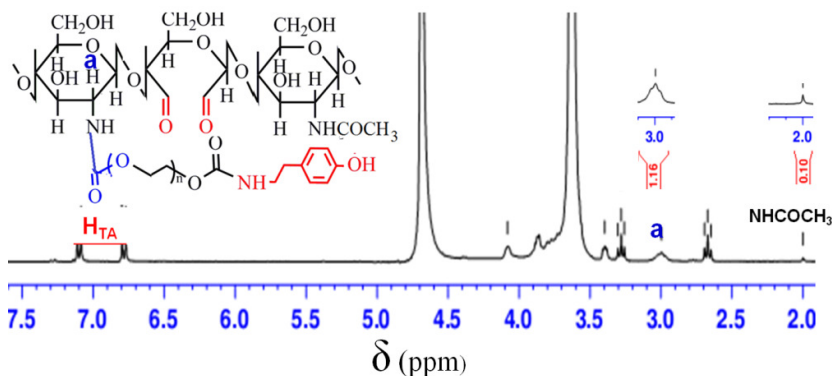
Đặc trưng của chitosan oxi hóa-PEG-TA

Hình 5A cho thấy phổ ^1H -NMR của PEG hoạt hóa NPC với các tín hiệu mũi đặc trưng của proton nhóm NPC ($\delta = 8,29$ và $\delta = 8,38$ ppm) và proton methylene của PEG ($\delta = 3,64$ ppm). Ngoài ra, proton methylene của PEG ($\delta = 4,42$ ppm) liên kết với nhóm NPC (NPC-O-CH₂) là tín hiệu khẳng định hoạt hóa hiệu quả. Mức độ hoạt hóa đạt khoảng 94 % được tính từ tỷ lệ tích phân của proton thơm (NPC) và proton methylene (PEG).

Polymer NPC-PEG-TA có phổ ^1H -NMR trong Hình 5B, một phần tyramine được thay thế NPC trong mạch PEG hoạt hóa NPC. phổ ^1H -NMR xuất hiện tín hiệu cộng hưởng của các proton thơm của nhóm tyramine ở $\delta = 6,77$ và $7,02$ ppm. Ngoài ra, ở vùng $8,29 - 8,38$ ppm thể hiện tín hiệu của proton thơm (NPC). Khoảng 50 % NPC được thay thế bởi TA thu được từ kết quả tính tỷ lệ tích phân của proton thơm (NPC) và proton thơm liên hợp của TA.



Hình 5. Phổ ^1H -NMR của polymer: A) PEG hoạt hóa NPC, B) NPC-PEG-TA

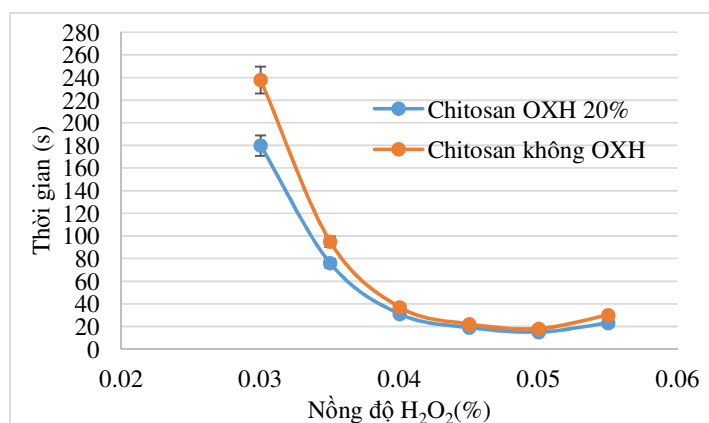


Hình 6. Phổ ^1H -NMR của Chitosan oxi hóa-PEG-TA

Hình 6 cho thấy mũi đơn ở $\delta = 2.00$ ppm chứng tỏ sự có mặt của proton methyl trong nhóm COCH_3 trên mạch chitosan. Mũi đơn ở $\delta = 3,64$ ppm là tín hiệu nhóm methylene của mạch PEG. Hai tín hiệu mũi ở $\delta = 6,77$ ppm và $\delta = 7,02$ ppm là tín hiệu proton liên hợp vòng thơm của tyramine. Mức độ oxi hóa của chitosan khoảng 14 % được tính bằng độ suy giảm của proton H_a (glucosamine) trong mẫu chitosan và TA-PEG ghép chitosan oxi hóa.

Thời gian gel hóa của hydrogel

Hydrogel được tạo thành nhanh chóng khi trộn hai dung dịch lại với nhau trong sự hiện diện của HRP và H_2O_2 . Trong nghiên cứu này, chúng tôi giữ nồng độ enzyme HRP ở 0,07 mg/mL và nồng độ của H_2O_2 được thay đổi từ 0,03 đến 0,055 wt%.



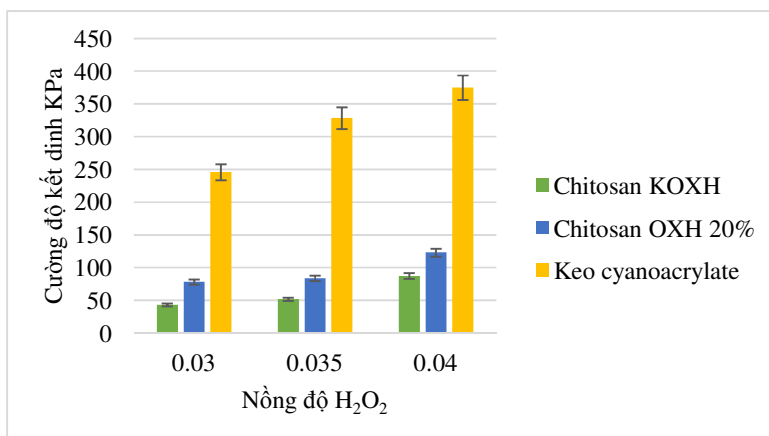
Hình 7. Biểu đồ thời gian gel hóa của hydrogel chitosan oxi hóa và không oxi hóa

Hình 7 cho thấy thời gian tạo gel hóa hydrogel giữa chitosan oxi hóa và không oxi hóa có sự chênh lệch nhiều, hydrogel chitosan oxi hóa có thời gian tạo gel nhanh hơn so với không oxi hóa. Tuy nhiên theo Hình 7, cả hai đều có đồ thị theo dạng parabol chứng tỏ nồng độ H_2O_2 ảnh hưởng tới thời gian tạo gel, nếu nồng độ quá thấp thời gian tạo gel sẽ lâu, nhưng nếu tăng nồng độ

lên quá cao thì H_2O_2 sẽ gây ức chế enzyme làm cho thời gian tạo gel tăng lên.

Cường độ kết dính mô

Tiến hành đo với các mẫu da heo được dán dính bằng 2 loại hydrogel và keo cyanoacrylate ở những nồng độ khác nhau cho kết quả như Hình 8.

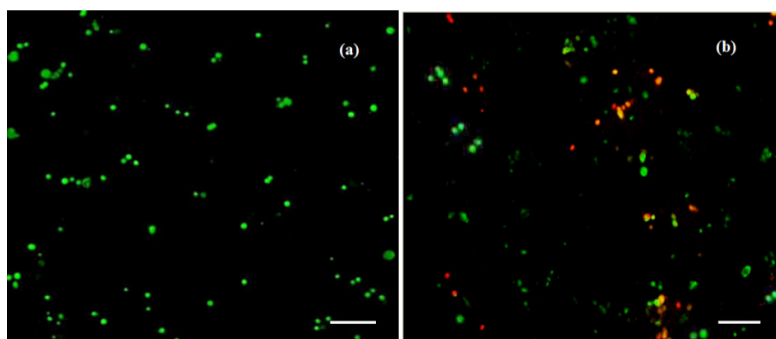


Hình 8. Biểu đồ cường độ kết dính giữa hydrogel chitosan oxi hóa, chitosan không oxi hóa và keo cyanoacrylate

Biểu đồ trên cho thấy: hydrogel chitosan không oxi hóa có cường độ kết dính mô thấp hơn so với hydrogel chitosan oxi hóa, do trong cấu trúc của hydrogel chitosan oxi hóa có chứa nhiều nhóm aldehyde nên tương tác tốt với nhóm NH_2 trong collagen hơn, dẫn đến khả năng kết dính mô tốt hơn. Tuy nhiên 2 loại keo dán hydrogel đều có cường độ kết dính thấp hơn rất nhiều so với keo cyanoacrylate. Mặt khác, ở nồng độ H_2O_2 0,04 % cường độ kết dính mô của hydrogel chitosan không oxi hóa, oxi hóa và cyanoacrylate lần lượt là 88 kPa, 105 kPa và 375 kPa đều cao hơn so với hai nồng độ còn lại. Do đó, ở nồng độ này là thích hợp nhất cho quá trình tiến hành khảo sát trên vết thương ở thỏ.

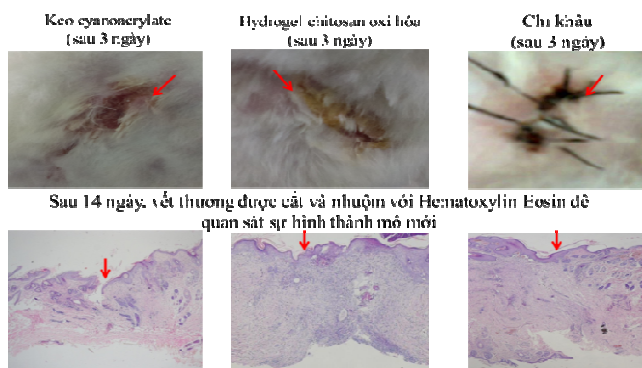
Đánh giá tương hợp sinh học bằng kit live/dead

Đánh giá độ tương thích sinh học bằng cách sử dụng phương pháp xác định số tế bào sống/chết sau 1 ngày với 2 mẫu hydrogel ủ trong dung dịch H_2O_2 0,035 wt/wt % (trái) và 0,07 wt/wt % (phải). Các tế bào có màu xanh lá cây là các tế bào sống và các tế bào có màu đỏ là các tế bào chết. Hình 9 cho thấy hầu hết các tế bào đều có màu xanh lá cây đối với mẫu 0,035 wt/wt % và bắt đầu có xuất hiện các tế bào bắt màu đỏ với mẫu 0,07 wt/wt %. Những kết quả thu được thể hiện sự tương thích sinh học cao của mẫu hydrogel ủ trong nồng độ 0,035 % và độ tương thích giảm khi nồng độ tăng quá cao.



Hình 9. Các tế bào fibroblast trong hydrogel được ủ trong dung dịch H_2O_2 0,035wt/wt% (a) và 0,07wt/wt%(b) sau 24h ủ

Khả năng chữa lành vết thương trên thỏ



Hình 10. Vết thương xử lý bằng các loại keo và khâu bằng chỉ sau 3 ngày (trên), quan sát dưới kính hiển vi sau 14 ngày (dưới).

Sau khi tiến hành dán vết thương cho thỏ bằng các loại keo dán khác nhau và theo dõi mức độ lành vết thương đồng thời tiến hành đánh giá mức độ tương thích sinh học bằng phương pháp nhuộm HE kết quả như trình bày trong Hình 10.

Sau 3 ngày, tốc độ chữa lành vết thương dán bằng keo cyanoacrylate là chậm nhất, vết thương bị sưng tấy và các mô thịt xung quanh vết thương bị viêm. Vết thương khâu bằng chỉ tuy vẫn còn hở nhưng không bị sưng tấy. Vết thương dán bằng hydrogel chitosan đã đóng kín miệng, không bị sưng và có tốc độ hồi phục nhanh hơn so với vết thương xử lý bằng chỉ khâu và keo cyanoacrylate.

Như vậy tuy keo cyanoacrylate cho cường độ kết dính cao hơn so với hydrogel chitosan oxi hóa 20 % nhưng khi tiến hành dán vết thương thì lại cho hiệu quả kém hơn. Điều này là do keo cyanoacrylate sinh nhiệt trong quá trình tiếp xúc với mô nên dẫn đến sự sưng tấy và làm mô bị viêm nhiễm.

Sau 14 ngày, quan sát bằng mắt thường thấy vết thương ở cả ba con thỏ đều đã lành, lông đã mọc lại, thỏ sinh trưởng và phát triển bình thường.

Sau khi tiến hành nhuộm mẫu mô bằng Hematoxylin – Eosin cho kết quả như sau:

Mẫu mô được xử lý bằng keo cyanoacrylate: khoảng cách giữa hai mép của mô ở vị trí vết cắt là rất lớn, các tế bào bị khô cứng và nằm rời rạc chứng tỏ sự hồi phục vết thương kém.

Mẫu mô được xử lý bằng chỉ khâu: có tốc độ hồi phục vết thương tốt hơn so với mẫu được xử lý bằng keo cyanoacrylate, tuy nhiên khoảng cách giữa hai mép tại vị trí vết cắt vẫn còn, số tế bào mới vẫn chưa nhiều.

Mẫu mô được xử lý bằng hydrogel chitosan: có sự xuất hiện của một số lượng lớn các tế bào mới - tế bào bắt màu xanh với Hematoxylin và xuất hiện đồng đều trên toàn bộ bề mặt của vết cắt của mô, chứng tỏ vết thương đã hồi phục hoàn toàn.

Như vậy, khả năng chữa lành vết thương trên thỏ của hydrogel chitosan là tốt hơn nhiều so với keo cyanoacrylate và tương đương với chỉ khâu.

KẾT LUẬN

Hydrogel chitosan oxi hóa-PEG-TA được tạo thành nhanh chóng trong sự hiện diện của HRP và H_2O_2 . Những kết quả có được cho thấy hydrogel tạo thành có thời gian gel hóa nhanh và độ tương hợp sinh học cao. Hydrogel được kỳ vọng trở thành vật liệu có độ kết dính mô cao được ứng dụng rộng rãi trong phẫu thuật.

Preparation of bio - adhesive hydrogel based on chitosan for wound sealant

• **Pham Thi My Diem**

Lac Hong University

• **Hoang Thi Hoa**

Ton Duc Thang University

• **Đang Đình Vu**

Can Tho University

• **Tran Ngoc Quyen**

Institute of Applied Materials Science, Ho Chi Minh

ABSTRACT

In this study, we introduce a new kind of hydrogel based on oxidized chitosan for tissue adhesion. The hydrogel formed rapidly in a few seconds in the presence of horseradish peroxidase (HRP) and hydrogen peroxide (H_2O_2). The in vitro cytocompatible experiment with fibroblast cell using kit live/dead assay showed that the hydrogel was highly biocompatible. Evaluation of

Key word: Horseradish peroxidase, chitosan, hydrogel.

tissue adhesion performed on pork skin the maximum tissue adhesive forces are 88 kPa for chitosan hydrogel and 105 kPa for oxidized chitosan hydrogel.. These results suggest that chitosan hydrogel possessed the wound healing ability and promises a tissue adhesive devices for biomedical applications.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Brocair Parners, Surgical Sealants Market Update (2008).
- [2]. E.Lih, J.S. Lee, K.M. Park, K.D. Park, Rapidly curable chitosan-PEG hydrogels as tissue adhesives for hemostasis and wound healing, *Acta Biomaterialia* 8, 3261-3269 (2012)
- [3]. H. Omidian, K. Park, Introduction to hydrogels, biomedical applications of hydrogels handbook, 1-16 (2010).
- [4]. N.C. Khoa, T.N. Quyen, N.D. Hai, Tetronic-grafted chitosan hydrogel as an injectable and biocompatible scaffold for biomedical applications, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1-12 (2013).
- [5]. R. Jin, J.P. Dijkstra, Hydrogel for tissue engineering application, Biomedical Applications of Hydrogel Handbook, 203-209 (2010).
- [6]. S.K. Bhatia, S.D. Arthur, H. K. Chenault, G. K. Kodokian, Interaction of polysaccharide-based tissue adhesives with clinically relevant fibroblast and macrophage cell lines, *Biotechnology Letter*, 29 1645-9 (2007).
- [7]. S.O. Fernandez, B.S. Kim, Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols, 1-16 (2004).
- [8]. T.N. Quyen, Y.K. Joung, E. Lih, K.M. Park, K.D. Park, In situ forming and rutin-releasing chitosan hydrogels as injectable dressings for dermal wound healing, *BioMacromolecules*, 12 (2011).