

تهیه زخم پوش مهندسی بافت شده متشکل از الیاف کیتوزان حاوی نانوذرات شیشه زیستی دوپ شده با یون نقره جهت بهبود و ترمیم زخم

چکیده

دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۸ ویرایش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۵ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۲۳ آنلاین: ۱۴۰۰/۰۴/۰۱

زمینه و هدف: ترمیم زخم یکی از فرآیندهای پیچیده است که شامل تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال و به‌کارگیری سلول‌های التهابی می‌باشد و از موضوعات تحقیق در مورد مطالعات تروما، ارتوپدی و جراحی است که اشکال مختلفی از سلول‌ها در آن دخیل هستند. هدف از پژوهش حاضر طراحی زخم پوش مهندسی بافت شده متشکل از الیاف کیتوزان حاوی نانوذرات شیشه زیستی دارای یون نقره به‌منظور کاربرد در ترمیم زخم می‌باشد.

روش بررسی: پژوهش حاضر از نوع تجربی می‌باشد که در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه زیست‌شناسی دانشگاه محقق اردبیلی از اردیبهشت تا آذر ۱۳۹۸ با رعایت اصول اخلاقی انجام شد. تهیه زخم‌پوش نانوالیاف به روش سل-ژل تهیه گردید. سمیت سلولی به روش MTT بررسی شد. سپس خواص ضد میکروبی نانوالیاف به روش انتشار دیسک تعیین گردید. عکس SEM و AFM از نانوالیاف تهیه گردید. در نهایت نانوالیاف به روش FTIR آنالیز گردیدند.

یافته‌ها: زخم پوش متشکل از الیاف کیتوزان حاوی نانوذرات شیشه زیستی دوپ شده با نقره از نظر سمیت سلولی در حد مناسبی قرار داشت. نانوالیاف تهیه شده با ۲٪ نانوذرات نقره، ۱۰ mm هاله عدم رشد علیه/استافیلوکوکوس اورئوس و ۹ mm هاله عدم رشد علیه اشیریشیا کلی ایجاد کردند. بنابراین بهترین درصد در داربست مطالعه‌ی حاضر ۲٪ بوده است. آنالیز SEM، AFM و FTIR نشان داد که نانوالیاف دارای زبری و ساختار مناسب می‌باشند.

نتیجه‌گیری: داربست حاصله دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشد. نتایج نشان داد که سمیت چندانی بر روی سلول‌های کشت شده نداشته و می‌تواند به‌عنوان زخم پوش در درمان مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: کیتوزان، نانوذرات، ترمیم، مهندسی بافت.

مهناز محمودی سهی^۱، اسداله اسدی^{۱*}،

پیمان بروکی میلان^۲، اسماعیل

شریفی^۳، آرش عبدالملکی^۴ و^۵

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

۲- گروه مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی،

دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه

علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۳- گروه مهندسی بافت و مواد زیستی، دانشکده

فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی

همدان، همدان، ایران.

۴- گروه علوم مهندسی، دانشکده فناوری‌های

نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، نمین، ایران.

۵- مرکز پژوهشی علوم زیستی و زیست فناوری،

دانشگاه فناوری‌های نوین سبلان، نمین، ایران.

* نویسنده مسئول: اردبیل، خیابان دانشگاه، دانشگاه

محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی.

تلفن: ۰۴۵-۳۱۵۰۵۱۸۷

E-mail: asady@uma.ac.ir

مقدمه

مکانیسم بازسازی پیچیده را شروع می‌کند که به‌عنوان ترمیم زخم شناخته می‌شود.^۱ ترمیم زخم یکی از فرآیندهای پیچیده است که شامل تکثیر سلول‌های اپیتلیال و به‌کارگیری سلول‌های التهابی می‌باشد و همچنین یکی از موضوعات داغ تحقیق در مورد مطالعات تروما، ارتوپدی و جراحی عمومی است که اشکال مختلفی از سلول‌ها در این فرآیند دخیل هستند.^۲ با وجود پیشرفت‌های اخیر در زمینه درمان زخم‌های پوستی، هنوز هیچ درمان قطعی برای آن وجود ندارد.^۳ مهندسی بافت با هدف تولید بافت‌ها و پروتزهای جایگزین

زخم‌ها نوعی آسیب هستند که به‌دلیل محرک‌های خارجی یا ضربه‌ای ایجاد می‌شوند که طی آن پوست پاره، بریده یا سوراخ می‌شود.^۴ پوست به‌عنوان لایه بیرونی که بدن را می‌پوشاند به‌عنوان یک مانع محیطی عمل می‌کند، همچنین وظیفه محافظت از بدن در برابر از دست دادن آب و نفوذ مواد مضر را بر عهده دارد. هنگامی که یک عامل فیزیکی یا حرارتی این مانع را برهم بزند، پوست یک

غیرآزمی و کاهش سطح پراکسید لیپیدها در گروه درمان شده با ژل کیتوزان دیده شد.^{۱۰} هدف از پژوهش حاضر طراحی زخم پوش مهندسی بافت شده متشکل از الیاف کیتوزان حاوی نانوذرات شیشه زیستی دارای یون نقره به منظور کاربرد در بهبود و ترمیم زخم می باشد.

روش بررسی

پژوهش حاضر از نوع تجربی می باشد که در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه زیست شناسی دانشگاه محقق اردبیلی از اردیبهشت تا آذر ۱۳۹۸ انجام شد. کلیه آزمایشات با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی (مصوب کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی) و با کد اخلاقی شماره IR.ARU.REC.1398. 112 انجام گردید.

سنتز زخم پوش: برای ساخت زخم پوش مورد نظر، ابتدا نانوذرات شیشه زیستی حاوی یون نقره با استفاده از روش سل-ژل (Sol-gel) تهیه گردید. به طور خلاصه ۶۷ ml تترااکسی سیلان (Tetraethoxysilane) در ۵۰ ml اسید نیتریک ۱ مولار ریخته شد و به مدت ۶۰ دقیقه روی همزن قرار گرفت پس از ۴۵ دقیقه، ۷ ml تری اتیل فسفات به آن اضافه شد. سپس ۴۱ g کلسیم نترات تتراهیدرات به آن اضافه شد. در ادامه پس از ۴۵ دقیقه، ۲۷ g نترات سدیم به آن اضافه شد. سپس جهت ساخت نانوذرات شیشه زیستی حاوی نقره ۴۰ g کلسیم نترات تتراهیدرات و ۱/۵ g نترات نقره به محلول اضافه گردید و به مدت یک ساعت همزده شد. در نهایت سل ایجاد شده به ژل تبدیل گردید. ژل حاصل را پس از تعیین دمای مناسب توسط آنالیز حرارتی و ترموگراویمتری (Thermogravimetric analysis) به کوره انتقال داده و سپس با آسیاب به پودر تبدیل گردید و در نهایت توسط الکتروسی (Electrospinning) زخم پوش مورد نظر با کیتوزان ۱٪، ۲٪ و ۳٪ تهیه گردید.^{۱۶}

آنالیز زخم پوش تهیه شده توسط FTIR: برای بررسی داربست تهیه شده از روش FTIR استفاده شد. در ابتدا نمونه ها به وسیله تیغ جراحی به قطعات خیلی ریز تبدیل شده و در ادامه با ترکیب kbr مخلوط شده و در هاون کوبیده شد. سپس تحت فشار قرص نمونه ساخته شده و توسط دستگاه FTIR مورد آنالیز قرار گرفت. بررسی زخم پوش تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی

برای ترمیم یا جایگزینی بافت آسیب دیده مورد توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته است. بازسازی و ترمیم بافت و اندام های از دست رفته و یا به شدت آسیب دیده تحت عنوان مهندسی بافت بیان می شود.^{۹،۱۰} ساخت پوست مصنوعی و جایگزین های پوستی و ترمیم زخم های پوستی یکی از مهمترین زمینه ها در مهندسی بافت می باشد، اگرچه پیشرفت های خوبی در این زمینه در سال های اخیر صورت گرفته است اما با این وجود هنوز درمان قطعی برای برخی ضایعات پوستی مانند زخم های دیابتی و سوختگی های درجه دو و سه وجود ندارد.^{۱۱} یک داربست ایده آل در مهندسی بافت بایستی از نظر ترکیب و ساختار، ماتریکس خارج سلولی طبیعی را تقلید کند. داربست های جدید با دامنه عملکردی وسیع برای ترمیم و بازسازی بافت های مختلف نظیر پوست می توانند به وسیله غنی سازی داربست های پلیمری زیست تخریب پذیر با شیشه های زیست فعال با خواص درمانی و یون های فلزی آنتی باکتریال، مانند نقره توسعه یابند.^{۱۱} کیتوزان (Chitosan)، یک پلی ساکارید طبیعی است که دارای خصوصیات زیست سازگاری و زیست تجزیه پذیری است و اثرات غیرسمی و ضد میکروبی و ترمیم کنندگی زخم را نیز دارد. به علت همین خصوصیات بی نظیری که دارد توصیه می شود از کیتوزان به عنوان ماده بی خطر برای استفاده در کاربردهای پزشکی مثل مهندسی بافت، صنایع داروسازی و پوشش زخم استفاده شود. همچنین کیتوزان به داشتن فعالیت آنتی باکتریال شناخته شده که عمدتاً به علت طبیعت پلی کاتیونیک آن است، به طور وسیع به عنوان پوشاننده زخم مورد بررسی قرار گرفته است زیرا تحریک کننده تکثیر و فعال کننده ماکروفاژها و ذرات آنتی باکتریال است.^{۱۳،۱۲} Liang و همکاران در پژوهشی زخم پوش کیتوزان/نانوذرات نقره نامتقارن جدید را بررسی کردند. پانسمان کامپوزیت کیتوزان/نانوذرات نقره نشان دهنده بهبود رطوبت است، توانایی لخته شدن خون را دارد و باعث بهبودی زخم، تسریع در بازسازی و ایجاد کلاژن می شود.^{۱۴} Kumar و همکاران اثربخشی فرمولاسیون ژل کیتوزان و سولفادایزین نقره در درمان زخم سوختگی را در سطح مولکولی بررسی کردند. در مطالعه آنها بر اساس ویسکوزیته و انطباق پذیری، ژل کیتوزان ۵٪ به عنوان فرمول آزمایش بهینه انتخاب شد. استفاده موضعی از ژل کیتوزان ۵٪ باعث افزایش سنتز و تثبیت کلاژن در محل زخم سوختگی شد. افزون بر این، افزایش معناداری در آنزیم های آندوژنیک و آنتی اکسیدان های

کیتوزان بدون نانوذرات نقره بود. این تست در سه تکرار انجام شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آنالیز زخم پوش تهیه شده توسط FTIR: مطابق با طیف FTIR در نمودار (1A) در زخم پوش حاوی کیتوزان ۱٪ پیک‌های ۳۴۱۸ و ۳۱۳۸، در زخم پوش حاوی کیتوزان ۲٪ پیک‌های ۳۴۳۵ و ۳۱۵۲ نمودار (1B) و در زخم پوش حاوی کیتوزان ۳٪ پیک‌های ۳۴۳۴ و ۳۱۶۱ نمودار (1C) مربوط به کشش پیوند نیتروژن و اکسیژن با هیدروژن است. همچنین این پیک‌ها مربوط به پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی ساختار زخم پوش هستند. ساختار کیتوزان نیز یکسری گروه‌های N-استیل در ۱۶۴۰ و ۱۳۲۰ دارد که در طیف‌های مطالعه حاضر پیک ۱۶۳۰ در هر سه زخم پوش دیده می‌شود. دو پیک در حوالی ۸۴۰ و ۶۱۰ در هر سه داربست ظاهر شده که مربوط به نقره است. در ضمن نقره یکسری پیک‌های دیگر هم دارد که چون در ساختار، پلیمر کیتوزان پلیمر غالب است پیک‌های کیتوزان روی نقره قرار گرفته و پیک‌های نقره را نمی‌توان دید. پیک‌هایی که زیر ۱۰۰۰ ظاهر شده‌اند مربوط به نقره هستند.

نتایج بررسی زخم پوش تهیه شده توسط SEM: نتایج حاصل از تصاویر SEM نشان داد که زخم پوش کیتوزان حاوی نانوذرات نقره در هر سه غلظت کیتوزان (۱٪، ۲٪ و ۳٪) تشکیل میکروساختارهای متخلخلی را می‌دهند (شکل ۱). همچنین نتایج آماری نشان داد که میانگین قطر فیبرها در زخم پوش تهیه شده به ترتیب 487 ± 45 nm (شکل 1A)، 573 ± 57 nm (شکل 1B) و 721 ± 73 nm (شکل 1C) می‌باشد.

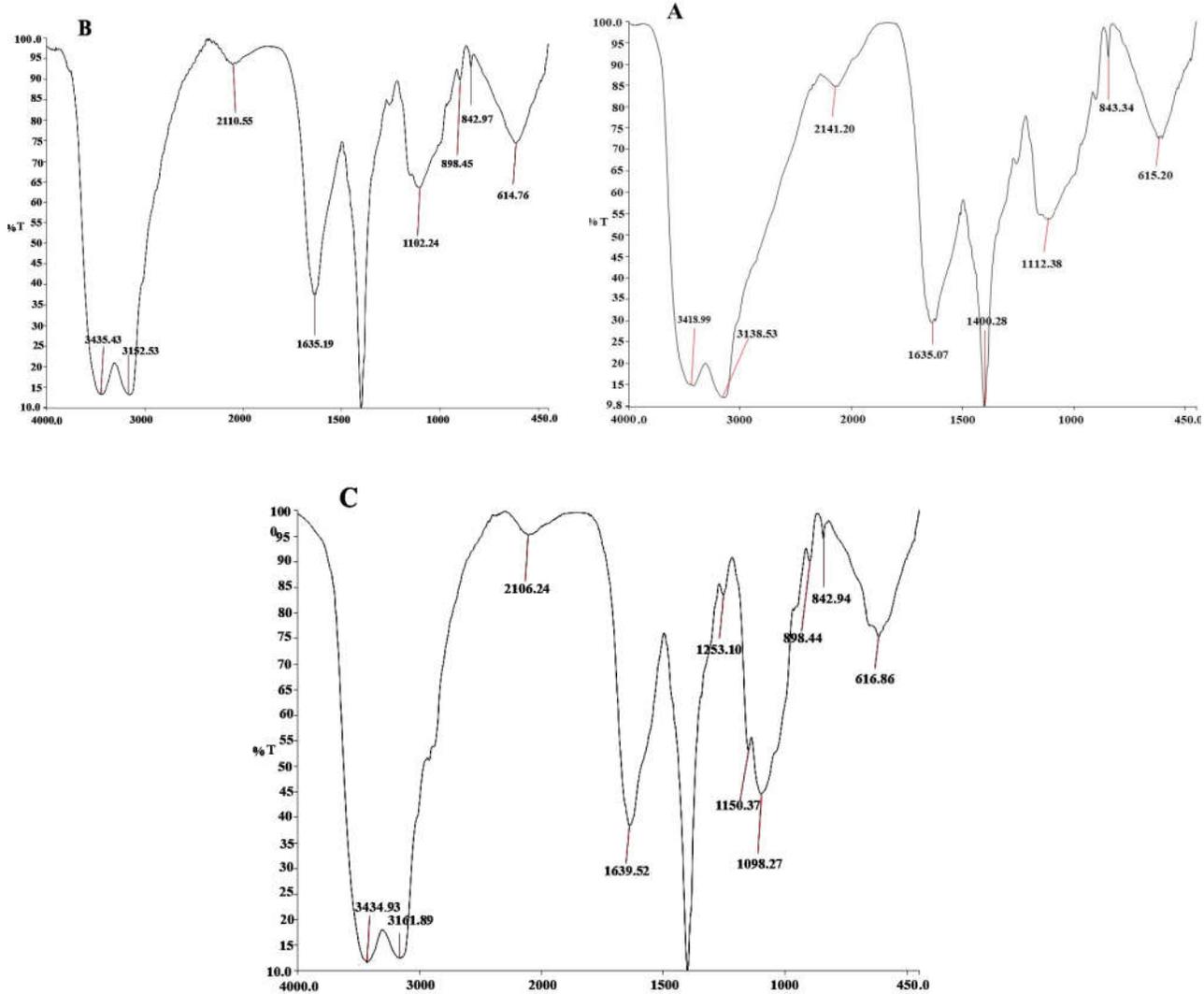
نتایج بررسی زخم پوش تهیه شده توسط AFM: با توجه به اینکه زبری سطح نقش موثری در چسبندگی سلول‌ها به سطح داربست دارد، توپوگرافی سطح زخم پوش‌های ساخته شده با درصدهای متفاوت کیتوزان به کمک AFM مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). همچنین افزایش زبری سطح، باعث ترشوندگی بهتر سطح زخم پوش‌ها شده و در نتیجه چسبندگی سلول‌ها را افزایش می‌دهد. با توجه به تصاویر دو بعدی و سه بعدی و همچنین آنالیز داده‌ها، میزان زبری در گروه کیتوزان یک درصد بیشتر از همه بوده و کیتوزان دو درصد نیز زبری بیشتری نسبت به کیتوزان سه درصد دارد.

رویشی (SEM): به‌منظور بررسی و آنالیز فراساختار و مورفولوژی ساختاری زخم پوش تهیه شده از میکروسکوپ الکترونی رویشی (SEM) استفاده گردید. به‌طور خلاصه نمونه‌ها توسط گلاتارآلدئید ۲/۵٪ به مدت دو ساعت تثبیت شده و با درجات صعودی اتانول آبیگری شدند، پس از خشک کردن، با پوشش طلا-پالادیوم پوشانده شده و آماده بررسی با این میکروسکوپ شدند.^{۱۷}

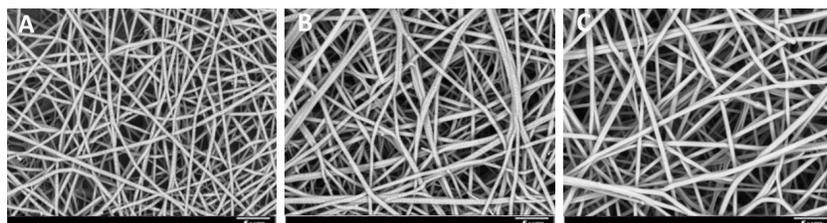
بررسی زخم پوش تهیه شده توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM): به‌منظور بررسی توپوگرافی سطح زخم پوش تهیه شده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) استفاده شد. به‌طور خلاصه، نمونه بر روی لام چسبیده شد و در محل مخصوص نمونه دستگاه قرار داده شد. و عکسبرداری توسط میکروسکوپ در بزرگ‌نمایی‌های مختلف از هر سه نمونه ۱٪، ۲٪ و ۳٪ زخم پوش‌های تهیه شده انجام شد.^{۱۸}

بررسی زنده ماندن سلول‌ها بر روی زخم پوش: جهت بررسی زنده‌مانی سلول‌ها بر روی زخم پوش تهیه شده از تست MTT استفاده شد. پس از کشت رده سلولی L929 تعداد 3×10^3 سلول بر روی زخم پوش تهیه شد در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت شدند. سپس سلول‌ها با $200 \mu\text{l}$ معرف MTT در تاریکی و در دمای 37°C به مدت چهار ساعت انکوبه شدند. سپس محیط کشت رویی به آرامی برداشته شد و بلورهای فورمازان (Formazan crystals) در $200 \mu\text{l}$ DMSO به مدت یک‌ساعت حل گردید. و در نهایت جذب هریک از نمونه‌ها در طول موج 570 nm ثبت گردید و درصد زنده‌مانی سلول‌ها محاسبه شد. همه آزمایشات در سه تکرار انجام شد.^{۱۹}

بررسی خاصیت ضدباکتریایی زخم پوش: به‌منظور بررسی فعالیت ضدباکتری زخم پوش تهیه شده از روش انتشار دیسک استفاده شد. به‌طور خلاصه پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت استاندارد ۱ مک فارلند، توسط یک سوآپ آغشته به سوسپانسیون میکروبی باکتری‌های موردنظر در سطح محیط مولر هینتون آگار (Muller hinton agar media) به‌طور یکنواخت در سطح پلیت تلقیح شد. سپس دیسک‌های 6 mm آغشته به زخم پوش کیتوزان حاوی نانوذرات نقره (۱٪، ۲٪ و ۳٪) روی سطح محیط قرار داده شد. در نهایت پلیت‌ها در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. همچنین برای اشریشیا کلی دیسک آنتی‌بیوتیک ای‌پی‌ام (IPM) و برای استافیلوکوکوس اورئوس دیسک آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (TE) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. کنترل منفی نیز داربست



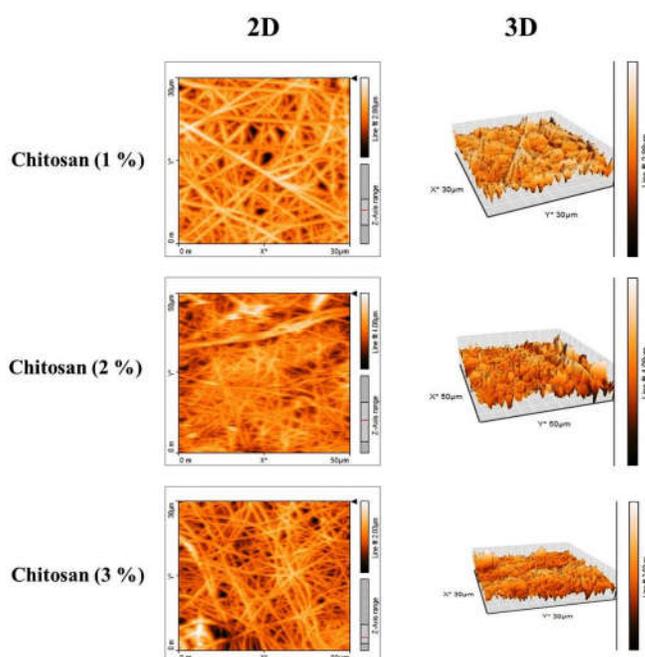
نمودار ۱: طیف FTIR مربوط به زخم پوش حاوی کیتوزان ۱٪ (A)، زخم پوش حاوی کیتوزان ۲٪ (B)، زخم پوش حاوی کیتوزان ۳٪ (C)



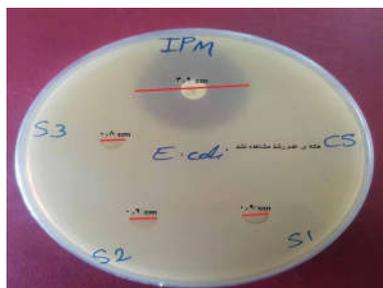
شکل ۱: تصاویر SEM حاصل از زخم پوش کیتوزان حاوی نانوذرات نقره. زخم پوش حاوی کیتوزان ۱٪ (A)، زخم پوش حاوی کیتوزان ۲٪ (B)، زخم پوش حاوی کیتوزان ۳٪ (C)

داشته است. در نهایت زخم پوش حاوی ۳٪ نانوذرات نقره تقریباً در هر سه زمان درصد سلول‌های زنده یکسانی داشته است. نتایج حاصل از ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی زخم پوش: نتایج انتشار دیسک نشان داد که زخم پوش کیتوزان حاوی نانوذرات نقره دارای خواص ضد میکروبی می‌باشد (شکل ۳). مشاهده می‌شود که زخم پوش حاوی ۲٪ نانوذرات نقره بیشترین هاله عدم رشد را علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد کرد. همچنین شکل ۴ نشان می‌دهد که زخم پوش بر

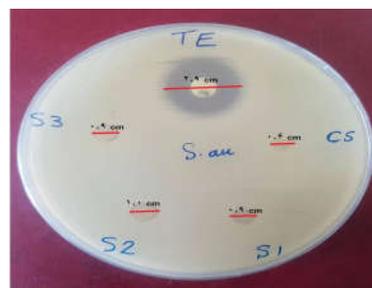
نتایج حاصل از زنده‌مانی سلول‌ها بر روی زخم پوش: بررسی سمیت سلولی به روش MTT نشان داد که زنده ماندن سلول‌ها بر روی زخم پوش‌های تهیه شده براساس میزان درصد نانوذرات نقره و همچنین مدت زمان تیمار متفاوت بوده است (نمودار ۲). نتایج نشان داد که زخم پوش حاوی ۱٪ نانوذرات نقره در ۷۲ ساعت پس از کشت بیشترین درصد سلول‌های زنده و زخم پوش حاوی ۲٪ نانوذرات نقره در ۲۴ ساعت پس از کشت بیشترین درصد سلول‌های زنده را



شکل ۲: تصاویر دو بعدی و سه بعدی تهیه شده توسط AFM



شکل ۳: تصویر انتشار دیسک زخم‌پوش کیتوزان حاوی نانوذرات نقره علیه باکتری *اشریشیا کلی*

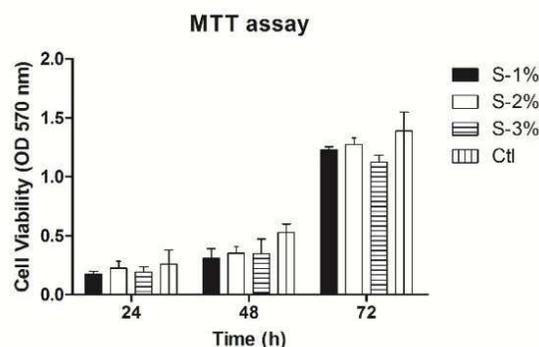


شکل ۴: تصویر انتشار دیسک زخم‌پوش کیتوزان حاوی نانوذرات نقره علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

۲٪ وزنی افزایش یافت و پس از آن با یک روند رو به کاهش تا ۳٪ دنبال شد. به نظر می‌رسد که افزایش خاصیت ضد میکروبی داربست به دلیل حضور نانوذراتی که به طور یکنواخت در ماتریس پلیمری پراکنده شده‌اند، می‌باشد که علت آن را می‌توان به توزیع و پراکندگی بهتر نانوذره نقره در ماتریس پلیمری نسبت داد. به طور کلی ممکن است که با افزایش غلظت نانوذره نقره در ماتریس پلیمری کیتوزان، پراکنش نانوذرات دشوارتر شده و ساختار داربست به حالت کلوخه‌ای درآمده و نانوذرات در بستر پلیمری کیتوزان به دام افتاده و میزان تماس ذرات با سطح کمتر شده باشد.

به همین علت افزودن نانوذرات به میزان ۲٪ باعث افزایش فعالیت ضد باکتریایی داربست شده است و این افزایش خاصیت ضد میکروبی از طریق پراکندگی یکنواخت نانوذرات نقره و ایجاد اتصالات عرضی مناسب نانوذرات نقره با گروه‌های هیدروکسیل و آمید در شبکه پلیمری کیتوزان ایجاد شده است. ولی در غلظت‌های بالای ۲٪ نانوذرات نقره به علت افزایش اندازه نانوذرات و کلوخه‌ای شدن نانوذرات در شبکه پلیمری کیتوزان، خاصیت ضد میکروبی داربست کاهش یافته است. در مطالعه‌ای که توسط Fadli و همکاران انجام شد به بررسی اثر نانوذرات نانونقره- کیتوزان بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* پرداخته شده است. در مطالعه آنها نانوذرات نانونقره- کیتوزان دارای میانگین قطر هاله عدم رشد $14/2 \text{ mm}$ می‌باشد.^{۲۶} خاصیت ضد میکروبی ترکیب آنها بیشتر از مطالعه حاضر می‌باشد. در مطالعه حاضر بیشترین هاله عدم رشد بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با 10 mm می‌باشد. می‌توان اظهار داشت که تثبیت نانوذرات از دو طریق می‌تواند انجام شود، یعنی تثبیت الکترواستاتیک و تثبیت استریک (Electrostatic stabilization and steric stabilization) تثبیت الکترواستاتیک جذب یونی در سطح ذرات تولید می‌کند. تثبیت استریک پوشش در اطراف مرکز فلز توسط یک لایه ماده فضایی بزرگ مانند سورفکتانت‌ها و پلیمرها است. کیتوزان یک گروه NH_2 دارد که می‌تواند با Ag در تعامل باشد.^{۲۶} نتایج FTIR در مطالعه حاضر به وضوح حضور گروه‌های آمینه اولیه را مشخص می‌کند و گروه‌های آمینه به عنوان مکان‌هایی برای تثبیت Ag NP ها عمل می‌کنند.

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۶ که توسط Wang و همکاران انجام



نمودار ۲: درصد زنده ماندن سلول‌ها پس از کشت بر روی زخم پوش‌های تهیه شده، زخم پوش حاوی کیتوزان ۱٪ (S-1%)، زخم پوش حاوی کیتوزان ۲٪ (S-2%)، زخم پوش حاوی کیتوزان ۳٪ (S-3%) و گروه کنترل (Ctl).

روی باکتری گرم منفی /شریشیا کلی اثرات ضد میکروبی کمتری دارد و هاله‌های عدم رشدی که تشکیل شده کوچک‌تر هستند.

بحث

کیتوزان تنها پلیمر کاتیونی طبیعی مشتق شده از کیتین است که از منابع مختلف تولید می‌شود. این ترکیب دارای خواص غیرسمی، بیولوژیک، زیست تخریب‌پذیر و کم هزینه است.^{۲۰} تحقیقات گسترده‌ای بر روی بهبود خواص کیتوزان برای کاربردهای درمانی در حال انجام است و استفاده از کیتوزان به عنوان زخم پوش و عامل ضد میکروبی به عنوان بخشی از برنامه‌های کاربردی در حال انجام است.^{۲۱،۲۲} ویژگی‌های خاص نانوذرات نقره از لحاظ شکل و اندازه باعث شده که این نانو ذرات بتوانند با تخریب غشاء فعالیت ضد میکروبی بالایی از خود نشان دهند.^{۲۳،۲۴} مجموعه این خصوصیات باعث کاربرد فراوان نانوذرات نقره در پزشکی و بهداشت مانند ضد عفونی کردن آب‌های آشامیدنی، استفاده در فیلترهای کربنی و از بین بردن میکروب‌های هوا شده است. همچنین این نانو ذرات امروزه به عنوان پوشش‌های ضد میکروب در تجهیزات پزشکی و نیز تولید ژل‌های ضد میکروب در درمان سوختگی‌ها استفاده می‌شوند.^{۲۵،۲۶} با توجه به نتایج حاصل از تست‌های آنتی‌باکتریال مشخص شد که قطر هاله عدم رشد در داربست با افزایش غلظت نانوذره نقره تا

بیشترین درصد استفاده شده توسط آنها ۰/۵٪ بوده است که حدوداً ۷۷٪ زنده ماندن سلول‌ها را دارا بود. در نتایج بررسی خاصیت ضد میکروبی دیده شد که داربست آنها با ۰/۵٪ نانوذرات نقره، هاله عدم رشد ۱۴/۲ میلی متری علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد کرده اما داربست با ۰/۱۲۵٪ نانوذرات نقره، هاله عدم رشد ۱۶/۳ میلی متری علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد کرده است.^{۲۹}

در مجموع، نتایج قرارگیری مناسب نانوذرات را بر روی ماتریکس کیتوزان نشان می‌دهد. همچنین نتایج نشان داد، زخم پوش تهیه شده کیتوزان حاوی نانوذرات نقره به تنهایی دارای خاصیت ضد میکروبی بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت است، همچنین نتایج حاصل از تست سمیت نیز نشان داد که سمیت چندانی بر روی سلول‌های کشت شده ندارد. از این رو می‌تواند به منظور کاربردهای درمانی از جمله به عنوان زخم پوش و پانسمان مناسب مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزار: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی با عنوان "بررسی زیست‌سازگاری و خواص آنتی‌باکتریال زخم پوش مهندسی بافت شده متشکل از نانوالیاف کیتوزان حاوی نانوذرات شیشه زیستی دوپ شده با یون نقره جهت بهبود و ترمیم زخم" مصوب دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۷ به کد ۳۶۴۱۱۲ می‌باشد که با حمایت دانشگاه محقق اردبیلی اردبیل انجام شده است.

References

- Nethi SK, Das S, Patra CR, Mukherjee S. Recent advances in inorganic nanomaterials for wound-healing applications. *Biomater Sci* 2019;7(7):2652-74.
- Abdolmaleki A, Ghayour MB. The importance of fibronectin in development, regeneration and treatment. *Tehran Univ Med J* 2015;73(5).
- Li Z, Zhang J, Fu Y, Yang L, Zhu F, Liu X, et al. Antioxidant shape amphiphiles for accelerated wound healing. *J Mater Chem B* 2020;8(31):7018-23.
- Fu X, Fang L, Li H, Li X, Cheng B, Sheng Z. Adipose tissue extract enhances skin wound healing. *Wound Repair Regen* 2007;15(4):540-8.
- Ribot JC, Lopes N, Silva-Santos B. $\gamma\delta$ T cells in tissue physiology and surveillance. *Nat Rev Immunol* 2020;1-12.
- Jameson J, Ugarte K, Chen N, Yachi P, Fuchs E, Boismenu R, et al. A role for skin $\gamma\delta$ T cells in wound repair. *Science* 2002;296(5568):747-9.
- De Almeida EB, Cardoso JC, De LIMA AK, De Oliveira NL, De Pontes-Filho NT, Lima SO, et al. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. *J Ethnopharmacol* 2013;147(2):419-25.
- Abdolmaleki A, Zahri S, Asadi A, Wassersug R. Role of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Treatment of Sport Injuries. *Trauma Mon* 2020;25(3):106-12.
- Ghayour MB, Abdolmaleki A, Fereidoni M. Role of extracellular matrix in peripheral nerve regeneration process. 2015.
- Nauta A, Gurtner G, Longaker M. Wound healing and regenerative strategies. *Oral Dis* 2011;17(6):541-9.
- Verma J, Kanoujia J, Parashar P, Tripathi CB, Saraf SA. Wound healing applications of sericin/chitosan-capped silver nanoparticles incorporated hydrogel. *Drug Deliv Transl Res* 2017;7(1):77-88.
- Di Filippo MF, Panzavolta S, Albertini B, Bonvicini F, Gentilomi GA, Orlacchio R, et al. Functional properties of chitosan films modified by snail mucus extract. *Int J Biol Macromol* 2020;143:126-35.
- Matica MA, Aachmann FL, Tøndervik A, Sletta H, Ostafe V. Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action. *Int J Mol Sci* 2019;20(23):5889.
- Liang D, Lu Z, Yang H, Gao J, Chen R. Novel asymmetric wettable AgNPs/chitosan wound dressing: in vitro and in vivo evaluation. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016;8(6):3958-68.

شده است، به بررسی سمیت سلولی فیلم‌های کامپوزیت AgNPs فیکس شده در ماتریس کیتوزان پرداخته شده است. نتایج حاصل از بررسی سمیت سلولی با MTT پس از ۲۴ ساعت تیمار نشان داد که هرچه درصد میزان نقره بیشتر می‌شود میزان زنده ماندن سلولی کمتر می‌گردد.^{۲۷} در نتایج مطالعه‌ی حاضر مشاهده شد که در ۲۴ ساعت پس از تیمار زخم پوش ۲٪ بیشترین درصد سلول‌های زنده و پس از آن با افزایش به ۳٪ سلول‌های زنده کم می‌گردد. در مطالعه‌ی دیگری توسط Kumar و همکاران، سمیت آگارز-کیتوزان حامل نانوذرات نقره (Agarose-chitosan-coated silver nanoparticles) بر روی سلول‌های هلا با MTT بررسی شد. نتایج نشان داد که در روزهای اول تا ششم تیمار توسط آگارز-کیتوزان حاوی نانوذرات نقره زنده ماندن سلول‌های تیمار شده کمتر از کنترل بوده است، اما پس از روز ششم تا ۱۶ کم‌کم زنده ماندن سلول‌ها در گروه کنترل کمتر شده و سلول‌های زنده در گروه‌های تیمار شده با آگارز-کیتوزان حاوی نانوذرات نقره بیشتر بوده است.^{۲۸}

در مطالعه‌ی مشابه دیگری که توسط Rahimi و همکاران انجام گرفته است خواص ضد میکروبی و سمیت کیتوزان حاوی درصدهای مختلف نانوذرات نقره بررسی شده است. نتایج سمیت داربست تهیه شده توسط آنها با روش MTT نشان داده است که هرچه درصد نانوذرات نقره بیشتر می‌شود درصد زنده ماندن سلول‌ها کمتر می‌شود.

15. Kumar A. A Comparative Study on the Efficacy of Chitosan Gel Formulation and Conventional Silver Sulfadiazine Treatment in Healing Burn Wound Injury at Molecular Level. *Asian J Pharm (AJP): Free full text Articles From Asian J Pharm* 2017;11(03).
16. Goodarzi H, Jadidi K, Pourmotabed S, Sharifi E, Aghamollaei H. Preparation and in vitro characterization of cross-linked collagen-gelatin hydrogel using EDC/NHS for corneal tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol* 2019;126:620-32.
17. Abdolmaleki A, Ghayour M-B, Zahri S, Asadi A, Behnam-Rassouli M. Preparation of acellular sciatic nerve scaffold and its mechanical and histological properties for use in peripheral nerve regeneration. *Tehran Univ Med J* 2019;77(2):115-22.
18. Asadi A, Zahri S, Abdolmaleki A. Biosynthesis, characterization and evaluation of the supportive properties and biocompatibility of DBM nanoparticles on a tissue-engineered nerve conduit from decellularized sciatic nerve. *Regene Ther* 2020;14:315-21.
19. Aran S, Zahri S, Asadi A, Khaksar F, Abdolmaleki A. Hair follicle stem cells differentiation into bone cells on collagen scaffold. *Cell Tissue Bank* 2020;21(2):181-8.
20. Bano I, Arshad M, Yasin T, Ghauri MA, Younus M. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. *Int J Biol Macromol* 2017;102:380-3.
21. Lu Z, Gao J, He Q, Wu J, Liang D, Yang H, et al. Enhanced antibacterial and wound healing activities of microporous chitosan-Ag/ZnO composite dressing. *Carbohydr Polym* 2017;156:460-9.
22. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005;16(10):2346.
23. Ramirez JF, Ortiz J, Cuellar JA, Naranjo CA, Jiménez FN, Londoño OM, editors. Synthesis of colloidal silver nanoparticles and their bactericidal effects on E. coli, S. epidermidis and oral plaque. *Journal of Physics: Conference Series*; 2020: IOP Publishing.
24. Wong KK, Liu X. Silver nanoparticles the real "silver bullet" in clinical medicine? *MedChemComm* 2010;1(2):125-31.
25. Tran QH, Le A-T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv Natural Sci: Nanoscience Nanotechnology* 2013;4(3):033001.
26. Fadli AL, Hanifah A, Fitriani A, Rakhmawati A, Dwandaru WSB, editors. Application of silver-chitosan nanoparticles as a prevention and eradication of nosocomial infections due to Staphylococcus aureus sp. *AIP Conference Proceedings*; 2018: AIP Publishing LLC.
27. Wang XH, Wang Z, Zhang J, Qi HX, Chen J, Xu M. Cytotoxicity of AgNPs/CS composite films: AgNPs immobilized in chitosan matrix contributes a higher inhibition rate to cell proliferation. *Bioengineered* 2016;7(5):283-90.
28. Kumar N, Desagani D, Chandran G, Ghosh NN, Karthikeyan G, Waigaonkar S, et al. Biocompatible agarose-chitosan coated silver nanoparticle composite for soft tissue engineering applications. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018;46(3):637-649.
29. Rahimi M, Ahmadi R, Kafil HS, Shafiei-Irannejad V. A novel bioactive quaternized chitosan and its silver-containing nanocomposites as a potent antimicrobial wound dressing: Structural and biological properties. *Mater Sci Eng C* 2019;101:360-9.

Preparation of tissue-engineered wound dressing consisting of chitosan fibers containing silver ion-doped bioactive nanoparticles for wound healing

Mahnaz Mahmoudi Sohi Msc.¹
 Asadollah Asadi Ph.D.^{1*}
 Peyman Brouki Milan Ph.D.²
 Esmail Sharifi Ph.D.³
 Arash Abdolmaleki Ph.D.^{4,5}

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

2- Department of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Department of Tissue Engineering and Biomaterials, Faculty of Advanced Medical Sciences and Technologies, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

4- Department of Engineering Sciences, Faculty of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, Namin, Iran.

5- Bio Science and Biotechnology Researchcenter (BBRC), Sabalan University of Advanced Technologies (SUAT), Namin, Iran.

* Corresponding author: Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, University St., Ardabil, Iran.
 Tel: +98-45-31505187
 E-mail: asady@uma.ac.ir

Abstract

Received: 08 Mar. 2021 Revised: 15 Mar. 2021 Accepted: 13 Jun. 2021 Available online: 22 Jun. 2021

Background: Wound healing is a complicated process involving the proliferation of the epithelial cells, deposition of granulation tissue as well as recruitment of inflammatory cells. It also is a hot topic of research for trauma, orthopedics and general surgery studies. There are many forms of cells involved in this process. This study aimed to design a tissue-engineered wound dressing consisting of chitosan fibers containing silver ion bioactive nanoparticles for wound healing.

Methods: The present study is an experimental study that was conducted in the research laboratory of the Department of Biology of Mohaghegh Ardabili University from April to November 2019. All experiments of this study have been performed under the ethical guideline of Helsinki and in accordance with the Ethics Committee of the Mohaghegh Ardabili University of Ardabil (Iran). The wound dressing of nanofibers was prepared by the sol-gel method. Cytotoxicity was assessed by MTT assay. Then the antimicrobial properties of nanofibers were determined by the disk diffusion method. SEM and AFM images were obtained from nanofibers. Finally, nanofibers were analyzed by the FTIR method.

Results: Results of the prepared tissue-engineered wound dressing consisting of chitosan fibers containing silver ion-doped bioactive nanoparticles showed that cytotoxicity was at an appropriate level. The nanofibers prepared with 2% silver nanoparticles produced a 10 mm inhibition zone against *Staphylococcus aureus* and a 9 mm inhibition zone against *Escherichia coli*. Therefore, the best percentage of scaffolds in the present study was 2%. Also, results of the SEM micrographs and AFM image analysis of the scaffolds showed that the nanofibers had good roughness and a proper structure for cell seeding and attachments. Besides that, FTIR analysis also showed that the prepared nanofibers had standard bonds.

Conclusion: Chitosan-Silver nanoparticles scaffold have antimicrobial activity on Gram-negative and positive bacteria. The results of the toxicity test also showed that it did not have much toxicity on the cultured cells. Therefore, it can be considered for therapeutic applications, such as wound dressing.

Keywords: chitosan, nanoparticles, regeneration, tissue engineering.

