

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 Talvari¹, Effat Alemzadeh², Tahere Farkhondeh³, Esmat Alemzadeh^{4*}, Pouria Mohammadparast⁵, Soroush Mohammadi⁵

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(2): 111-125. [Persian]

DOI <http://doi.org/10.61882/JBUMS.32.2.111>

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-Non Commercial 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.

بررسی اثر داربست پلی کاپرولاکتون - چیتوزان حاوی نانوذرات نقره 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 ضد میکروبی 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 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، زخم‌هایی 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 15 ± 101 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 10.5 ± 8.7 و 8.4 ± 9.6 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، پلی کاپرولاکتون، موش صحرایی، نانوذرات نقره، ترمیم زخم

مجله "تحقیقات پزشکی ترجمانی" ۱۴۰۴؛ ۳۲ (۲): ۱۱۱-۱۲۵.

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 علوم 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 به‌عنوان 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^۱ (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^۲ (PCL) پلیمری زیست سازگار و دارای خواص مکانیکی ایده‌آل است که توسط سازمان غذا و داروی آمریکا^۳ (FDA) تأیید شده است و به‌طور گسترده در پانسمان‌های پزشکی استفاده می‌شود (۶). در مطالعه‌ای به منظور حل مشکل آب‌گریز بودن پلی‌کاپرولاکتون، از ترکیب پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌اتیلن گلاکول 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^۴ (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 (۱۰-۱۲).

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 ترمیم‌کنندگی این نانوذرات در داربست نانولیفی پلی‌کاپرولاکتون-چیتوزان بارگذاری شد.

¹ Extra cellular matrix² Polycaprolactone³ Food and Drug Administration⁴ Silver nanoparticles

روش تحقیق

سنتز نانوذرات نقره با فلاونوئید کرایزین

مقادیر مختلف محلول کرایزین قطره قطره به نیترات نقره یک میلی مولار 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-Vis¹، FESEM²، FTIR³ و XRD⁴ و DLS⁵ انجام شد. در مطالعه حاضر به منظور تأیید سنتز نانوذرات نقره از آنالیز XRD (Philips) (XRD using CuK α radiation and PW1800 using UV-Vis) استفاده شد. در تست XRD پرتو X در زوایای مختلف ($2\theta = 10^\circ - 80^\circ$) 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 (PerkinElmer Spectrum TwoTM IR spectrometer; Model L160000U) FTIR 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.

¹ UV-Visible spectrophotometry² Field emission scanning electron microscopy³ Fourier-transform infrared spectroscopy⁴ X-ray diffraction analysis⁵ Dynamic light scattering

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 پلی کاپرولاتون- چیتوزان (PCL-CS)

برای تهیه داربست پلی کاپرولاتون- چیتوزان از محلول پلی کاپرولاتون ۲۰ درصد و چیتوزان ۱ درصد استفاده شد. محلول‌های پلی کاپرولاتون 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-CS⁶ با میکروسکوپ الکترونی در ولتاژ افزایشی ۱۰ کیلوولت مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی اثرات آنتی‌باکتریال داربست

به منظور ارزیابی اثرات ضد میکروبی 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 برات 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

⁶ Polycaprolactone - Chitosan

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 آئوزین 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 ($P < 0.05$) 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^۲ (SPR) در حدود ۴۴۰ نانومتر را تأیید کرد. همان‌طور که در شکل

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 و CFU طبق فرمول زیر محاسبه شد (۱۴).

مقدار کشت شده در پلیت جامد $\times$ تعداد کلنی شمارش شده $\times$ 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 ($n=9$)، گروه داربست (PCL-CS) ($n=9$) و گروه داربست / نانوذره ($n=9$) (PCL-CS-Ch¹) بود.

روش ایجاد زخم

حیوانات ۱۵ دقیقه پس از انتقال به اتاق عمل و پیش بیهوشی به صورت داخل صفاقی زایلایزین (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. زخم‌های 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

² Surface Plasmon Resonance

¹ Polycaprolactone - Chrysene

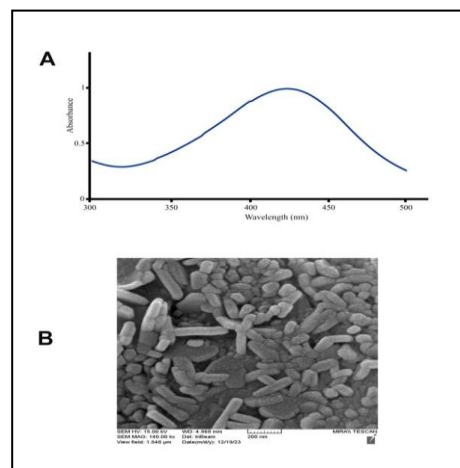
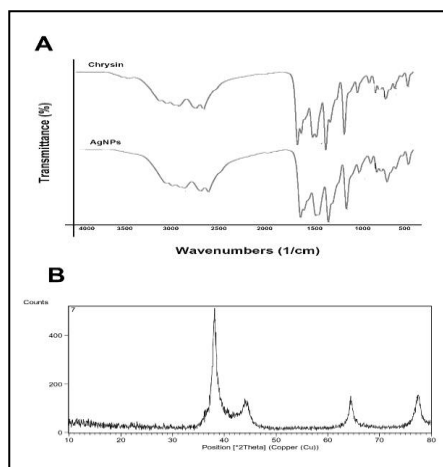
۱ A نشان داده شده است، یک پیک متمایز در محدوده ۴۳۰-۴۵۰ نانومتر مشاهده شد که مربوط به SPR نانوذرات نانوذرات بیوسنتز شده است و تشکیل نانوذرات نقره را تأیید می‌کند.

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 (فلانوئیدها، پلی فنول‌ها)، روی سطح نانوذرات نقره بسیار حساس است. اندازه متوسط نانوذرات نقره از کرایزین 101 ± 15 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.

طیف مادون قرمز کرایزین طیف‌های برجسته‌ای را در ۳۰۸۰، ۳۰۰۹، ۲۹۴۵، ۱۶۵۵ و ۱۶۱۰ سانتی‌متر نشان می‌دهد (شکل ۲ 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 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 (شکل ۲ B).



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

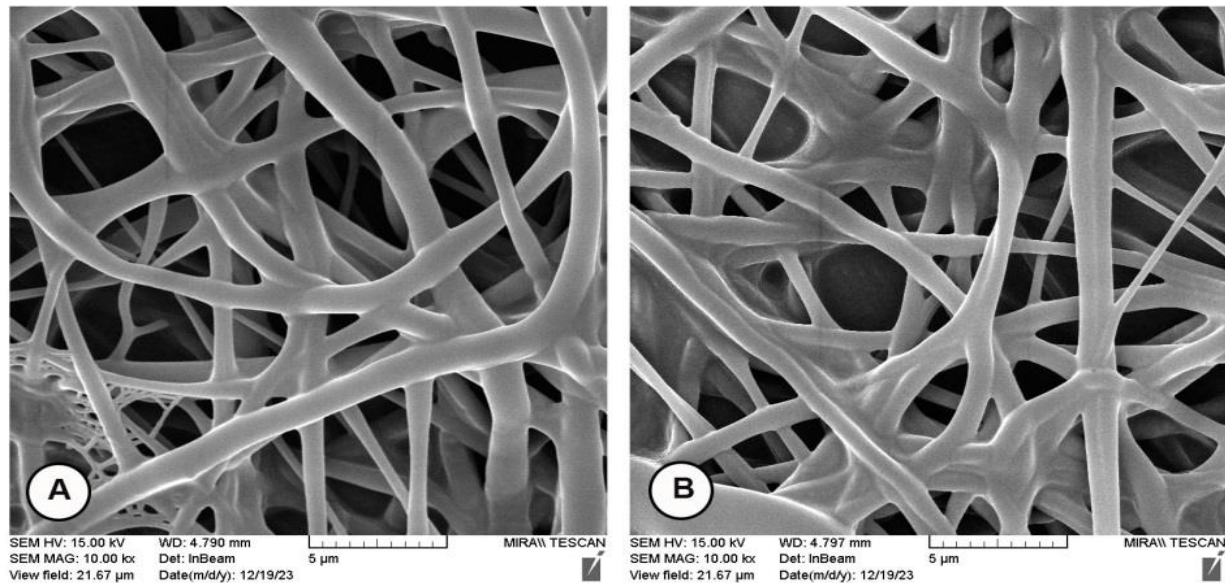
فعالیت ضدباکتریایی نانوالیاف پلی کاپرولاتون

روش استاندارد رقت براث

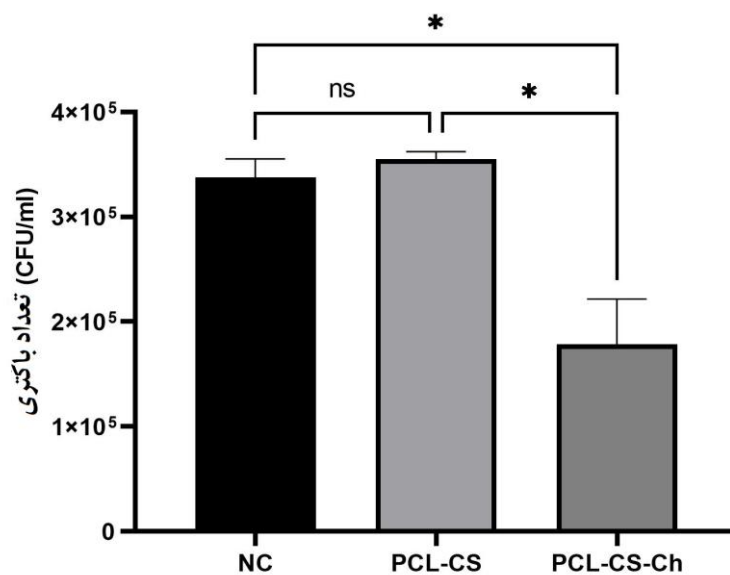
اثر ضدباکتریایی گروه‌های PCL-CS و PCL-CS-Ch همراه گروه کنترل با روش استاندارد رقت براث تعیین شد. نتایج نشان داد که گروه نانوالیاف حاوی نانوذرات کرایزین در مقایسه با گروه‌های نانوالیاف پلی کاپرولاتون-چیتوزان و کنترل منفی به‌طور

(P<۰/۰۵) (نمودار ۱).

معنی‌داری موجب مهار رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شدند



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

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

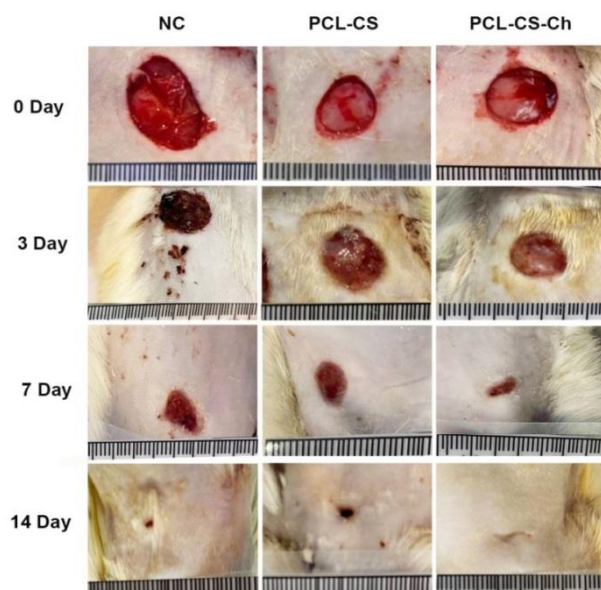
اندازه گیری قطر زخم

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 گروه های پلی کاپرولاتون - چیتوزان - نانوذرات کرایزین در روز ۳ و ۷ پس از درمان به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل منفی بود ($P < 0.05$). نرخ بسته شدن زخم در گروه درمان و کنترل منفی به ترتیب $63/95 \pm 0/49$ و $46/06 \pm 13/23$ درصد در روز ۳ پس از درمان بود ($P < 0.05$). همچنین در روز ۷ پس از درمان، درصد بسته شدن زخم در گروه پلی کاپرولاتون - چیتوزان - نانوذرات کرایزین و کنترل منفی به ترتیب $85/7 \pm 3/05$ و $69/4 \pm 3/8$ بود ($P < 0.05$). نتایج نشان داد در روز ۱۴ پس از درمان در تمام گروه ها زخم ها به طور کامل بسته شده بودند.

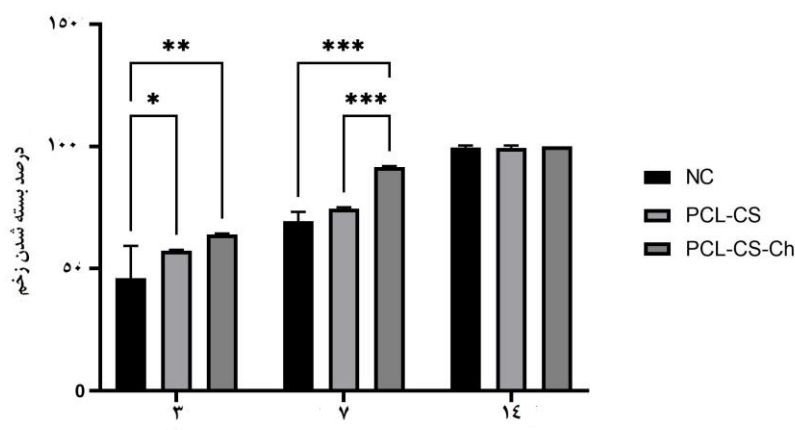
ارزیابی های هیستوپاتولوژیک

شکل ۵ و ۶ نتایج ارزیابی های پاتولوژیک را در روزهای ۳ و ۷ پس از درمان نشان می دهند. بر اساس این یافته ها، در گروه کنترل

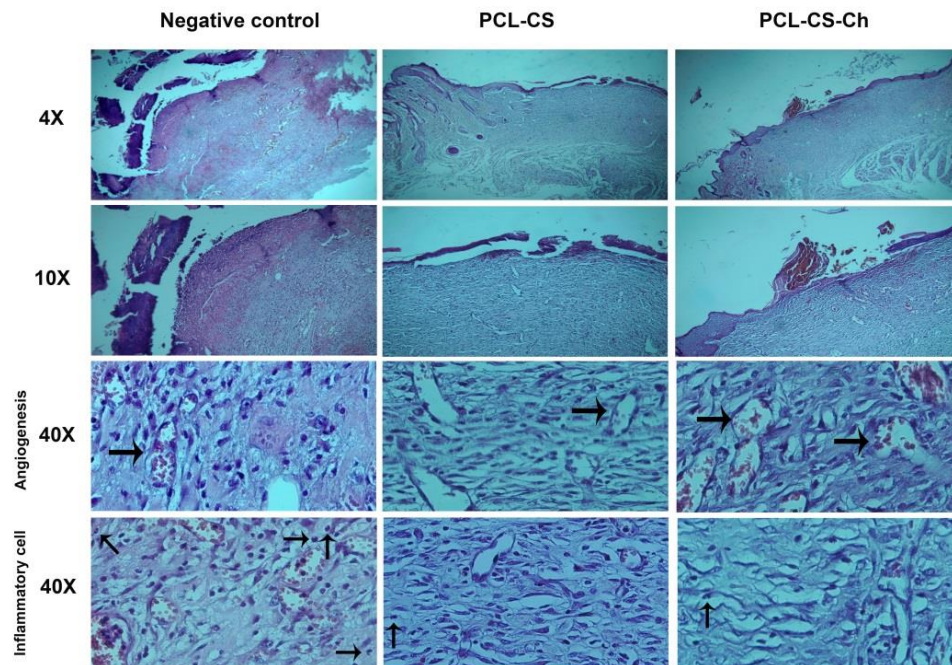
منفی علائمی از شروع اپیتلیزاسیون از اطراف زخم مشاهده نشد؛ در حالی که در گروه های پلی کاپرولاتون - چیتوزان و پلی کاپرولاتون - چیتوزان - نانوذرات نقره کرایزین شروع اپیتلیزاسیون از اطراف زخم مشاهده شد.



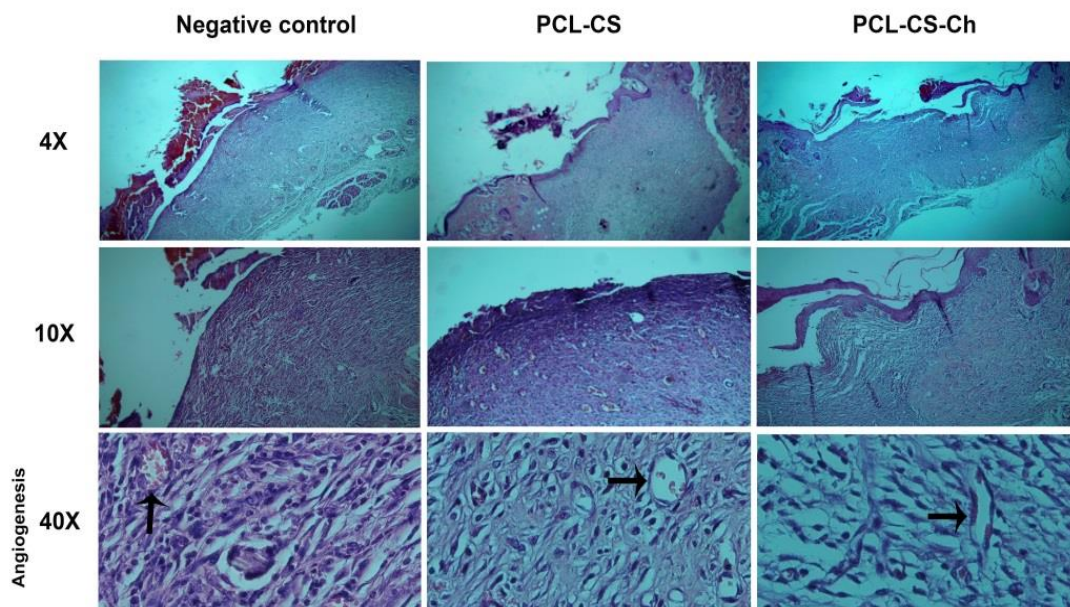
شکل ۴- تصاویر ماکروسکوپیک تأثیر نانوذرات نقره سبز سنتز شده با کرایزین در موش صحرایی



نمودار ۲- درصد بسته شدن زخم تحت تأثیر داربست های پلی کاپرولاتون-چیتوزان (PCL-CS)، پلی کاپرولاتون-چیتوزان-نانوذرات نقره (PCL-CS-Ch) و NC : کنترل منفی. (داده ها به صورت میانگین به همراه انحراف معیار بیان شده اند، سطح معنی داری به صورت *، ** و *** نمایش داده شد که به معنای * : $P < 0.05$ ، ** : $P < 0.01$ ، *** : $P < 0.001$ می باشد).



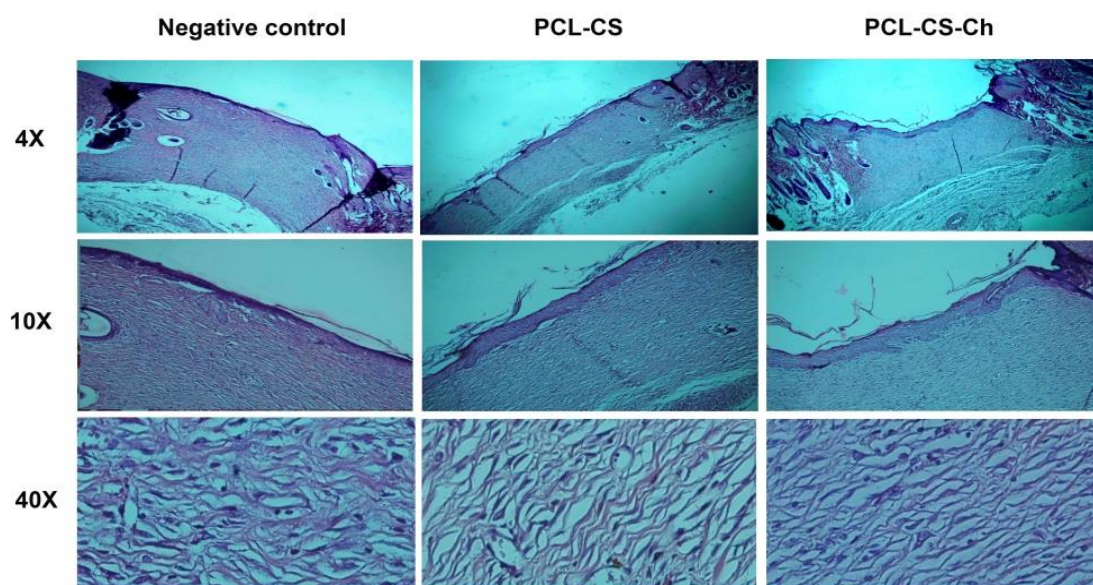
شکل ۵- تصاویر هیستوپاتولوژیک زخم‌های درمان شده با پلی کاپرولاکتون-چیتوزان (PCL-CS)، پلی کاپرولاکتون-چیتوزان-نانوذرات نقره (PCL-CS-Ch) و کنترل منفی در روز ۳ پس از درمان. فلش در قسمت Angiogenesis نشان دهنده رگ های خونی و در قسمت Inflammatory cell نشان دهنده وجود نوتروفیل می باشد.



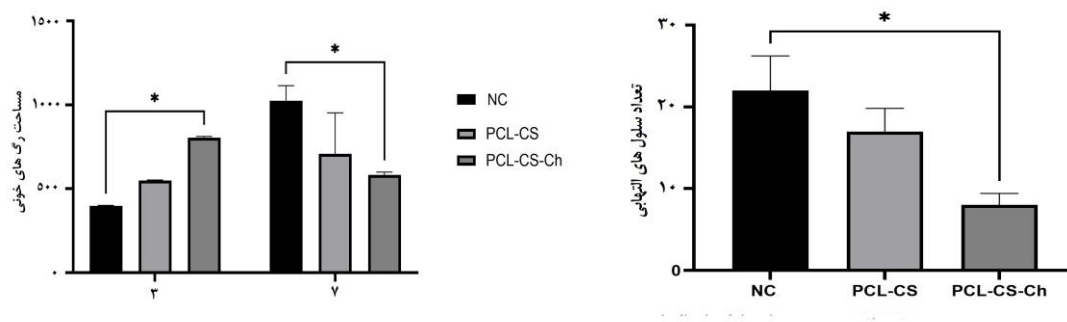
شکل ۶- تصاویر هیستوپاتولوژیک زخم‌های درمان شده با پلی کاپرولاکتون-چیتوزان (PCL-CS)، پلی کاپرولاکتون-چیتوزان-نانوذرات نقره (PCL-CS-Ch) و کنترل منفی در روز ۷ پس از درمان

گروه پلی کاپرولاتون - چیتوزان - نانوذرات نقره کرایزین در مقایسه با گروه کنترل منفی در روز ۳ پس از درمان به طور معنی داری افزایش یافته است. همچنین تعداد سلول های التهابی در گروه پلی کاپرولاتون - چیتوزان - نانوذرات نقره کرایزین در مقایسه با گروه کنترل منفی در روز ۳ پس از درمان به طور معنی داری کاهش یافته است (نمودار ۳).

در روز چهارده پس از درمان نیز در هر سه گروه پلی کاپرولاتون - چیتوزان و پلی کاپرولاتون - چیتوزان - نانوذرات نقره کرایزین و کنترل منفی سطح زخم با اپیدرم پوشانده شده است که در گروه پلی کاپرولاتون - چیتوزان - نانوذرات نقره کرایزین ضخامت اپیدرم در مقایسه با دو گروه دیگر بیشتر می باشد و دارای فرم بالغ تری می باشد (شکل ۷).
نتایج بررسی رگ زایی نشان داد که تعداد رگ های خونی در



شکل ۷- تصاویر هیستوپاتولوژیک زخم های درمان شده با پلی کاپرولاتون-چیتوزان (PCL-CS)، پلی کاپرولاتون-چیتوزان-نانوذرات نقره (PCL-CS-Ch) و کنترل منفی در روز ۱۴ پس از درمان



نمودار ۳- نتایج حاصل از مساحت رگ های خونی و تعداد سلول های التهابی در روزهای ۳ و ۷ پس از درمان (داده ها به صورت میانگین به همراه انحراف معیار بیان شده اند، سطح معنی داری نسبت به گروه کنترل منفی به صورت * نمایش داده شد که به معنای $P < 0.05$ می باشد).

بحث

امروزه پانسمان‌های پزشکی بر پایه نانوالیاف الکترورسی شده به دلیل ایجاد یک شرایط ایده‌آل برای ترمیم زخم به عنوان یکی از زمینه‌های تحقیقاتی در تولید پانسمان‌های پزشکی تبدیل شده است (۳). پلی‌کاپرولاکتون نیز به عنوان پلیمری زیست‌سازگار مورد تأیید سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) قرار گرفته و به طور گسترده در پانسمان‌های پزشکی استفاده می‌شود (۶). بدین ترتیب این مطالعه با هدف طراحی و کاربرد داربست پلی‌کاپرولاکتون-چیتوزان حاوی نانوذرات نقره سبز سنتز شده با فلاونوئید کرایزین در ترمیم زخم‌های تجربی ایجاد شده در موش صحرایی صورت گرفت. در این مطالعه به منظور افزایش خصوصیات ساختاری و ترمیمی پلی‌کاپرولاکتون از ترکیب پلی‌کاپرولاکتون و چیتوزان استفاده شد. همچنین استفاده از نانوذرات نقره سنتز شده با فلاونوئید کرایزین به عنوان 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، مقرون به صرفه 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 101 ± 15 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 شناخته شده 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 به منظور سنتز نانوالیاف استفاده شد. پلی‌کاپرولاکتون به دلیل ماهیت آب‌گریزی خود به تنهایی 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 ترکیب شدن با سایر ترکیبات فعال زیستی از قبیل فاکتورهای رشد، نانوذرات، داروهای ضد میکروبی و نیز داروهای ترمیم زخم را داراست. از طرف دیگر ساختار الکترورسی شده پلی‌کاپرولاکتون قابلیت ممانعت از نفوذ میکروب‌ها به عنوان یک سد فیزیکی را دارد که به خودی خود از عفونت در محل پانسمان جلوگیری می‌کند (۲۰، ۲۱).

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

نانوذرات کرایزین در نانوالیاف پلی کاپرولاتون - چیتوزان می تواند به طور 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 آن ها 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 می توانند با نفوذ به ساختار بیوفیلیم و ایجاد اختلال در عملکرد سلول های باکتریایی، رشد و گسترش باکتری را مهار کند. همچنین، این ترکیبات با کاهش چسبندگی باکتری ها و تخریب ماتریکس بیوفیلیم، به بهبود اثرات درمانی کمک می کنند و پتانسیل بالایی برای استفاده در مقابله با عفونت های مقاوم به آنتی بیوتیک ها دارند (۲۲). نانوذرات نقره به عنوان موادی با خاصیت ضدباکتریایی مطرح شده اند. این نانوذرات با اتصال به سطح باکتری باعث می شوند غشای سلولی باکتری ناپایدار و نفوذپذیرتر شود. این تغییر باعث کاهش انرژی (ATP) سلولی باکتری می شود و در نتیجه متابولیسم باکتری مختل شده و می میرد. علاوه بر این، نانوذرات نقره می توانند به پروتئین های موجود روی سطح و داخل سلول باکتری متصل شوند و عملکرد طبیعی آن ها را از بین ببرند. این ذرات می توانند وارد سلول باکتری شوند و آنزیم های 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 آن ها در برابر میکروارگانیسم ها کمک می کند. یکی از مکانیسم های اصلی، برهمکنش بین نانوذرات نقره و دیواره سلولی باکتری است. AgNP ها می توانند به دیواره سلولی بچسبند و در نتیجه باعث آسیب و اختلال شوند. این تعامل یکپارچگی ساختاری دیواره سلولی را مختل می کند و منجر به نشت اجزای سلولی و در نهایت مرگ سلولی می شود. علاوه بر این، نانوذرات نقره می توانند 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 فعالیت های متابولیکی و آنزیمی ضروری

می شوند. این اختلال از رشد و تکثیر باکتری ها جلوگیری می کند. علاوه بر این، AgNP ها دارای خواص ذاتی هستند که آن ها را قادر می سازد تا در تعامل با سلول های باکتری، گونه های فعال اکسیژن^۱ (ROS) تولید کنند. گونه های فعال اکسیژن مانند رادیکال های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن، مولکول های بسیار واکنش پذیری هستند که می توانند باعث استرس اکسیداتیو و آسیب به سلول های باکتریایی شوند. تولید ROS توسط نانوذرات نقره با القای آسیب اکسیداتیو سلولی و اختلال بیشتر در متابولیسم باکتری به اثر ضدباکتریایی آن کمک می کند (۲۳). نتایج نشان می دهد که نانوذرات نقره علاوه بر مهار رشد باکتری ها و با اثرات آنتی اکسیدانی می تواند به طور 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 پلی کاپرولاتون-چیتوزان-نانوذرات کرایزین می تواند به طور مؤثری موجب کاهش اندازه زخم، کاهش دوره اپیتلیزاسیون مجدد و بهبود فاکتورهای ترمیمی شود. در مطالعه ای که توسط Kaparekar و همکاران انجام شد، ارزیابی های *in-vitro* و *in-vivo* نشان دادند که ترکیب آلژینات-چیتوزان بارگذاری شده با کرایزین می تواند به طور 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 می تواند محتوای هیدروکسی پرولین و هگزوزآمین را در بافت گرانولاسیون افزایش دهد. بدین ترتیب این مطالعه بیان می کند که ترکیب آلژینات-چیتوزان بارگذاری شده با کرایزین قابلیت کاربرد در زمینه بهبود زخم و استفاده در پانسمان های نوین زخم را دارد (۲۴). همچنین در مطالعه ای دیگر محمدی و همکاران گزارش کردند که نانوفیبرهای بارگذاری شده با کرایزین خواص ضدالتهابی در مراحل مختلف ترمیم زخم از طریق تأثیرگذاری بر بیان ژن های مربوط به فاکتورهای IL-6^۲، MMP-2^۳، TIMP-1^۴، TIMP-2^۵ و iNOS^۱ 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

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه 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 می باشد 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 می دارند که هیچ گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

در مطالعه حاضر درمان زخم ها با استفاده از داربست پلی کاپرولاکتون-چیتوزان-نانوذرات کرایزین به طور قابل توجهی تعداد سلول های التهابی را در فرایند ترمیم کاهش داد که می تواند نشان دهنده نقش مؤثر این داربست در کاهش عفونت باشد. در فرایند ترمیم زخم، کاهش سلول های التهابی معمولاً نشان دهنده کنترل موفقیت آمیز عفونت و انتقال به مراحل بعدی بهبود است. سلول های التهابی مانند نوتروفیل ها و ماکروفاژها در مرحله اولیه التهاب، با فاگوسیتوز باکتری ها و مواد زائد، عفونت را مهار می کنند. وقتی عفونت کاهش می یابد، نیاز به حضور این سلول ها کمتر می شود و بدن به صورت خودکار ترشح سیتوکین های ضد التهابی را افزایش می دهد تا التهاب را محدود کند. از طرف دیگر با کاهش سلول های التهابی محیط مناسبی برای رشد بافت های جدید فراهم می شود و فرایند ترمیم وارد مرحله تکثیر می شود که در آن فیبروبلاست ها شروع به تولید کلاژن می کنند و رگ های خونی جدید شکل می گیرند و افزایش تعداد رگ های خونی در روز ۷ در این مطالعه تأیید کننده این پدیده است (۲۶،۲۷).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که داربست پلی کاپرولاکتون-چیتوزان-نانوذرات نقره سنتز شده با کرایزین، علاوه بر داشتن خصوصیات مکانیکی و مورفولوژیکی مناسب باعث کاهش رشد باکتری ها می شوند و در نتیجه خطر عفونت در محل زخم یا آسیب را کاهش می دهند. به نظر می رسد این ترکیب در داربست ها می توانند به عنوان سیستم های پیشرفته برای مهندسی بافت پوست و درمان زخم ها، به دلیل ترکیب خواص مکانیکی، زیستی و ضد عفونی کننده، گزینه ای مؤثر و قابل اعتماد به شمار آیند.

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/> PMID: 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 PMID: PMC3671867 DOI: [10.1016/j.biomaterials.2010.08.104](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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 PMID: PMC5856488 DOI: [10.1126/sciadv.aar5931](https://doi.org/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](https://doi.org/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-modified 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/>