Birjand University of Medical Sciences

Journal of Translational Medical Research

Original Article

Investigation of the effect of chitosan-polycaprolactone scaffolds loaded with chrysin-capped silver nanoparticles in the healing of experimental cutaneous wound defects in rat

Mohammad Talvari[1], Effat Alemzadeh[2], Tahere Farkhondeh[3], Esmat Alemzadeh[4]*, Pouria Mohammadparast[5], Soroush Mohammadi[5]

[1] Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
[2] Infectious Diseases Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
[3] Geriatric Health Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
[4] Infectious Diseases Research Center, Department of Medical Biotechnology, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
[5] Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

***Corresponding author:** Esmat Alemzadeh
Tel: +985632381547 Fax: +985632433004 E-mail: esmat.alemzadeh@gmail.com

ABSTRACT

Background and Aims: Nowadays, the use of antimicrobial agents with the lowest opportunity to develop resistance against microbes for the treatment of infections has been proposed as a new approach. This study aimed to use green silver nanoparticles (AgNPs) synthesized with chrysin as an antibacterial compound in wound healing.

Materials and Methods: In this experimental study, chrysin was employed as a reducing agent for the synthesis of AgNPs. The synthesized nanoparticles were characterized for size, structural properties, and morphology. The nanoparticles were subsequently blended with a polycaprolactone-chitosan polymer mixture and electrospun into nanofibers. The antibacterial activity of these nanofibers was evaluated against *Staphylococcus aureus*. To assess the wound-healing properties of the nanofibers, full-thickness excisional wounds (1 cm in diameter) were created on rats and treated with the synthesized scaffolds. Skin samples were histopathologically examined to evaluate pathological characteristics.

Results: The results showed that chrysin capped AgNPs with a diameter of about 101±15 nm were synthesized. Scaffolds containing AgNPs significantly inhibited the growth of *S. aureus*, compared to the scaffold and control groups. The *in vivo* results also showed that the rates of wound closure in the treatment and control groups were 85.7±10.05% and 69.4±3.8% on the 7th day after treatment, respectively. These results showed that the use of chrysin capped AgNPs significantly reduced the size of the wound.

Conclusion: The produced scaffolds can play an effective role in wound healing by reducing infection at the injury site.

Keywords: Chitosan, Chrysin, Green synthesis, Nanofibers, Polycaprolactone, Rat, Silver nanoparticles, Wound healing

Citation: Talvari M, Alemzadeh E, Farkhondeh T, Alemzadeh E, Mohammadparast P, Mohammadi S. [Investigation of the effect of chitosan-polycaprolactone scaffolds loaded with chrysin-capped silver nanoparticles in the healing of experimental cutaneous wound defects in rat]. Journal of Translational Medical Research. 2025; 32(?): In press. [Persian]

DOI http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2025.32.?.??????

Received: January 29, 2025 **Accepted:** May 25, 2025

Copyright © 2025, Journal of Translational Medical Research. This open-access article is available under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 (CC BY-NC 4.0) International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), which allows for the copying and redistribution of the material only for noncommercial purposes, provided that the original work is properly cited.

مقاله اصیل پژوهشی

بررسی اثر داربست پلی‌کاپرولاتون– چیتوزان حاوی نانوذرات نقره سبز سنتز شده با فلاونوئید کرایزین در ترمیم زخم‌های تجربی ایجاد شده در موش صحرایی

محمد تلواری [۱]، عفت عالم زاده [۲]، طاهره فرخنده [۳]، عصمت عالم زاده [۴]*، پوریا محمدپرست [۵]، سروش محمدی [۵]

چکیده

زمینه و هدف: امروزه استفاده از عوامل ضدمیکروبی با حداقل فرصت ایجاد مقاومت در برابر میکروب‌ها برای درمان عفونت‌ها به عنوان یک رویکرد جدید مطرح شده است. هدف از این مطالعه استفاده از نانو ذرات نقره سبز سنتز شده با کرایزین به عنوان یک ترکیب آنتی‌باکتریال در ترمیم زخم می‌باشد.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی از کرایزین به عنوان عامل کاهنده برای تولید نانوذرات نقره استفاده شد. نانوذرات حاصله برای تعیین اندازه و خواص ساختاری و مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. نانوذرات سنتز شده با مخلوط پلیمری پلی کاپرولاکتون– چیتوزان مخلوط و توسط الکتروریسی الیاف آن ریسیده شد. فعالیت ضدباکتریایی این نانوالیاف بر علیه باکتری استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس بررسی گردید. برای بررسی خواص ترمیمی نانوالیاف، زخم هایی با قطر ۱ سانتی‌متر در موش صحرایی ایجاد و با استفاده از داربست‌های سنتز شده تیمار شدند. نمونه‌های پوستی پس از درمان از نظر خصوصیات پاتولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که نانوذرات نقره کرایزین با قطر حدود ۱۵± ۱۰۱ نانومتر سنتز شدند. داربست‌های حاوی نانوذرات نقره در مقایسه با گروه داربست و گروه کنترل به‌طور معنی‌داری باعث مهار رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شدند. بر اساس نتایج *in vivo* نرخ بسته شدن زخم در گروه درمان و کنترل به ترتیب ۱۰/۰۵±۸۵/۷ و ۳/۸±۶۹/۴ درصد در روز ۷ پس از درمان بود. این نتایج نشان داد که استفاده از نانوذرات نقره کرایزین به‌طور معنی‌داری موجب کاهش اندازه زخم شده است.

نتیجه‌گیری: داربست‌های تولید شده می‌توانند با کاهش عفونت نقش مؤثری در ترمیم زخم‌ها داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: چیتوزان، کرایزین، سنتز سبز، نانوالیاف، پلی‌کاپرولاکتون، موش صحرایی، نانوذرات نقره، ، ترمیم زخم

مجله تحقیقات پزشکی ترجمانی. ۱۴۰۴؛ ۳۲ (؟): در حال انتشار.

دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۱۰ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۰۴

[۱] دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

[۲] مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

[۳] مرکز تحقیقات سالمندان، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

[۴] گروه زیست فناوری پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

[۵] گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

***نویسنده مسئول: عصمت عالم زاده**

آدرس: خراسان جنوبی– بیرجند– دانشگاه علوم پزشکی بیرجند– دانشکده پزشکی– گروه زیست فناوری پزشکی

تلفن: ۰۵۶۳۲۳۸۱۵۴۷ نمابر: ۰۵۶۳۲۴۳۳۰۰۴ پست الکترونیکی: esmat.alemzadeh@gmail.com

مقدمه

آسیب بافت پوست چه در اثر عوامل خارجی و چه در اثر بیماری‌های زمینه‌ای می‌تواند منجر به تهدیدی بزرگ برای سلامتی انسان، اختلال در عملکرد جسمی و حتی مرگ شود (۱). امروزه پانسمان‌های پزشکی به‌عنوان یکی از متداول‌ترین روش‌های درمانی در ترمیم بافت‌های آسیب دیده نقش مهمی دارند (۲). در این میان، پانسمان‌های پزشکی بر پایه نانوالیاف الکتروریسی شده به دلیل ایجاد یک شرایط ایده‌آل برای ترمیم زخم به عنوان یکی از زمینه‌های تحقیقاتی در تولید پانسمان‌های پزشکی تبدیل شده است (۳). نانوالیاف تولید شده توسط تکنیک‌های الکتروریسی دارای قطرهای ۲۰۰-۵۰ نانومتر است که شبیه قطر فیبرهای کلاژن ماتریکس خارج سلولی[1] (ECM) هستند و یک شرایط مناسب و ایده‌آل را برای ترمیم زخم فراهم می‌کنند (۴).

در سال‌های اخیر، محققان در ساخت انواع پانسمان‌های پزشکی جدید با استفاده از فناوری الکتروریسی پیشرفت چشمگیری داشته‌اند. در این زمینه تحقیقات زیادی بر روی ساخت پانسمان‌های پزشکی با عملکرد ضدباکتری طولانی، ساختار فیزیکی، خواص شیمیایی نانوالیاف و خصوصیات پانسمان‌های تولید شده هومئوستاز، جذب رطوبت، تنفس و غیره انجام شده است (۵).

پلی‌کاپرولاکتون[2] (PCL) پلیمری زیست سازگار و دارای خواص مکانیکی ایده‌آل است که توسط سازمان غذا و داروی آمریکا[3] (FDA) تأیید شده است و به‌طور گسترده در پانسمان‌های پزشکی استفاده می‌شود (۶). در مطالعه‌ای به منظور حل مشکل آب‌گریز بودن پلی کاپرولاکتون، از ترکیب پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌اتیلن گلایکول استفاده شد و این کامپوزیت با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مورد ارزیابی قرار گرفت (۷). امروزه انواع مختلفی از مواد زیستی به‌عنوان بسترهای بالقوه برای تولید داربست‌های زیستی و ترمیم بافت معرفی شده است. یکی از این موارد چیتوزان است که دارای برخی خصوصیات مشابه با گلیکوزآمینوگلیکان و اسید هیالورونیک می‌باشد. چیتوزان مشتقی از گلوکان با واحدهای تکرارشونده کیتین است که به دلیل زیست تخریب پذیری در داخل بدن و زیست سازگاری آن‌ها توجه زیادی را به خود معطوف کرده است. بسته به منبع چیتوزان و روش آماده‌سازی می‌توان در خصوصیات آن تغییراتی ایجاد کرد (۸).

نانوذرات نقره به‌دلیل خواص ضدباکتریایی به یکی از گسترده‌ترین نانومواد در ترمیم زخم‌ها تبدیل شده است. در روش سنتز قدیمی نانوذرات نقره[4] (ANP) از عوامل احیا کننده شیمیایی برای تغییر یون‌های Ag به AgNP استفاده می‌شود که دارای عوارض جانبی نامطلوب هستند. در سال‌های اخیر، توجه ویژه‌ای به روش‌های زیستی برای تولید نانوذرات نقره معطوف شده است. این روش‌ها علاوه بر سادگی در اجرا خطرات ناشی از استفاده از مواد شیمیایی سمی، خطرناک و پرهزینه را کاهش می‌دهند (۹). در میان روش‌های زیستی، گیاهان به دلیل دسترسی آسان و قابلیت استفاده در تولید نانوذرات در مقیاس بزرگ، گزینه‌ای ایده‌آل محسوب می‌شوند. عصاره‌های گیاهی حاوی ترکیبات زیستی متنوعی هستند که می‌توانند یون‌های فلزی را احیا کرده و نانوذرات را سنتز کنند. همچنین، این ترکیبات قادرند به‌عنوان عوامل پوشش‌دهنده و پایدارکننده نانوذرات ایفای نقش کنند (۱۲-۱۰).

کرایزین یک ترکیب فلاونوئیدی است که به‌طور طبیعی در گیاهان، عسل و بره موم یافت می‌شود. این ماده دارای فعالیت‌های فارماکولوژیکی متنوعی از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدسرطانی است. این خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی آن می‌تواند به بهبود شرایط زخم کمک کند. آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب، می‌توانند در فرآیند ترمیم زخم مؤثر باشند (۱۳).

در این مطالعه نانوذرات نقره به روش سبز و با استفاده از فلاونوئید کرایزین سنتز و مورد ارزیابی ساختاری قرار گرفت. به منظور ارزیابی خصوصیات ضدباکتریایی و اثرات ترمیم کنندگی این نانوذرات در داربست نانولیفی پلی‌کاپرولاکتون- چیتوزان بارگذاری شد.

[1] Extra cellular matrix
[2] Polycaprolactone
[3] Food and Drug Administration
[4] Silver nanoparticles

روش تحقیق

سنتز نانوذرات نقره با فلاونوئید کرایزین

مقادیر مختلف محلول کرایزین قطره قطره به نیترات نقره یک میلی‌مولار اضافه و در شرایط تاریکی به مدت ۲۴ ساعت همزده شد. تغییر رنگ محلول واکنش به قهوه‌ای تیره نشان دهنده سنتز نانوذره نقره بود. سپس شستشوی نانوذرات نقره و جداسازی آن‌ها به روش رسوب دادن و با استفاده از سانتریفوژ انجام شد. در هر بار شستشو محلول آبی به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و در مرحله آخر رسوب به دست آمده که حاوی نانوذرات نقره بود، در آون و دمای ۶۰ درجه خشک و در دمای اتاق برای آزمایشات بعدی ذخیره شد.

ارزیابی ساختاری نانوذرات نقره (FTIR, XRD, SEM, DLS)

برای ارزیابی نانوذرات نقره سنتز شده، آنالیزهای UV-Vis[1] ، FESEM[2]، FTIR[3] و XRD[4] و DLS[5] نجام شد. در مطالعه حاضر به منظور تأیید سنتز نانوذرات نقره از آنالیز XRD (Philips PW1800 using CuKa radiation) و UV-Vis استفاده شد. در تست XRD پرتو X در زوایای مختلف ($2\theta = 10^o - 80^o$) به نمونه تابش می‌کند و نمونه با توجه به ساختار کریستالی خود در زوایای خاصی پرتو X را برگشت می‌دهد. با مقایسه نتایج حاصل از آنالیز نمونه با نتایج حاصل از نمونه‌های استاندارد می‌توان ساختار کریستالی نانوذرات را تعیین نمود. همچنین با استفاده از نتایج حاصل از این آنالیز می‌توان اندازه کریستالی نانوذرات را نیز تعیین نمود.

از آنالیز FTIR (PerkinElmer Spectrum TwoTM IR spectrometer; Model L160000U) به منظور بررسی گروه‌های عاملی ترکیبات مختلف استفاده می‌گردد. در این مطالعه از این آنالیز به منظور بررسی گروه‌های عاملی موجود در نانوذرات نقره و کرایزین استفاده شد.

با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (ZEISS Sigma 300 FESEM) می‌توان مورفولوژی و ساختار سطحی یک ماده را مورد بررسی قرار داد. در مطالعه حاضر با استفاده از تصاویر FESEM مورفولوژی سطحی نانوذرات تعیین شد. در این مطالعه همچنین قطر هیدرودینامیکی نانوذرات با استفاده از آنالیز DLS اندازه‌گیری شد.

سنتز داربست پلی‌کاپرولاکتون- چیتوزان (PCL-CS)

برای تهیه داربست پلی‌کاپرولاکتون- چیتوزان از محلول پلی‌کاپرولاکتون ۲۰ درصد و چیتوزان ۱ درصد استفاده شد. محلول‌های پلی‌کاپرولاکتون و چیتوزان با نسبت‌های ۹ به ۱ مخلوط و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق همزده شدند. محلول الکتروریسی در یک سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری با اندازه سوزن ۱۸G ریخته و در دستگاه الکتروریسی با تنظیمات نرخ تغذیه یک میلی‌لیتر در ساعت، فاصله نوک سوزن تا صفحه جمع‌کننده ۱۵ سانتی‌متر، ولتاژ ۹/۵ کیلوولت و دور استوانه ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد و نانوالیاف مورد نظر ریسیده و در یخچال قرار داده شدند.

ارزیابی ساختاری داربست (FESEM)

مورفولوژی نانوالیاف PCL-CS[6] با میکروسکوپ الکترونی در ولتاژ افزایشی ۱۰ کیلوولت مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی اثرات آنتی‌باکتریال داربست

به منظور ارزیابی اثرات ضدمیکروبی نانوالیاف حامل نانوذرات نقره کرایزین از محیط کشت مایع LB و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد. ابتدا باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به چگالی نوری (OD) ۰/۳ انکوبه شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری به ۲۹۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع LB براث در میکروتیوب‌های ۵ میلی‌لیتری اضافه شد. در این مرحله میکروتیوب حاوی باکتری بدون نانوالیاف به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. در مرحله بعد ۲۰ میلی‌گرم از نانوالیاف‌های استریل شده با اشعه فرابنفش شامل

[1] UV-Visible spectrophotometry
[2] Field emission scanning electron microscopy
[3] Fourier-transform infrared spectroscopy
[4] X-ray diffraction analysis
[5] Dynamic light scattering
[6] Polycaprolactone - Chitosan

نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون- چیتوزان و نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون- چیتوزان- نانوذرات نقره اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه انکوبه شد. پس از انکوباسیون و رقت‌سازی گروه‌ها ۱۰ میکرولیتر از رقت‌ها روی محیط کشت آگار کشت داده و به مدت ۱۷ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند. پس از انکوباسیون شمارش کلنی‌ها انجام شده وCFU طبق فرمول زیر محاسبه شد (۱۴).

مقدار کشت شده در پلیت جامد × تعداد کلنی شمارش شده × عکس رقت = CFU/ml

مطالعه فاز حیوانی

در مطالعه حاضر تعداد ۲۷ موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار تهیه شد. زخم‌های ایجاد شده در حیوانات در روزهای سه، هفت و چهارده از لحاظ قطر ناحیه زخم و هیستوپاتولوژی بررسی شدند (۱۵). در طول دوره مطالعه، حیوانات دسترسی لازم و کافی به آب و غذای استاندارد و بهداشتی داشتند و در شرایط نوری-رطوبتی مناسب و در قفس‌های استاندارد نگهداری شدند. مطالعه تحت نظر کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بیرجند انجام شد. گروه‌ها در این تحقیق شامل گروه کنترل منفی (n=۹)، گروه داربست (PCL-CS) (n=۹) و گروه داربست/ نانوذره (PCL-Cs-Ch[1]) (n=۹) بود.

روش ایجاد زخم

حیوانات ۱۵ دقیقه پس از انتقال به اتاق عمل و پیش بیهوشی به صورت داخل صفاقی زایلازین (۲ میلی گرم در کیلوگرم) و کتامین (۶۰ میلی گرم در کیلوگرم) تحت بیهوشی عمومی قرار گرفتند. به‌منظور ایجاد زخم در پوست رت‌ها، ابتدا محل ایجاد زخم واقع در پشت حیوان نزدیک ستون فقرات، کاملاً تراشیده و سپس توسط محلول بتادین ۱۰ درصد شستشو شد. زخم های دایره‌ای شکل با قطر ده میلی‌متر به صورت تجربی ایجاد شدند.

اندازه‌گیری قطر زخم

قطر ناحیه زخم با استفاده از کولیس دیجیتال در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ اندازه‌گیری شد و از تمام نمونه‌ها عکس‌برداری صورت گرفت.

مطالعه هیستوپاتولوژیک

نمونه‌های پوستی در فرمالین ۱۰ درصد پایدار شدند. سپس مراحل مختلف آماده‌سازی بافت انجام شده و از نمونه‌ها به روش معمول قالب‌های پارافینی تهیه شد. سپس مقاطعی به ضخامت ۵ میکرومتر به وسیله میکروتوم برش خورده و با هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد مطالعه و آنالیز قرار گرفت. در هیستوپاتولوژی مقاطع عرضی پوست مورد بررسی قرار گرفته و تعداد سلول‌های التهابی و رگ‌های خونی مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

در مطالعه حاضر برای توصیف داده‌های کمی از میانگین و انحراف معیار استفاده شد و نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنف بررسی گردید. برای مقایسه متغیرهای پارامتریک از آزمون ANOVA و در صورت نیاز تست تعقیبی Tukey و برای متغیرهای ناپارامتریک از آزمون کروسکال-والیس استفاده شد. در تمامی آزمون‌ها سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد (P<۰/۰۵) در این مطالعه تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ انجام شد.

یافته‌ها

سنتز نانوذرات نقره با فلاونوئید کرایزین

در مطالعه حاضر نانوذرات نقره با استفاده از محلول کرایزین ساخته شد. تشکیل نانوذره نقره با تغییر رنگ از زرد به قهوه‌ای تیره در محلول تأیید شد. تغییر رنگ یک شاخص اولیه و قابل توجه است و ارتباط مستقیمی با موفقیت سنتز AgNPs دارد. سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره کرایزین با استفاده از طیف‌سنجی UV-vis بررسی شد. تجزیه و تحلیل طیف UV-vis سنتز بیوژنیک نانوذرات نقره با یک پیک مشخصه رزونانس پلاسمون سطحی[2] (SPR) در حدود ۴۴۰ نانومتر را تأیید کرد. همان‌طور که در شکل

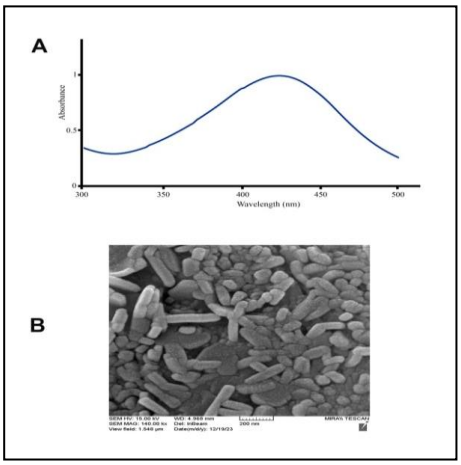
[1] Polycaprolactone - Chrysene

[2] Surface Plasmon Resonance

۱ A نشان داده شده است، یک پیک متمایز در محدوده ۴۳۰-۴۵۰ نانومتر مشاهده شد که مربوط به SPR نانوذرات نانوذرات بیوسنتز شده است و تشکیل نانوذرات نقره را تأیید می‌کند.

DLS برای اندازه‌گیری قطر هیدرودینامیکی نانومواد بیوسنتز شده انجام شد. تجزیه و تحلیل DLS نسبت به تغییرات ضریب شکست محیط اطراف ذرات، تجمع نانوذرات و جذب ترکیبات (فلاونوئیدها، پلی‌فنول‌ها)، روی سطح نانوذرات نقره بسیار حساس است. اندازه متوسط نانوذرات نقره از کرایزین ۱۵± ۱۰۱ نانومتر بود.

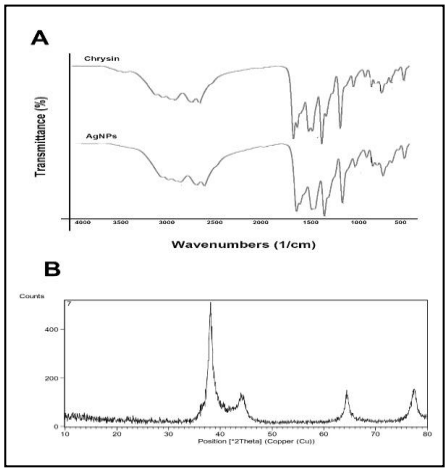
خصوصیات مورفولوژیکی نانوذرات نقره سنتز شده از کرایزین با استفاده از FESEM انجام شد. تصاویر FESEM نشان داد که بیشتر نانوذرات نقره به وضوح با اندازه‌های ۶۰ تا ۷۰ نانومتر هستند (شکل ۱ B). اندازه AgNPs در آنالیز DLS بزرگتر از آنالیز FESEM بود. تفاوت در اندازه نانوذرات بین روش‌های DLS و میکروسکوپ الکترونی در مطالعات دیگر گزارش شده است.



شکل ۱- طیف جذب uv-vis نانوذرات نقره سنتز شده با کرایزین (A) و آنالیز FESEM از نانوذرات نقره سنتز شده با کرایزین (B).

طیف مادون قرمز کرایزین طیف‌های برجسته‌ای را در ۳۰۸۰، ۳۰۰۹، ۲۹۴۵، ۱۶۵۵ و ۱۶۱۰ سانتی‌متر نشان می‌دهد (شکل۲ A). نوارهای قوی بین ۳۵۰۰-۳۰۰۰ سانتی‌متر مرتبط با کشش O-H است. درحالی‌که طیف‌های ۱۶۵۵ و ۱۶۱۰ سانتی‌متر مرتبط با C=O و C=C هستند. خصوصیات ساختاری IR در نانوذرات سنتز شده به وضوح نشان می‌دهد که گروه‌های عاملی کرایزین به‌طور فعال در هماهنگی با یون‌های فلزی شرکت می‌کنند. تغییرات در شدت انتقال در ۳۵۰۰-۳۰۰۰ سانتی‌متر در نانوذرات نقره سنتز شده با کرایزین، حالت‌های کشش متقارن و نامتقارن O-H پس از کاهش را نشان می‌دهد. این تفاوت در شدت حاکی از از دست دادن یک گروه O-H در طول هماهنگی با یون‌های فلزی است.

بررسی های XRD، پیک‌هایی در حدود ۳۸، ۴۶، ۶۴ و ۷۷ درجه را نشان می‌دهد که حاکی از تشکیل نانوذرات نقره می‌باشد (شکل۲ B).



شکل ۲- طیف FTIR (A) و XRD (B) نانوذرات نقره سنتز شده با کرایزین

ارزیابی ساختاری داربست (FESEM)

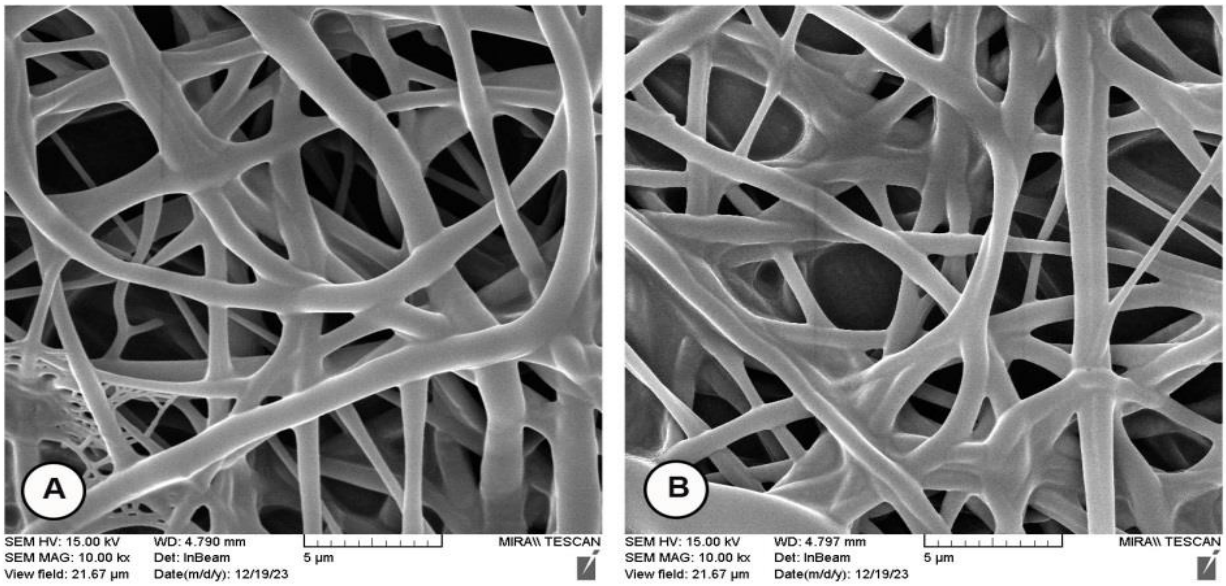
تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (FESEM) از نانوالیاف PCL-CS و PCL-CS-Ch در شکل ۳ نشان داده شده است. از تصاویر FESEM می‌توان فهمید که نانوالیاف در یک ساختار شبکه‌ای ریسیده شده است.

فعالیت ضدباکتریایی نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون

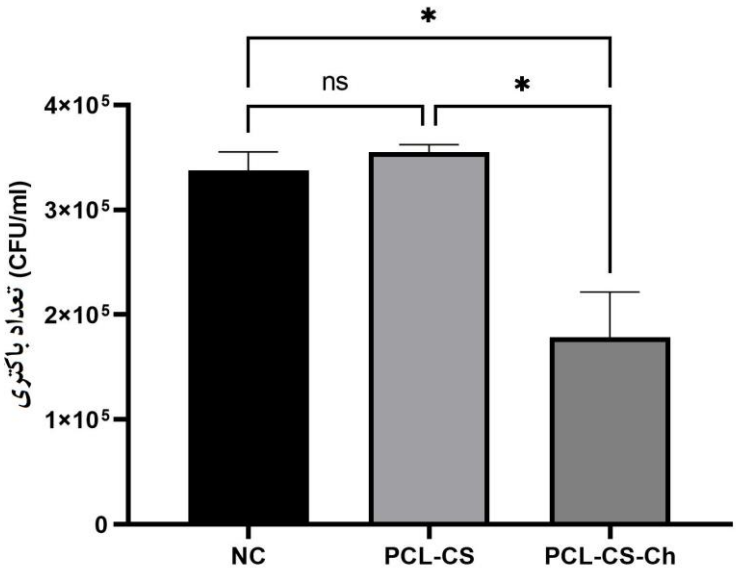
روش استاندارد رقت براث

اثر ضدباکتریایی گروه‌های PCL-CS و PCL-CS-Ch همراه گروه کنترل با روش استاندارد رقت براث تعیین شد. نتایج نشان داد که گروه نانوالیاف حاوی نانوذرات کرایزین در مقایسه با گروه‌های نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون-چیتوزان و کنترل منفی به‌طور

معنی‌داری موجب مهار رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شدند (P<۰/۰۵) (نمودار ۱).



شکل ۳- تصاویر SEM **نانوالیاف** PCL-CS (A) **و** PCL-CS-Ch (B)



نمودار ۱- فعالیت ضدباکتریایی گروه‌های داربست (PCL-CS) **و داربست نانوذره** (PCL-CS-Ch) **و کنترل منفی** (NC) **در برابر** *S. aureus*

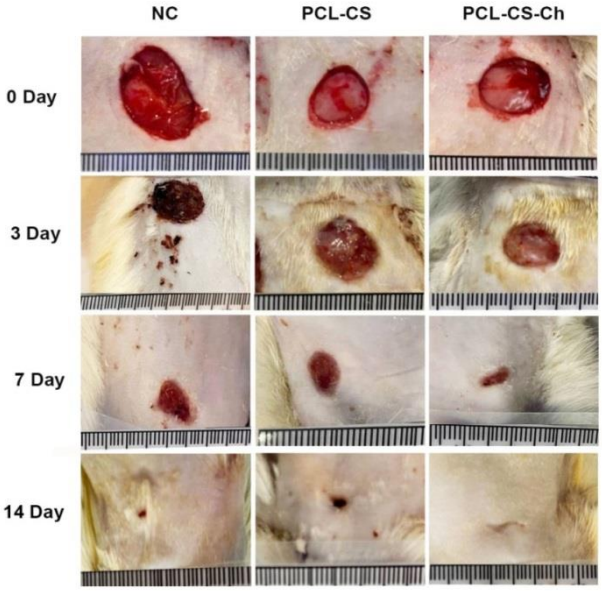
مطالعه فاز حیوانی

اندازه‌گیری قطر زخم

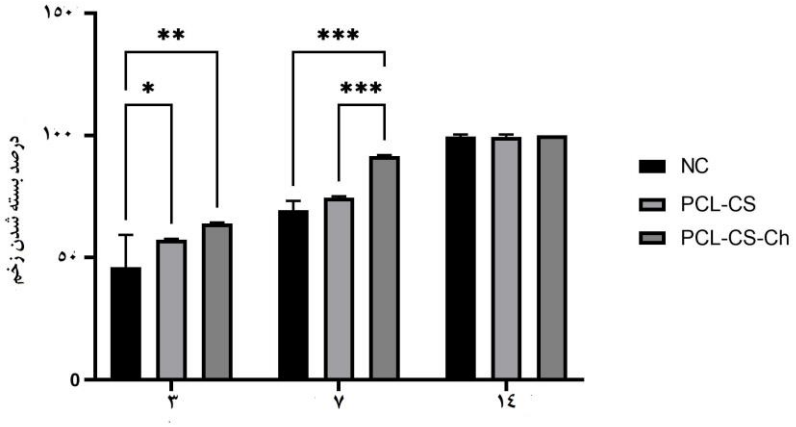
بسته شدن زخم هر گروه در روزهای سوم، هفتم و چهاردهم پس از درمان محاسبه شد (شکل ۴) (نمودار ۲). بر اساس نتایج، درصد بسته شدن زخم در گروه‌های پلی کاپرولاکتون – چیتوزان – نانوذرات کرایزین در روز ۳ و ۷ پس از درمان به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل منفی بود (P<۰/۰۵). نرخ بسته شدن زخم در گروه درمان و کنترل منفی به ترتیب۶۳/۹۵±۰/۴۹ و ۴۶/۰۶±۱۳/۲۳ درصد در روز ۳ پس از درمان بود (P<۰/۰۵). همچنین در روز ۷ پس از درمان، درصد بسته شدن زخم در گروه پلی‌کاپرولاکتون – چیتوزان – نانوذرات کرایزین و کنترل منفی به ترتیب ۸۵/۷±۳/۰۵ و ۶۹/۴±۳/۸ بود (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد در روز ۱۴ پس از درمان در تمام گروه‌ها زخم‌ها به‌طور کامل بسته شده بودند.

ارزیابی‌های هیستوپاتولوژیک

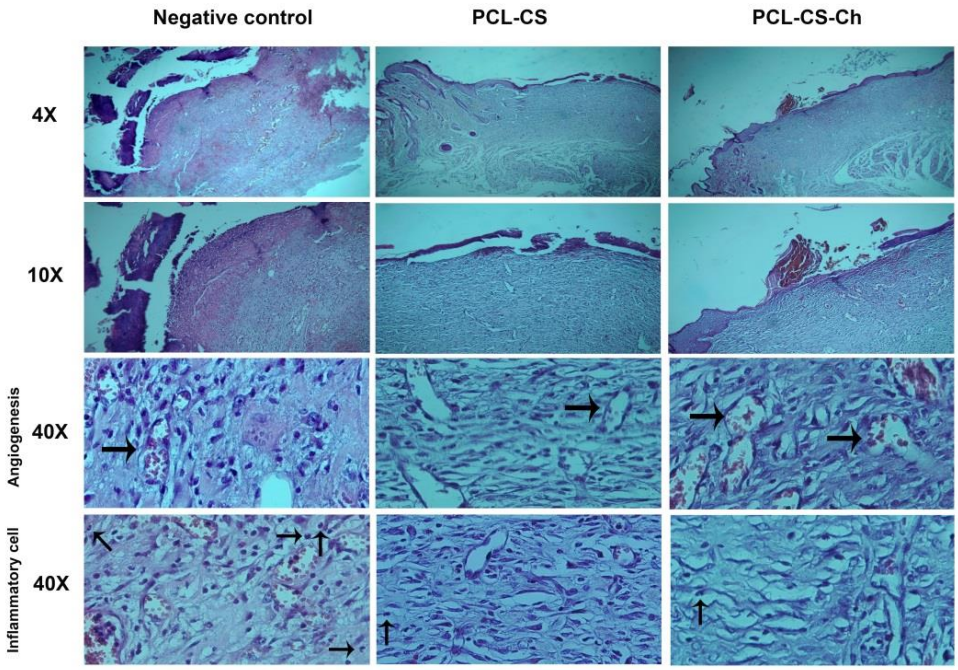
شکل ۵ و ۶ نتایج ارزیابی‌های پاتولوژیک را در روزهای ۳ و ۷ پس از درمان نشان می‌دهند. بر اساس این یافته‌ها، در گروه کنترل منفی علائمی از شروع اپیتلیزاسیون از اطراف زخم مشاهده نشد؛ درحالی‌که در گروه‌های پلی‌کاپرولاکتون – چیتوزان و پلی کاپرولاکتون – چیتوزان – نانوذرات نقره کرایزین شروع اپیتلیزاسیون از اطراف زخم مشاهده شد.



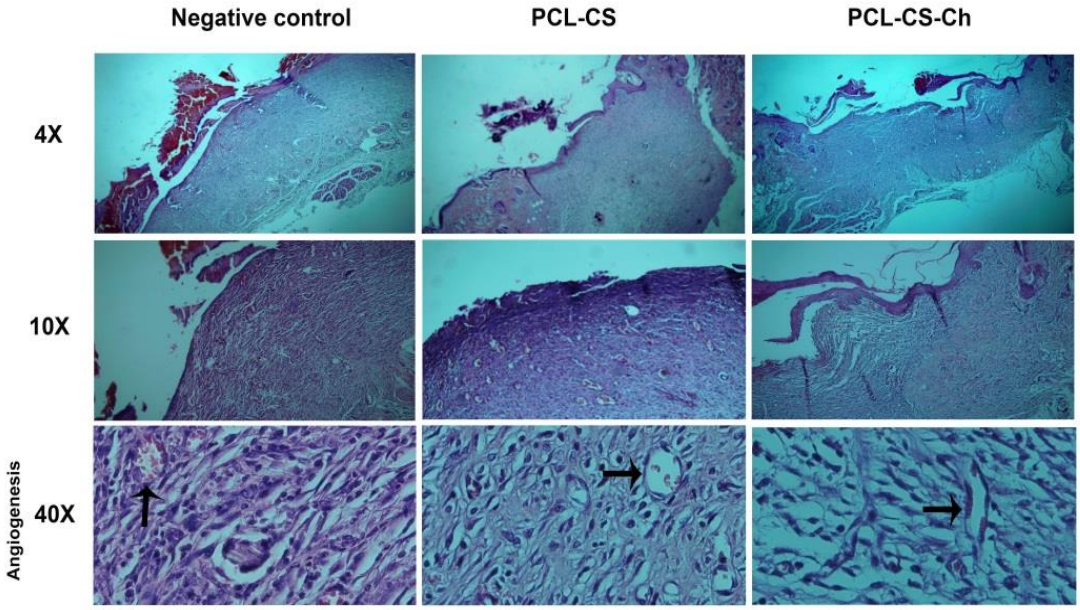
شکل ٤- تصاویر ماکروسکوپیک تأثیر نانوذرات نقره سبز سنتز شده با کرایزین در موش صحرایی



نمودار ۲- درصد بسته شدن زخم تحت تأثیر داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون-چیتوزان (PCL-CS)، پلی کاپرولاکتون-چیتوزان-نانوذرات نقره (PCL-CS-Ch) و NC : کنترل منفی. (داده‌ها به صورت میانگین به همراه انحراف معیار بیان شده‌اند، سطح معنی‌داری به صورت *، ** و *** نمایش داده شد که به معنای *: P<۰/۰۵، **: P<۰/۰۱، ***: P<۰/۰۰۱ می‌باشد).



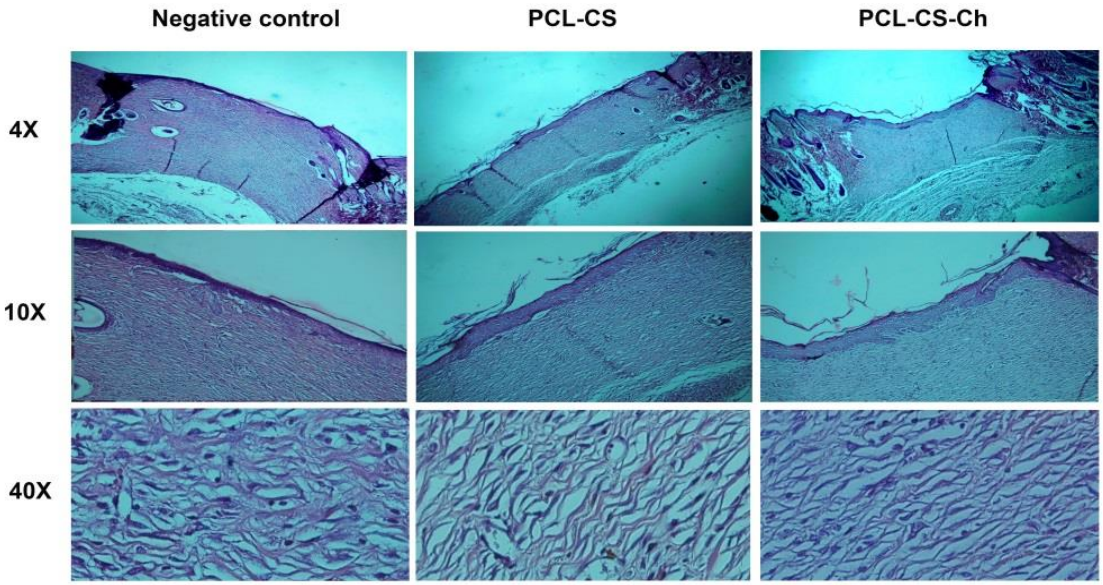
شکل ۵- تصاویر هیستوپاتولوژیک زخم‌های درمان شده با پلی کاپرولاکتون-چیتوزان (PCL-CS)، پلی کاپرولاکتون-چیتوزان-نانوذرات نقره (PCL-CS-Ch) و کنترل منفی در روز ۳ پس از درمان. فلش در قسمت Angiogenesis نشان دهنده رگ های خونی و در قسمت Inflammatory cell نشان دهنده وجود نوتروفیل می باشد.



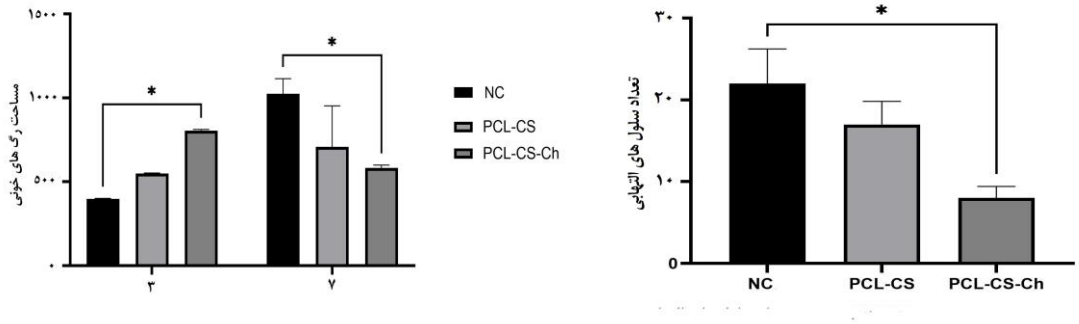
شکل ٦- تصاویر هیستوپاتولوژیک زخم‌های درمان شده با پلی‌کاپرولاکتون-چیتوزان (PCL-CS)، پلی‌کاپرولاکتون-چیتوزان-نانوذرات نقره (PCL-CS-Ch) و کنترل منفی در روز ۷ پس از درمان

در روز چهارده پس از درمان نیز در هر سه گروه پلی‌کاپرولاکتون - چیتوزان و پلی‌کاپرولاکتون – چیتوزان – نانوذرات نقره کرایزین و کنترل منفی سطح زخم با اپیدرم پوشانده شده است که در گروه پلی‌کاپرولاکتون – چیتوزان – نانوذرات نقره کرایزین ضخامت اپیدرم در مقایسه با دو گروه دیگر بیشتر می‌باشد و دارای فرم بالغ‌تری می‌باشد (شکل ۷).

نتایج بررسی رگ‌زایی نشان داد که تعداد رگ‌های خونی در گروه پلی‌کاپرولاکتون – چیتوزان – نانوذرات نقره کرایزین در مقایسه با گروه کنترل منفی در روز ۳ پس از درمان به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. همچنین تعداد سلول‌های التهابی در گروه پلی‌کاپرولاکتون – چیتوزان – نانوذرات نقره کرایزین در مقایسه با گروه کنترل منفی در روز ۳ پس از درمان به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است (نمودار ۳).



شکل ۷- تصاویر هیستوپاتولوژیک زخم‌های درمان شده با پلی‌کاپرولاکتون-چیتوزان (PCL-CS)، پلی‌کاپرولاکتون-چیتوزان-نانوذرات نقره (PCL-CS-Ch) و کنترل منفی در روز ۱٤ پس از درمان



نمودار ۳- نتایج حاصل از مساحت رگ‌های خونی و تعداد سلول‌های التهابی در روزهای ۳ و ۷ پس از درمان (داده‌ها به صورت میانگین به همراه انحراف معیار بیان شده‌اند، سطح معنی‌داری نسبت به گروه کنترل منفی به صورت * نمایش داده شد که به معنای $P<۰/۰۵$ می‌باشد).

بحث

امروزه پانسمان‌های پزشکی بر پایه نانوالیاف الکتروریسی‌شده به‌دلیل ایجاد یک شرایط ایده‌آل برای ترمیم زخم به‌عنوان یکی از زمینه‌های تحقیقاتی در تولید پانسمان‌های پزشکی تبدیل شده است (۳). پلی‌کاپرولاکتون نیز به‌عنوان پلیمری زیست‌سازگار مورد تأیید سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) قرار گرفته و به‌طور گسترده در پانسمان‌های پزشکی استفاده می‌شود (۶). بدین‌ترتیب این مطالعه با هدف طراحی و کاربرد داربست پلی‌کاپرولاکتون-چیتوزان حاوی نانوذرات نقره سبز سنتزشده با فلاونوئید کرایزین در ترمیم زخم‌های تجربی ایجادشده در موش صحرایی صورت گرفت. در این مطالعه به‌منظور افزایش خصوصیات ساختاری و ترمیمی پلی‌کاپرولاکتون از ترکیب پلی‌کاپرولاکتون و چیتوزان استفاده شد. هم‌چنین استفاده از نانوذرات نقره سنتزشده با فلاونوئید کرایزین به‌عنوان ترکیبی ضدباکتری و با قابلیت ترمیم‌کنندگی این داربست می‌تواند نقش مؤثری در بهبود زخم باشد.

سنتز سبز نانوذرات در مقایسه با سایر روش‌های سنتز نانوذرات نقره، روش کارآمدتری است. گیاهان به عنوان منابع ارزشمندی از اجزای مختلف و مواد بیوشیمیایی هستند که می‌توانند به عنوان عوامل تثبیت کننده و کاهش دهنده برای سنتز نانوذرات سبز عمل کنند. روش‌های به کار رفته برای سنتز سبز سازگار با محیط‌زیست، غیرسمی، مقرون‌به‌صرفه هستند و در مقایسه با رویکردهای بیولوژیکی، فیزیکی و شیمیایی پایداری بیشتری ارائه می‌دهند (۱۶). در این مطالعه نانوذرات نقره با استفاده از محلول کرایزین سنتز شد. یکی از شاخص‌های سریع و اولیه موفقیت سنتز نانوذرات، تغییر رنگ مخلوط واکنش از زرد به قهوه‌ای تیره است و در بسیاری از مطالعات به عنوان نشانه‌ای کلیدی برای سنتز نانوذرات نقره به روش سبز گزارش شده است (۱۷). بنابراین این تغییر رنگ، تأییدی اولیه و سریع بر تشکیل نانوذرات بود.

وجود یک پیک مشخص در طیف جذب UV-Vis، معمولاً در محدوده ۴۳۰ تا ۴۵۰ نانومتر، تأیید دیگری بر تشکیل نانوذرات نقره است. این باند ناشی از نوسان جمعی الکترون‌های رسانش در سطح نانوذره هنگام برانگیختگی با نور است و موقعیت آن به اندازه، شکل و محیط اطراف نانوذره حساس است. مشاهده پیک در حدود ۴۴۰ نانومتر در مطالعه حاضر، کاملاً با گزارش‌های پیشین درباره سنتز زیستی نانوذرات نقره مطابقت دارد و نشان‌دهنده احیای موفق یون‌های نقره و پایدارسازی آن توسط مواد فعال زیستی موجود در کرایزین است (۱۸).

در این مطالعه تعیین اندازه هیدرودینامیکی نانوذرات با روش DLS انجام شد و میانگین اندازه‌ای معادل ۱۵±۱۰۱ نانومتر را نشان داد. روش DLS به وجود عوامل آلی پایدارکننده (مانند فلاونوئیدها و پلی‌فنول‌ها)، تجمع ذرات و ضریب شکست محیط بسیار حساس است و معمولاً اندازه‌های بزرگ‌تری نسبت به میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد. در مقابل، تصاویر FESEM اندازه واقعی و در محدوده ۶۰ تا ۷۰ نانومتر را نشان داد. این اختلاف اندازه بین دو روش، پدیده‌ای شناخته‌شده است که به دلیل وجود لایه آب و ترکیبات آلی در اندازه‌گیری DLS و عدم وجود آن‌ها در تصاویر میکروسکوپی رخ می‌دهد.

در این پژوهش از ترکیب پلی‌کاپرولاکتون و چیتوزان به‌منظور سنتز نانوالیاف استفاده شد. پلی‌کاپرولاکتون به دلیل ماهیت آب‌گریزی خود به‌تنهایی گزینه مناسبی برای تهیه پانسمان نیست و در مطالعات بسیاری از ترکیب پلی‌کاپرولاکتون و سایر پلیمرها به منظور بهبود خواص فیزیکی و زیستی آن استفاده می‌شود (۱۹). Liao و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که خصوصیات فیزیکی و زیستی پلی‌کاپرولاکتون در ترکیب با استات سلولز و دکستران بهبود می‌یابد (۹). الیاف پلی‌کاپرولاکتون در ترکیب با سایر پلیمرها می‌توانند جایگزینی برای بافت پوست و به عنوان پانسمان زخم باشند. این داربست قابلیت ترکیب‌شدن با سایر ترکیبات فعال زیستی از قبیل فاکتورهای رشد، نانوذرات، داروهای ضدمیکروبی و نیز داروهای ترمیم زخم را داراست. از طرف دیگر ساختار الکتروریسی‌شده پلی‌کاپرولاکتون قابلیت ممانعت از نفوذ میکروب‌ها به‌عنوان یک سد فیزیکی را دارد که به‌خودی‌خود از عفونت در محل پانسمان جلوگیری می‌کند (۲۰،۲۱).

در این مطالعه از نانوذرات کرایزین به‌دلیل خواص آنتی‌باکتریال و ترمیم‌کنندگی آن استفاده شده است. نتایج نشان داد که استفاده از

نانوذرات کرایزین در نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون – چیتوزان می‌تواند به‌طور قابل توجهی موجب مهار رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شود. در مطالعه ایی Lal و Gupta (۲۰۲۴) به بررسی نانوذرات نقره ساخته شده با استفاده از کرایزین و اثرات ضدبیوفیلمی آن‌ها بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده با کرایزین دارای فعالیت ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی قابل توجهی علیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا هستند. این نانوذرات می‌توانند با نفوذ به ساختار بیوفیلم و ایجاد اختلال در عملکرد سلول‌های باکتریایی، رشد و گسترش باکتری را مهار کند. همچنین، این ترکیبات با کاهش چسبندگی باکتری‌ها و تخریب ماتریکس بیوفیلم، به بهبود اثرات درمانی کمک می‌کنند و پتانسیل بالایی برای استفاده در مقابله با عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند (۲۲). نانوذرات نقره به‌عنوان موادی با خاصیت ضدباکتریایی مطرح شده‌اند. این نانوذرات با اتصال به سطح باکتری باعث می‌شوند غشای سلولی باکتری ناپایدار و نفوذپذیرتر شود. این تغییر باعث کاهش انرژی (ATP) سلولی باکتری می‌شود و در نتیجه متابولیسم باکتری مختل شده و می‌میرد. علاوه بر این، نانوذرات نقره می‌توانند به پروتئین‌های موجود روی سطح و داخل سلول باکتری متصل شوند و عملکرد طبیعی آن‌ها را از بین ببرند. این ذرات می‌توانند وارد سلول باکتری شوند و آنزیم‌های حیاتی را غیرفعال کرده و با تولید ترکیباتی مثل هیدروژن پراکسید، استرس اکسیداتیو ایجاد کرده و موجب تخریب سلول و مرگ باکتری شوند (۲۲). مکانیسم اثر ضدباکتری نانوذرات نقره شامل چندین فرآیند است که به اثربخشی آن‌ها در برابر میکروارگانیسم ها کمک می‌کند. یکی از مکانیسم‌های اصلی، برهمکنش بین نانوذرات نقره و دیواره سلولی باکتری است. AgNP ها می‌توانند به دیواره سلولی بچسبند و در نتیجه باعث آسیب و اختلال شوند. این تعامل یکپارچگی ساختاری دیواره سلولی را مختل می‌کند و منجر به نشت اجزای سلولی و در نهایت مرگ سلولی می‌شود. علاوه بر این، نانوذرات نقره می‌توانند به غشای سلولی باکتری نفوذ کرده و وارد سیتوپلاسم شوند و با فرآیندهای سلولی و زیست مولکول های متعدد تداخل کنند و در نتیجه منجر به مهار فعالیت‌های متابولیکی و آنزیمی ضروری می‌شوند. این اختلال از رشد و تکثیر باکتری‌ها جلوگیری می‌کند. علاوه بر این، AgNP ها دارای خواص ذاتی هستند که آن‌ها را قادر می‌سازد تا در تعامل با سلول‌های باکتری، گونه‌های فعال اکسیژن[1] (ROS) تولید کنند. گونه‌های فعال اکسیژن مانند رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن، مولکول‌های بسیار واکنش‌پذیری هستند که می‌توانند باعث استرس اکسیداتیو و آسیب به سلول‌های باکتریایی شوند. تولید ROS توسط نانوذرات نقره با القای آسیب اکسیداتیو سلولی و اختلال بیشتر در متابولیسم باکتری به اثر ضدباکتریایی آن کمک می‌کند (۲۳). نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات نقره علاوه بر مهار رشد باکتری‌ها و با اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به‌طور مؤثری موجب مهار بیش از حد واکنش های التهابی و در نهایت افزایش روند ترمیم زخم شود.

نتایج مطالعات حیوانی در این مطالعه نشان داد که استفاده از داربست پلی‌کاپرولاکتون–چیتوزان–نانوذرات کرایزین می‌تواند به‌طور مؤثری موجب کاهش اندازه زخم، کاهش دوره اپیتلیزاسیون مجدد و بهبود فاکتورهای ترمیمی شود. در مطالعه ای که توسط Kaparekar و همکاران انجام شد، ارزیابی‌های *in-vitro* و *in-vivo* نشان دادند که ترکیب آلژینات–چیتوزان بارگذاری‌شده با کرایزین می‌تواند به‌طور قابل توجهی موجب بهبود زخم شود. بدین ترتیب این ترکیب قادر به افزایش سرعت بهبود زخم و کاهش طول دوره اپیتلیزاسیون مجدد است. هم‌چنین این ترکیب می‌تواند محتوای هیدروکسی پرولین و هگزوزآمین را در بافت گرانولاسیون افزایش دهد. بدین ترتیب این مطالعه بیان می‌کند که ترکیب آلژینات–چیتوزان بارگذاری‌شده با کرایزین قابلیت کاربرد در زمینه بهبود زخم و استفاده در پانسمان‌های نوین زخم را دارد (۲۴). هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر محمدی و همکاران گزارش کردند که نانوفیبرهای بارگذاری‌شده با کرایزین خواص ضدالتهابی در مراحل مختلف ترمیم زخم از طریق تأثیرگذاری بر بیان ژن‌های مربوط به فاکتورهای IL-6[2]، MMP-2[3]، TIMP-1[4]، TIMP-2[5] و iNOS[1] دارد (۲۵).

[1] Reactive Oxygen Species
[2] Interleukin-6
[3] Matrix metalloproteinase 2
[4] Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1
[5] Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2

در مطالعه حاضر درمان زخم‌ها با استفاده از داربست پلی‌کاپرولاکتون-چیتوزان-نانوذرات کرایزین به‌طور قابل توجهی تعداد سلول‌های التهابی را در فرایند ترمیم کاهش داد که می‌تواند نشان دهنده نقش مؤثر این داربست در کاهش عفونت باشد. در فرآیند ترمیم زخم، کاهش سلول‌های التهابی معمولاً نشان‌دهنده کنترل موفقیت‌آمیز عفونت و انتقال به مراحل بعدی بهبود است. سلول‌های التهابی مانند نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها در مرحله اولیه التهاب، با فاگوسیتوز باکتری‌ها و مواد زائد، عفونت را مهار می‌کنند. وقتی عفونت کاهش می‌یابد، نیاز به حضور این سلول‌ها کمتر می‌شود و بدن به صورت خودکار ترشح سیتوکین‌های ضدالتهابی را افزایش می‌دهد تا التهاب را محدود کند. از طرف دیگر با کاهش سلول‌های التهابی محیط مناسبی برای رشد بافت‌های جدید فراهم می‌شود و فرایند ترمیم وارد مرحله تکثیر می‌شود که در آن فیبروبلاست‌ها شروع به تولید کلاژن می‌کنند و رگ‌های خونی جدید شکل می‌گیرند و افزایش تعداد رگ‌های خونی در روز ۷ در این مطالعه تأیید کننده این پدیده است (۲۶،۲۷).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که داربست پلی‌کاپرولاکتون-چیتوزان-نانوذرات نقره سنتز شده با کرایزین، علاوه بر داشتن خصوصیات مکانیکی و مورفولوژیکی مناسب باعث کاهش رشد باکتری‌ها می‌شوند و در نتیجه خطر عفونت در محل زخم یا آسیب را کاهش می‌دهند. به‌نظر می‌رسد این ترکیب در داربست‌ها می‌توانند به‌عنوان سیستم‌های پیشرفته برای مهندسی بافت پوست و درمان زخم‌ها، به‌دلیل ترکیب خواص مکانیکی، زیستی و ضدعفونی‌کننده، گزینه‌ای مؤثر و قابل اعتماد به شمار آیند.

تقدیر و تشکّر

این مقاله حاصل پایان‌نامه تحت عنوان "طراحی و کاربرد داربست پلی کاپرولاکتون- چیتوزان حاوی نانوذرات نقره سنتز شده با فلاونوئید کرایزین در ترمیم زخم های تجربی ایجاد شده در موش صحرایی"، در مقطع پزشکی عمومی در سال ۱۴۰۲ با کد پروپوزال ۴۵۶۶۳۶ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی بیرجند اجرا شده است.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر توسط شورای پژوهشی و کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند (شناسه تأیید: IR.BUMS.REC.1401.011) تأیید شد. تمامی مراحل کار با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس مصوبات کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بیرجند بوده است.

حمایت مالی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان این مقاله، سهم برابری در انجام مراحل آزمایشگاهی و نگارش مقاله داشته اند.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

[1] Inducible Nitric Oxide Synthase

منابع

1. Yu B, Kang S-Y, Akthakul A, Ramadurai N, Pilkenton M, Patel A, et al. An elastic second skin. Nat Mater. 2016;15(8):911-8. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27159017/ PMID: 27159017
2. Lee EJ, Huh BK, Kim SN, Lee JY, Park CG, Mikos AG, et al. Application of materials as medical devices with localized drug delivery capabilities for enhanced wound repair. Prog Mater Sci. 2017;89:392-410. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29129946/ PMCID: PMC5679315
3. Wang Y, Li P, Xiang P, Lu J, Yuan J, Shen J. Electrospun polyurethane/keratin/AgNP biocomposite mats for biocompatible and antibacterial wound dressings. J Mater Chem B. 2016; 4(4): 635-48. DOI: https://doi.org/10.1039/C5TB02358K URL: https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/tb/c5tb02358k
4. Fischer SN, Johnson JK, Baran CP, Newland CA, Marsh CB, Lannutti JJ. Organ-derived coatings on electrospun nanofibers as ex vivo microenvironments. Biomaterials. 2011; 32(2): 538-46. PMID: 20875916 PMCID: PMC3671867 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.104
5. Dhand C, Venkatesh M, Barathi VA, Harini S, Bairagi S, Leng EGT, et al. Bio-inspired crosslinking and matrix-drug interactions for advanced wound dressings with long-term antimicrobial activity. Biomater. 2017; 138: 153-68. PMID: 28578293 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.05.043
6. Si Y, Yu J, Tang X, Ge J, Ding B. Ultralight nanofibre-assembled cellular aerogels with superelasticity and multifunctionality.Nat Commun. 2014; 5(1): 1-9. PMID: 25512095 DOI: 10.1038/ncomms6802
7. Si Y, Zhang Z, Wu W, Fu Q, Huang K, Nitin N, et al. Daylight-driven rechargeable antibacterial and antiviral nanofibrous membranes for bioprotective applications. Sci Adv. 2018; 4(3): eaar5931. PMID: 29556532 PMCID: PMC5856488 DOI: 10.1126/sciadv.aar5931
8. Yu H, Chen X, Cai J, Ye D, Wu Y, Fan L, et al. Novel porous three-dimensional nanofibrous scaffolds for accelerating wound healing. Chem Eng J. 2019; 369: 253-62. URL: https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.03.091
9. Liao N, Unnithan AR, Joshi MK, Tiwari AP, Hong ST, Park C-H, et al. Electrospun bioactive poly (ε-caprolactone)–cellulose acetate–dextran antibacterial composite mats for wound dressing applications. Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 2015; 469: 194-201. DOI:10.1016/j.colsurfa.2015.01.022
10. Rodríguez-Luis OE, Hernandez-Delgadillo R, Sánchez-Nájera RI, Martínez-Castañón GA, Niño-Martínez N, Navarro MdCS, et al. Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Bactericidal and Antimycotic Activities against Oral Microbes. J Nanomater. 2016; 2016: 9204573. URL: https://doi.org/10.1155/2016/9204573
11. Panchatcharam, P. Recent Advancements in the Green Synthesis of Bioactive Metallic Nanoparticles from Biological Entities and Their Biomedical Applications. In: Bhardwaj AK, Srivastav AL, Rai S. (eds) Biogenic Wastes-Enabled Nanomaterial Synthesis. Cham, Springer, 2024. pp: 239-56. https://doi.org/10.1007/978-3-031-59083-2_9
12. Devi L, Kushwaha P, Ansari TM, Kumar A, Rao A. Recent Trends in Biologically Synthesized Metal Nanoparticles and their Biomedical Applications: a Review. Biol Trace Elem. 2024; 202(7): 3383-99. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37878232/
13. Liu L, Mai Y, Liang Y, Zhou X, Chen K. Experimental study on the effect of chrysin on skin injury induced by amiodarone extravasation in rats. Microvasc Res. 2022; 139:104257. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34534572/
14. Zhang Y, Chang M, Bao F, Xing M, Wang E, Xu Q, et al. Multifunctional Zn doped hollow mesoporous silica/polycaprolactone electrospun membranes with enhanced hair follicle regeneration and antibacterial activity for wound healing. Nanoscale. 2019; 28; 11(13): 6315-33. URL: https://doi.org/10.1039/C8NR09818B
15. Soheilifar MH, Dastan D, Masoudi-Khoram N, Keshmiri Neghab H, Nobari S, Tabaie SM, et al. In vitro and in vivo evaluation of the diabetic wound healing properties of Saffron (Crocus Sativus L.) petals. Sci Rep. 2024; 14, 19373. https://doi.org/10.1038/s41598-024-70010-8

16. Mustapha T, Misni N, Ithnin NR, Daskum AM, Unyah NZ. A review on plants and microorganisms mediated synthesis of silver nanoparticles, role of plants metabolites and applications. Int J Environ Res Public Health. 2022; 19(2): 674. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35055505/

17. Mafhala L, Khumalo N, Zikalala NE, Azizi S, Cloete KJ, More GK, et al. Antibacterial and cytotoxicity activity of green synthesized silver nanoparticles using aqueous extract of naartjie (Citrus unshiu) fruit peels. Emerg Contam. 2024; 10(4). 100348. https://doi.org/10.1016/j.emcon.2024.100348

18. Fahim M, Shahzaib A, Nishat N, Jahan A, Bhat TH, Inam A. Green synthesis of silver nanoparticles: A comprehensive review of methods, influencing factors, and applications. JCIS Open. 2024; 16. 100125. URL: https://doi.org/10.1016/j.jciso.2024.100125

19. Mosallanezhad P, Nazockdast H, Ahmadi Z, Rostami A. Fabrication and characterization of polycaprolactone/chitosan nanofibers containing antibacterial agents of curcumin and ZnO nanoparticles for use as wound dressing. Front. Bioeng. Biotechnol. 2022; 10:1027351. URL: https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1027351

20. Joseph B, Augustine R, Kalarikkal N, Thomas S, Seantier B, Grohens Y. Recent advances in electrospun polycaprolactone based scaffolds for wound healing and skin bioengineering applications. Mater Today Commun. 2019; 19: 319-35. https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2019.02.009

21. Zhong S, Zhang Y, Lim C. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2010; 2(5): 510-25. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20607703/

22. Lal AF, Gupta PS. An Exploration of Chrysin Fabricated Silver Nanoparticles as Antibiofilm Agent against Pseudomonas aeruginosa. Indian J. Pharm. Educ. Res. 2024; 58(2s): s429-s435. https://doi.org/10.5530/ijper.58.2s.46

23. Dat NM, Thinh DB, Huong LM, Tinh NT, Linh NTT, Hai ND, et al. Facile synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles-modifed graphene oxide hybrid material: The assessment, utilization, and anti-virus potentiality. Mater Today Chem. 2022; 23: 100738. https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2021.100738

24. Kaparekar PS, Poddar N, Anandasadagopan SK. Fabrication and characterization of Chrysin–a plant polyphenol loaded alginate-chitosan composite for wound healing application. Colloids Surf B Biointerfaces. 2021; 206: 111922. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34157519/

25. Mohammadi Z, Sharif Zak M, Majdi H, Mostafavi E, Barati M, Lotfimehr H, et al. The effect of chrysin–curcumin-loaded nanofibres on the wound-healing process in male rats. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2019; 47(1): 1642-52. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31027431/

26. Eming SA, Wynn TA, Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. Science. 2017; 356(6342): 1026-30. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28596335/

27. Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair. J Leukoc Biol. 2013; 93(6): 875-81. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23505314/