

# Investigating the Antibacterial Property of Silver Nanoparticles in Alginate Wound Dressings

\*Ebrahimi Hosseinzadeh B (PhD)<sup>1</sup>- Hatamian Zarmi A (PhD)<sup>1</sup>- Babapour F (PhD Stu)<sup>2</sup>- Farhangian A (MSc)<sup>1</sup>- Barshan Tashnizi M (PhD)<sup>1</sup>- Nojoki F (PhD Stut)<sup>1</sup>

\*Corresponding Email Address: Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

Email: bahman.ebrahimi@ut.ac.ir

Received: 29/Oct/2018 Revised: 25/Feb/2019 Accepted: 15/May/2019

## Abstract

**Introduction:** Nanosilver is a nanotechnology product with antimicrobial property. It can improve efficiency, reduce cost and increase antimicrobial durability and performance of wound dressing.

**Objective:** This research intended to introduce a dressing that accelerated and improved the wound healing process by keeping the wound area moist and simultaneously prevented colonization by microorganisms and wound infection.

**Materials and Methods:** Silver nanoparticles were trapped in the pores of calcium alginate sheets, and particle loading on films took place. When this dressing is put on a wound, the silver ions are released in the wound area. After loading the silver nanoparticles; their presence in the calcium alginate structure was confirmed by FE-SEM micrographs. Wounds (2 × 2 cm<sup>2</sup>) were made on rats' bodies and images were taken of the wound healing process on the 1st, 7th, and 14th days to study the effect of the dressing on tissues of living organisms.

**Results:** Characterization of silver nanoparticles was carried out by the DLS test and Zeta potential measurement, in which the values of 61.4 nm and -20.83 mV were obtained, respectively. Antibacterial properties were studied and cell toxicity tests were performed to determine the suitable concentration. Results indicate that the optimum concentration was 100 μg/l (or 17.5 μg per unit area of the alginate film). Using the ImageJ software, the surface areas of the wounds were calculated, and histological studies were also conducted on wound healing. Moreover, on the 7th and 14th days, samples were taken of them to carry out histopathological investigations, and changes in skin cell shape were studied.

**Conclusion:** The results of this study suggest that the dressing accelerates simultaneously the process of wound healing and prevents wound infection and postponement of its repair.

**Conflict of interest:** non declared

**Key words:** Alginates \ Dressings \ Nanoparticles

Journal of Guilan University of Medical Sciences \ Volume 28, Issue 3, (No 111), Pages: 13-29

**Please cite this article as:** Ebrahimi Hosseinzadeh B, Hatamian Zarmi A, Babapour F, Farhangian A, Barshan Tashnizi M, Nojoki F. Investigating the Antibacterial Property of Silver Nanoparticles in Alginate Wound Dressings. J of Guilan University of Med Sci 2019; 28(3):13-29.

1. Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran.

2. Department of biotechnology, Faculty of chemical engineering, tarbiat modares university, Tehran, Iran.

## Extended Abstract

**Introduction:** Wound dressing is a suitable protective coating on the wound. It has features such as creating a humid environment, being impermeable to pathogens and incoherence [1]. Calcium alginate is a blood blocking agent and is widely used in dressings because of its abundance, relatively low cost, good biocompatibility and simple jelly-forming mechanism [2].

In this study, the antibacterial agent and the alginate polymer was examined together, and the appropriate concentration of nano-silver for use in dressing was determined, antibacterial release assay and cytotoxicity test were performed and finally, the effect of dressing on the living tissue was investigated.

**Objective:** The dressing was introduced as the accelerating and improving factor of the wound healing process. The purpose of this study is to use silver nanoparticles instead of common antibiotics to create antimicrobial activity and also to use a natural polymer such as alginate instead of traditional sterile dressings to expedite and improve the wound healing process.

### Materials and Methods:

**Dressing preparations**

Calcium alginate films prepared by Kitotek was cut to 5 cm by 5 cm. After determination of the amount of adsorption by each sheet, a number of calcium alginate sheets were immersed for a sufficient time in a solution of colloidal silver nanoparticles prepared from nanoside at a concentration of 50 to 4000 ppm. Sheets were frozen in freezer for 24 hours after removal from the solution [4].

**Morphology of dressing layers:** The morphology of calcium alginate sheets before and after loading nanoparticles on them was investigated by field emission electron microscopy.

**Evaluation of antibacterial properties:** The lyophilized *E. coli* ATCC 25922 was prepared from Bahar Afshan Company. Antimicrobial dilution methods (MICs) and disk diffusion were used to evaluate antibacterial properties.

**Measurement of release of silver nanoparticles from dressing:** For this purpose, dressings measuring 5 cm by 5 cm were placed in an Erlene containing phosphate buffered saline solution (PBS) at pH 7.4.

**Animal experiments:** To evaluate the clinical effect of dressing on wound healing, an animal model study was performed and compared with conventional dressing. Twenty adult male Wistar rats, weighing 200 to 250 g were used in this study. All rats had free access to standard pelleted water and food during the study and exposure was 12 hour dark and 12 hour light. During

the study the laboratory temperature was about 22 to 25 ° C. Anesthesia protocols and analgesic procedures were performed in accordance with the guidelines for the protection of laboratory animals of the European Union.

**Histomorphometric evaluation:** To assess the extent of shrinkage, the formation of cover tissue and overall wound healing until closure, digital photos of the wounds were taken on days 1,7,14 after wound healing.

Finally, Pathological parameters in sections were evaluated by light microscope for evaluation of wound healing quality.

**Results:** The characterization of silver nanoparticles was performed by the Zero-potential dynamic diffraction method and was 61.4 nm and -20.83 mV, respectively. Antibacterial properties and cytotoxicity tests were performed and the results showed in the optimum concentration of 100 µg / l or 17.5 µg / l alginate film surface area. Also, on the 7th and 14th days of the wound, biopsy was done for histopathological studies and changes of skin cell shape were studied.

**Evaluation of average dressing absorption in solution**  
The results showed that the rate of absorption was not significantly different over time. During the experiment it was observed that the alginate sheet absorbs the solution at the exact moment it is placed in the solution. Alginates are composed of large hydrophilic molecules, so alginates tend to bond with water [5]. The reason for the rapid uptake of water is the hydrophilicity of alginate molecules. Hydrophilic dressing is desirable because it absorbs the secretions of the wound by being placed on the wound and thus, facilitates the wound healing process, as well as keeping the environment moist. The average weight of dry sheet was 0.797 g.

**Cytotoxicity test:** Cell viability was assessed by MTT assay and the opacities were read by spectrophotometer. Within 48 hours, the dressing containing nanoparticles at concentrations less than 50 g / ml was 100% viable, and also for the concentrations of 200 g / ml and 100% g / ml 72% and 85%, respectively. It was observed that these values could be acceptable for the percentage of cell viability in the vicinity of silver nanoparticles.

**Histomorphometric evaluations**

In this evaluation, the rate of wound healing was calculated on the first, seventh, and fourteenth days and the two groups were statistically compared. Changes in wound area were significant for the experimental group

between days 7 and 14. Therefore, in the second week of the experiment, the wound healing process in the experimental group occurred at a higher rate.

Histopathological evaluation: Five factors indices have been considered to evaluate the wound healing process, with four levels of progression for each of these five factors. Therefore, the results of the histopathology were somewhat poorly reported. On the 14th day, the epidermis was fully reconstructed and a horny layer was formed. There was a marked inflammatory reaction. Collagen filaments were also found in the dermis with significant thickness. The tissue was vascular with many fibroblasts.

**Conclusion:** Calcium alginate sheet was considered as a layer of dressing and loaded with antibacterial agent of silver nanoparticles. As a result, a dressing is created

that enhances the wound healing process simultaneously, prevents wound infection and delays wound healing. FE-SEM photos confirm the loading and show a somewhat uniform distribution of alginate particles. The antibacterial property of the dressing was evaluated by the minimum inhibitory concentration method and it was found that concentrations higher than 100  $\mu\text{g} / \text{ml}$  exhibit antibacterial activity in the dressing. The dressing causes toxicity at concentrations above 200  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . The release efficiency of silver nanoparticles in PBS release medium was about 80%. The effect of dressing on the wound healing process in the living body (rat) was investigated and it was found that the presence of contracted wound dressing and epithelialization was evident. There will certainly be no risk in dynamic conditions.

## References

- [1] Paul W, Sharma CP. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends Biomater Artif Organs* 2004; 18: 18-23.
- [2] Orive G, Tam SK, Pedraz JL, Hallé J-P. Biocompatibility of alginate–poly-l-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials* 2006; 27: 3691-3700.
- [3] Thomas S. Alginate dressings in surgery and wound management—Part 1. *Journal of wound care* 2000; 9: 56-60.
- [4] Clark R, Bradbury S. SILVERCEL® non-adherent made easy. *Wounds International*, London 2010.

# بررسی ویژگی ضد باکتریایی نانو ذرات نقره در پانسمان‌های آلژیناتی

\*دکتر بهمن ابراهیمی حسین زاده (PhD)<sup>۱</sup> - دکتر اشرف السادات حاتمیان زارمی (PhD)<sup>۱</sup> - فاطمه باباپور (PhD Stu)<sup>۲</sup> - آتنا فرهنگیان

<sup>۲</sup>(MSc) - دکتر محمد برشان تشنیزی (PhD)<sup>۱</sup> - فهیمه نوجوکی (PhD Student)<sup>۱</sup>

\*نویسنده مسئول: گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران، تهران، ایران

پست الکترونیک: bahman.ebrahimi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۰۸/۰۷ تاریخ ارسال جهت اصلاح: ۹۷/۱۲/۰۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۲/۲۵

## چکیده

مقدمه: نانوذره نقره یکی از محصولات نانو تکنولوژی است که ویژگی ضد میکروبی دارد. نانوذره نقره می‌تواند موجب بهبود کارایی، کاهش هزینه‌های ضد میکروبی و افزایش دوام و کارایی پانسمان گردد.

هدف: شناساندن پانسمانی که همزمان با شتاب دهی و بهبود روند بازسازی زخم، با نمدار نگه داشتن محیط آن از ایجاد کلونی میکروارگانیسم‌ها و عفونی شدن زخم پیشگیری کند.

مواد و روش‌ها: نانو ذرات نقره را در منافذ برگه‌های کلسیم آلژینات به دام انداخته و بارگذاری ریزه‌ها بر روی فیلم انجام شد. با جایگیری پانسمان بر روی زخم، یون‌های نقره در محیط زخم رها می‌شوند. پس از بارگذاری تایید وجود نانوذرات نقره در ساختار کلسیم آلژینات با استفاده از نگاره میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) انجام شد. در بررسی اثر پانسمان بر بافت موجود زنده نخست زخم‌هایی با ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر مربع بر بدن موش‌های صحرایی ایجاد و در روزهای ۱، ۷ و ۱۴ از روند ترمیم زخم‌ها عکسبرداری شد و با نرم‌افزار ایمج جی مساحت زخم برآورد و بررسی هیستومورفولوژی نیز انجام شد.

نتایج: شناسایی نانوذرات نقره به روش تفرق دینامیک نورو پتانسیل زتا انجام شد و به ترتیب ۶۱/۴ و ۲۰/۸۳- میلی‌ولت بدست آمد. بررسی ویژگی‌های ضدباکتریایی و آزمون سمیت سلولی انجام و نتایج به انتخاب غلظت بهینه ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر یا ۱۷/۵ میکروگرم به ازای واحد سطح فیلم آلژینات انجامید. همچنین در روزهای ۷ و ۱۴ از زخم برای بررسی هیستوپاتولوژی نمونه برداری شد و تغییر شکل سلول‌های پوست بررسی شد.

نتیجه‌گیری: پانسمان به طور همزمان روند ترمیم زخم را شتاب داده و از ایجاد عفونت زخم و درنگ در بازسازی آن پیشگیری می‌کند.

کلید واژه‌ها: آلژینات ها / پانسمان‌ها / نانوذرات‌ها

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره ۲۸ شماره ۳ (پای‌دربی ۱۱۱)، صفحات: ۲۹-۱۳

## مقدمه

از مشکلات اساسی پزشکی آسیب‌دیدگی‌های پوستی است که سالانه میلیون‌ها نفر برای پرهیز از مرگ، ناتوانی و در نتیجه آشفته‌گی در کیفیت زندگی نیازمند درمان مناسب هستند (۱). زخم‌های پوستی دربردارنده زخم‌های حاد و مزمن است (۲) ترمیم پرشتاب زخم‌ها و کاهش مدت التیام زخم و ایجاد نشدن عفونت همواره یکی از نگرانی‌های جامعه پزشکی بوده‌است. فرایند ترمیم زخم می‌تواند به چهار فاز پیاپی شامل فاز هموستاز، التهابی، تکثیر و رشد و بازآرایی رده‌بندی شود (۳). پانسمان زخم قرار دادن پوشش حفاظتی مناسب بر روی زخم است که افزون بر استریل بودن ویژگی‌هایی مانند ایجاد محیطی نمدار، غیرقابل رخنه در برابر عوامل بیماری‌زا و نداشتن چسبندگی را دارا باشد. هنگام انتخاب یک پانسمان، عواملی مانند زمان التیام،

هزینه‌های پرستاری، تناوب تعویض پانسمان و نیاز به موارد دیگر مانند پانسمان‌های ثانویه، آنتی‌بیوتیک‌ها و مسکن‌ها نیز باید در نظر باشد (۴). به طور کلی پانسمان‌ها به دو دسته پانسمان‌های سنتی و امروزی تقسیم‌بندی می‌شوند. این پانسمان‌ها شامل گازهای پنبه‌ای سنتی، فیلم، هیدروکلوئید، فوم، پانسمان‌های بیولوژی حاوی بیومواد مانند کلاژن، الاستین، اسید هیالورونیک، کیتوسان و آلژینات است (۱۲-۴). پانسمان‌های کنشگر همواره با عوامل ضد میکروبی مثل آنتی‌بیوتیک موضعی، سولفادiazین نقره‌ای و عوامل آنزیمی آمیخته شده‌اند.

کلسیم آلژینات یک عامل بندآورنده جریان خون است و به دلیل فراوانی، هزینه کم‌بیش پایین، زیست سازگاری خوب و مکانیزم ژله‌ای شدن ساده در پانسمان‌ها استفاده

۱. گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

این پژوهش استفاده از نانو ذره نقره به جای آنتی‌بیوتیک‌های رایج برای ایجاد ویژگی ضد میکروبی و همچنین، استفاده از پلیمری طبیعی مانند آلژینات به جای پانسمن‌های (گاز استریل) سنتی برای شتاب و بهبود روند بازسازی زخم بوده است. در این پژوهش عامل ضدباکتریایی در کنار پلیمر آلژینات قرار داده شد و پس از تعیین غلظت مناسب نانونقره برای استفاده در پانسمن آزمون رهائش عامل ضدباکتریایی و آزمون سمیت سلولی انجام و در نهایت اثر پانسمن بر بافت موجود زنده بررسی شد.

### مواد و روش‌ها

**آماده‌سازی پانسمن‌ها:** فیلم‌های کلسیم‌آلژینات خریداری شده از شرکت کیتوتک به ابعاد ۵×۵ سانتی‌متر مربع برش داده شدند. پس از تعیین میزان جذب محلول توسط هر ورق، تعدادی از ورق‌های کلسیم‌آلژینات برای مدت کافی در محلول نانوذره نقره کلوییدی تهیه شده از شرکت نانوسید با غلظت ۵۰ تا ۶۰۰۰ ppm شناور شدند. ورق‌ها پس از بیرون آوردن از محلول برای ستردن حلال به مدت ۲۴ ساعت در فریز درایر قرار داده شدند (۲۲).

**تعیین زمان لازم قرارگیری فیلم در محلول و جذب محلول:** برای تعیین زمان مورد نیاز برای آن که فیلم‌های آلژینات در محلول قرار گیرند، ۵ فیلم آلژینات به مدت زمان‌های ۵، ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۶۰۰ ثانیه در محلول قرار داده سپس، وزن و مقایسه انجام و اندازه‌گیری‌ها همگی سه بار تکرار شد. با این اندازه‌گیری مدت لازم برای اشباع ورق از محلول تعیین شد. با تعیین این مقدار محاسبه‌ی جرم، میزان ذرات نانونقره قرار گرفته روی هر فیلم هم امکان‌پذیر می‌شود.

**تعیین پراکنش اندازه نانوذرات نقره و تعیین بار سطحی با شگرد پتانسیل زتا:** برای تعیین توزیع ذرات موجود از روش پراکنش نور دینامیک (DLS) Dynamic Light Scattering استفاده شد. از این روش برای اندازه‌گیری اندازه ریزه‌ها در محیط مایع استفاده می‌شود. بار سطحی و توزیع اندازه ذرات نقش کلیدی در پایداری کلوییدی ایفا

می‌شود (۱۳). آلژینات به شکل هیدروژل، شبکه فیبری الکتروریسی یا داربست‌های متخلخل استفاده می‌شود (۱۴ و ۷). هیدروژل‌های آلژینات از محلول‌های آبی آلژینات در حضور کاتیون‌های دو ظرفیتی مانند  $Ca^{2+}$ ،  $Mg^{2+}$ ،  $Ba^{2+}$  و  $Sr^{2+}$  ایجاد می‌شوند (۱۵). ویژگی آلژینات در ایجاد ژل باعث می‌شود که تعویض پانسمن بدون آسیب جدی انجام شود و دردی که بیمار در طول تعویض پانسمن احساس می‌کند کاهش یابد (۱۶). یک پانسمن دلخواه افزون بر تأمین پوشش حفاظتی مناسب برای محیط، باید به‌طور همزمان توان رهائش عواملی در نسبتاً درازمدت با دوز مناسب و کمابیش ثابتی برای فرایند بهبود زخم را داشته باشد (۱۷). این برتری در پایان از دید بحث هزینه‌ها هم برای بیمار و هم برای سیستم سلامت بسیار به صرفه خواهد بود.

اکنون شکل‌های مختلفی از نقره مانند کرم سولفادایزین نقره و پانسمن‌های حاوی نیترات نقره به عنوان عامل ضد میکروبی در پانسمن‌ها به کار گرفته می‌شوند (۱۸ و ۱۹). در حالت ایده‌آل، نقره اگر یونیزه شده نباشد با بدن انسان واکنش نخواهد داد ولی در حالت یونیزه زیست فعال خواهد بود. ترابرد نقره از حالت غیر یونیزه به یونیزه می‌تواند از حضور رطوبتی مانند آن چه در محیط زخم وجود دارد ناشی شود. بنابراین، زمانی که نقره یونی می‌شود، یون‌های نقره همراه با دیگر یون‌های زیست فعال رها می‌شوند. سپس، این یون‌ها به پروتئین‌ها می‌پیوندند، که معمولاً در سطوح سلول‌های مختلف مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها پیدا می‌شوند (۲۰). توان نقره به عنوان عامل ضد میکروبی به میزان و نرخ رهائش نقره آزاد به بستر زخم، مربوط می‌شود. در نتیجه پانسمن‌های حاوی نیترات نقره باید در طول روز چندین بار تعویض شده یا آن که هر دو ساعت مرطوب شوند (۲۱).

نخست، پانسمن‌های سنتی مقرون به صرفه‌تر به نظر می‌رسند ولی کمبودها از یک سو و هزینه بالای استفاده از نمونه‌های خارجی ایجاب می‌کند که چنین دستاوردی به طور ملی تولید شود تا بیماران بتوانند با صرف هزینه‌ای مناسب از مزایای چنین پانسمن‌هایی بهره‌مند شوند. هدف

می‌کنند. از دید کمی می‌توان بار سطحی را توسط تکنیک پتانسیل زتا اندازه‌گیری کرد.

**بررسی مورفولوژی لایه‌های پانسمان:** مورفولوژی ورق‌های کلسیم آلزینات پیش و پس از بارگذاری ذرات نانونقره بر آنها با میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی مدل HITACHI S-4160 با ماکزیمم ولتاژ کاری ۳۰KV بررسی شد. پیش از دیدن، پانسمان‌ها با دستگاه لایه نشانی خنک طلا SCD005 (تولید کمپانی بال\_تک، انگلستان)، با طلا پوشش داده شد. اندازه ذره‌های نانونقره و نمودارهای توزیع اندازه ذرات نانونقره در نگاره میکروسکوپ الکترونی روبشی Scanning Electron Microscope (SEM) حاصله با نرم افزار آنالیز ایمپج جی اندازه‌گیری شد.

**استریل کردن نمونه‌ها:** نمونه‌های مرحله حیوانی با ابعاد ۵×۵ سانتی‌متر مربع و نمونه آزمون‌های ضدباکتریایی و آزمون سمیت سلولی با ابعاد ۱ سانتی‌متر مربع آماده سازی شدند. برای استریل کردن نمونه‌ها فرایند استریلیزاسیون با گاز اکسید اتیلن بکار رفت.

**بررسی ویژگی‌های ضدباکتریایی:** باکتری لیوفلیزه شده *E. Coli* ATCC 25922 از شرکت بهار افشان تهیه شد. در بررسی خواص ضدباکتریایی روش رقیق‌سازی یا تعیین کمینه غلظت مهارتی (MIC) مواد ضد میکروبی و انتشار دیسک بکار رفت. برای تهیه سوسپانسیون استاندارد میکروبی یگراست از کلونی‌های ایزوله روی پلیت، استفاده شد. مولر هیتتون براث مناسب‌ترین محیط کشت موجود برای تعیین میزان حداقل غلظت مهارتی Minimum Inhibitory Concentration (MIC) است (۱۰). ماده ضد میکروبی به دو حالت به محیط کشت افزوده شد. حالت اول دربرگیرنده فزودن محلول کلونیدی حاوی نانوذرات نقره با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ ppm به محیط کشت بود (حالت Ag NPs). در حالت دوم نانوذرات نقره بر فیلم‌های آلزینات بازگذاری شدند (حالت Ag NPs -Alg). میزان بارگذاری نانوذرات نقره بر هر فیلم به ابعاد ۱ سانتی‌متر مربع به گونه‌ای بود که به غلظت‌های دلخواه برسد. در پایان از هر کدام از نمونه‌ها برداشته و در یخچال گذاشته شد.

نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور بدون دی‌اکسیدکربن در دمای ۳۷ °C قرار داده شدند. نتایج لوله‌های دارای کدورت، مثبت و لوله‌های بدون کدورت، منفی نگاشته شد و کمترین رقت از هر حالت که هیچ کدورت میکروبی در آن دیده نمی‌شد، به عنوان کمینه غلظت مهارتی درنگر آورده شد.

در آزمون انتشار دیسک، دیسک‌هایی از پانسمان آماده و به صورت یکنواخت بر ظرف حاوی مولر هیتتون آگار که از پیش با باکتری تلقیح شده است قرار داده می‌شود تا بازه دیسک‌ها از مرکز یک دیسک تا دیسک پسین کمتر از ۲۴ میلی‌متر نباشد. سپس، در دیش پتری بسته شده با پارافیلیم عایق‌بندی و دیش پتری به پشت برگردانده شده و به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد. پس از گذشت این زمان اندازه هاله رشد نکردن باکتری برای تعیین خاصیت ضد میکروبی پانسمان بررسی شد. در این حالت پانسمان‌ها با غلظت‌های مختلف نانونقره به صورت دیسک‌های با قطر یک سانتی‌متر بریده شده و در محیط کشت گذاشته شدند. پانسمان‌ها با میزان بارگذاری نقره ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ ppm بررسی شدند (۲۳ و ۲۴).

**آزمون سمی بودن سلولی:** رده سلولی فیروپلاستی L929 به صورت فلاسک حاوی سلول تازه کشت شده از بانک سلولی پاستور خریداری و به انکوباتور CO<sub>2</sub> با رطوبت ۹۰ درصد ترابرد شد. سلول‌ها پس از رسیدن به تراکم کافی (۸۵-۸۰ درصد) پاساژ داده شدند. برای این کار محیط کشت فلاسک کاملاً تهی‌سازی و با استفاده از آنزیم تریپسین سلول‌ها از کف فلاسک جدا می‌شوند. در گامه پسین محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی به فلاسک افزوده می‌شود تا جلوی ویران‌سازی سلول‌های جدا شده توسط تریپسین گرفته شود. محیط حاوی سلول را ۵ دقیقه و در دور ۱۳۰g سانتریفیوژ کرده و محیط روئین با محیط تازه جایگزین شد. سوسپانسیون سلولی بین چند فلاسک بخش و چند ویال از آن منجمد و اندوخته شد.

برابر موارد مطرح شده در استاندارد ISO 10993-12، افشره‌گیری از نمونه انجام شد که طی آن به ازای هر ۰/۶

آماده سازی قبل از جراحی و ایجاد زخم: برای القای بیهوشی از کتامین به میزان ۷۵ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن حیوان و زایلازین به مقدار ۱۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان به صورت عضلانی استفاده شد. بیهوشی عمومی با استفاده از تزریق عضلانی دو داروی زایلازین (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) و کتامین (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) ایجاد شد. پس از القای بیهوشی، موهای جای عمل تراشیده و سپس با محلول بتادین ۱۰ درصد ضدعفونی شد. بدون اسکراب با یک شابلون در ناحیه پشت رت‌ها یک زخم به ابعاد ۲ در ۲ سانتی متر به صورت تمام ضخامت با تیغ بیستوری نمره ۱۵ ایجاد شد. پس از ایجاد زخم، رت‌ها به صورت تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. در گروه آزمایش از پانسمان‌های طراحی شده استفاده شد و در گروه کنترل زخم‌ها با گاز استریل ۴ لایه پوشانده شدند. هر سه روز یک بار زخم‌ها شستشو و پانسمان‌ها تعویض شد.

**ارزیابی هیستومورفومتری:** برای ارزیابی میزان انقباض و تشکیل بافت پوششی و التیام کلی زخم‌ها تا زمان بسته شدن در روزهای ۷، ۱۴ و ۱۷ پس از ایجاد زخم، نگاره‌های دیجیتال از آنها تهیه شد. به عنوان تعیین مرجع اندازه زخم در نزدیک لبه زخم یک خط‌کش مدرج گذاشته شد و به کمک نرم‌افزار آنالیز تصاویر دیجیتالی ایمیج جی در هر تصویر مساحت کلی زخم (اندازه زخم از لبه پوست سالم) اندازه‌گیری شد. در این مطالعه میزان التیام کلی زخم (میلی‌مترمربع) برآورد و بین گروه‌های مطالعه مقایسه شده. سپس، همه داده‌ها با آزمون آماری t-student بررسی شد.

**ارزیابی هیستوپاتولوژی:** متغیرهای آسیب‌شناسی در برش‌ها برای ارزیابی جلوگیری التیام زخم با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی و سپس از آنها در زیر میکروسکوپ عکس تهیه و شاخص‌های مختلفی ارزیابی کمی شد. در جدول ۱ امتیاز مربوط به جزئیات هر شاخص آورده شده است (۲۴).

سانتی‌متر مربع برش نمونه، ۰/۱ میلی‌لیتر محیط به ظرف حاوی نمونه افزوده شد و به مدت ۲ روز درون انکوباتور حاوی گاز دی‌اکسیدکربن ۵ درصد و دمای کشت  $37^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد. حجم مشابهی از محیط کشت نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پانسمان‌هایی به ابعاد ۱ سانتی‌مترمربع آماده‌سازی و استریل شد. پانسمان‌ها با غلظت‌های مختلف  $50, 100, 200, 400, 500, 1000$  و  $2000$  g/ml و نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت افشردگی شده و به مدت ۴۸ ساعت در مجاورت سلول قرار داده شد نمودار درصد زنده مانی پس از ۴۸ ساعت رسم شد.

**اندازه‌گیری رهائش نانو ذرات نقره از پانسمان:** برای اندازه‌گیری میزان رهائش یون نقره، پانسمان‌هایی به ابعاد  $5 \times 5$  سانتی‌مترمربع در یک ارلن حاوی محلول نمک فسفات با ویژگی بافری (PBS) Phosphate buffered saline با pH ۷/۴ قرار داده شد. برای پیشگیری از تبخیر محتویات ارلن، آن را با پارافیلیم مسدود کرده و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و دور  $50\text{rpm}$  به مدت ۸ ساعت در گرمخانه گذاشته شد. در فواصل زمانی مشخص از محیط رهائش برداشته شد و برای آن که حجم محیط رهائش ثابت بماند، پس از هر بار برداشتن نمونه حجم مساوی با نمونه از محلول PBS تازه با دمای  $37^{\circ}\text{C}$  جایگزین شد. با استفاده از اسپکتروفوتومتر میزان یون نقره در نمونه‌ها در طول موج  $413$  نانومتر اندازه‌گیری شد. نمودار تجمعی نفوذ دارو در زمان رسم شد. **آزمایش‌های حیوانی (فاز دوم):** به منظور ارزیابی‌های بالینی اثر پانسمان بر روند التیام زخم، مطالعه مدل حیوانی انجام شد و با پانسمان معمولی مقایسه شد. در این مطالعه از ۲۰ رت نر بالغ نژاد ویستار، با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم و سن ۸ تا ۱۲ هفته استفاده شد. تمامی رت‌ها در طول مطالعه دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد پلت شده داشتند و میزان نوردهی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی بود. در طول مطالعه دمای آزمایشگاه در حدود  $22^{\circ}\text{C}$  تا  $25^{\circ}\text{C}$  بود. پروتکل‌های بیهوشی و روش‌های ایجاد بی‌دردی در حیوانات مورد مطالعه طبق دستورالعمل‌های مربوط حمایت از حیوانات آزمایشگاهی اتحادیه اروپا به انجام رسید.

جدول ۱. امتیازهای مربوط به شاخص‌های ارزیابی کیفیت التیام زخم

شاخص	امتیاز	شاخص	امتیاز
تشکیل بافت پوششی	۰	حضور فیروبلاست	۰
	۱	عدم حضور	۰
	۲	حضور خفیف در اطراف بافت	۱
	۳	حضور خفیف بصورت جوانه گوشتی	۲
	۴	حضور متوسط	۳
	۰	حضور برجسته	۴
حضور سلول‌های التهابی	۰	تشکیل عروق جدید	۰
	۱	عدم حضور	۰
	۲	حضور خفیف (کمتر از ۲۵ درصد)	۱
	۳	حضور خفیف (بین ۲۵ تا ۵۰ درصد)	۲
	۴	حضور متوسط (بین ۵۰ تا ۷۵ درصد)	۳
	۰	حضور برجسته (بیش از ۷۵ درصد)	۴
رشته‌های کلاژن	۰	عدم حضور	۰
	۱	حضور خفیف در اطراف بافت	۱
	۲	حضور خفیف بصورت جوانه گوشتی	۲
	۳	حضور متوسط	۳
	۴	حضور برجسته	۴

## نتایج

هر ورق با ابعاد مشخص در حدود ۳/۸ برابر وزن نخستین خود توان جذب آب را دارد و با توجه به آن چه از آلژینات انتظار می‌رود این میزان جذب بخردانه و مطلوب است. با توجه به وزن محلول جذب شده و این که محلول کلوییدی نانونقره دانسیته‌ای برابر آب (۱g/ml) دارد، می‌توان میزان محلول کلوییدی که بر ورق آلژینات بارگذاری می‌شود و وزن نقره قرار گرفته در ساختار را محاسبه کرد. با طولانی‌تر شدن زمان قرارگیری فیلم در محلول آبی تغییری در نمای فیلم ایجاد نمی‌شود و گذشت زمان در میزان جذب محلول هم تأثیری ندارد.

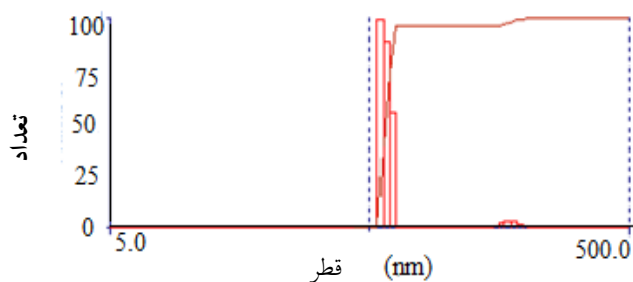
**تعیین بخشایش اندازه نانوذرات نقره:** برای تعیین اندازه ریزه‌ها در محلول کلوییدی نانونقره از روش DLS استفاده شد. به طور کلی هر چه توزیع اندازه ذرات یکنواخت‌تر باشد، در پایان نانوذرات ویژگی‌های همگن‌تری ارائه می‌دهند. برای پیشگیری از آگلومره شدن ذرات پیش از هر بار استفاده از محلول حاوی نانوذرات، محلول تحت هم‌ژنایزر اولتراسونی قرار داده می‌شد. نمودار توزیع ذرات در محلول کلوییدی در شکل ۱ آورده شده است.

**بررسی متوسط جذب پانسیمان در محلول:** در جدول ۲ میانگین جذب هر پانسیمان در زمان لازم برای آن که پانسیمان از محلول اشباع شود با سه بار تکرار نمایانده شده است.

جدول ۲. متوسط وزن پانسیمان‌های با ابعاد ۵cm×۵cm پس از جذب محلول					
زمان در معرض قرارگیری (ثانیه)	۵	۱۰	۳۰	۶۰	۶۰۰
متوسط جذب (g)	۲/۹۸۹	۳/۵۲۰	۲/۸۳۵	۲/۴۵۹	۳/۲۹۲

نتایج نشان داد که میزان جذب با گذشت زمان تفاوت چندانی ندارد. هنگام آزمایش دیده شد که برگه آلژینات دقیقاً همان دم که در محلول قرار می‌گیرد، در مرحله اشباع محلول را به خود جذب می‌کند. آلژینات‌ها از مولکول‌های بزرگ آب‌دوست تشکیل شده‌اند. بنابراین، آلژینات‌گرایش به پیوستن به آب را دارد (۲۵). و دلیل جذب پرشتاب آب، آب‌دوست بودن مولکول‌های آلژینات است. آب‌دوست بودن پانسیمان از آن جهت دلخواه است که با قرار گرفتن بر زخم، تراوش‌های آن را جذب کرده و با این جذب و همچنین نمناک نگه‌داشتن پیرامون، روند بازسازی زخم را تسهیل می‌کند. میانگین وزن ورق خشک ۰/۷۹۷ g بود.



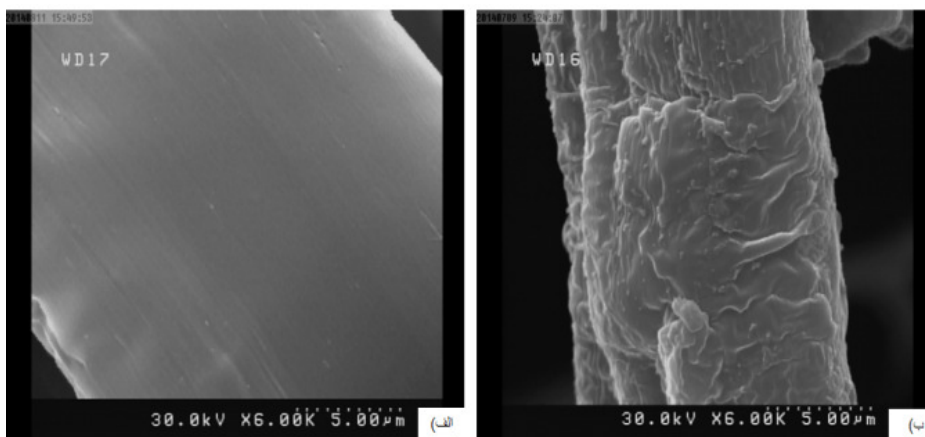


شکل ۱ نمودار توزیع اندازه نانوذره نقره

بررسی مورفولوژی لایه‌های پانسمن: خواص رویه پانسمن‌های کلسیم آلزیناتی و پانسمن‌های کلسیم آلزیناتی بارگذاری شده با نانوذرات نقره توسط تصاویر FE-SEM بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود تصاویر FE-SEM هر دو پانسمن کلسیم آلزیناتی به شکل الیاف است ولی سطح الیاف پانسمن بدون نانوذره نقره برجستگی و شکل ظاهری ویژه‌ای ندارد و سطح کمابیش هموار دیده می‌شود.

اندازه ذرات موجود در محلول به طور متوسط  $61/4$  نانومتر است. پراکندگی نانوذرات از لحاظ شمارگان نشان داد که شمار زیادی از ذرات در یک محدوده کمابیش باریک از لحاظ اندازه قرار می‌گیرند و این نکته به یکنواخت بودن اندازه ذرات اشاره می‌کند که این ویژگی نیز به ایجاد ویژگی‌های همگن‌تری منجر می‌شود.

روش پتانسیل زتا: میزان بار سطحی ذرات با تکنیک پتانسیل زتا اندازه‌گیری شد. به راستی بودن این بارهای سطحی است که به آویزان ماندن ذرات در محلول می‌انجامد. برای نانوذرات موجود مورد استفاده این بار  $20/83$  میلی‌ولت است.

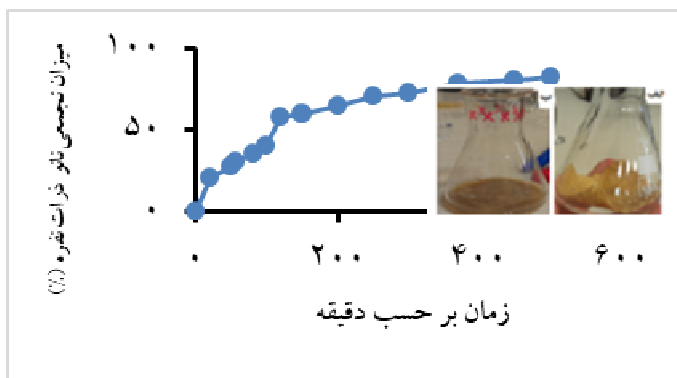


شکل ۲. تصاویر FE-SEM پانسمن‌های الف) کلسیم آلزیناتی قبل و ب) کلسیم آلزیناتی بعد از بارگذاری شدن با نانوذرات نقره

پانسمن با خشک‌کن انجمادی خشک می‌شود، برجستگی‌های ایجاد شده را می‌توان با برون رفت آب محلول نانوذرات نقره طی فرآیند خشک کردن مرتبط دانست. نکته گفتنی آن است که ذرات کروی و ریز موجود در تصویر FE-SEM نیز

این در حالی است که برجستگی‌ها و نقطه‌های کروی در تصویر FE-SEM پانسمن‌های کلسیم آلزیناتی بارگذاری شده با نانو ذرات نقره ایجاد شده‌است. چون نانوذرات نقره به روش غوطه‌وری در پانسمن‌ها بارگذاری شده و سپس این

جذب آب را خواهد داشت (۲۵). محلول PBS که محیط رهایش است در برگیرنده یونهای سدیم است. بنابراین، با تبادل یونی سدیم آلزینات و در پی آن ژل آلزینات تولید می‌شود. ژل آلزینات که اکنون حاوی نانوذرات نقره شده است در تماس با محیط رهایش، آغاز به رهاسازی نانوذرات نقره می‌کند. روند رهایش نانوذرات نقره در شکل ۳ در مدت ۸ ساعت نشان داده شده است.



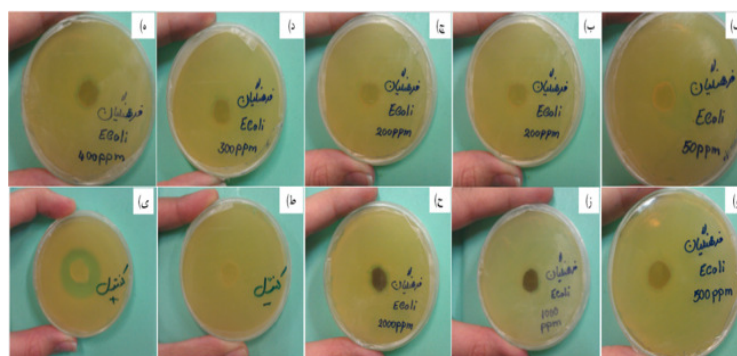
شکل ۳. نمودار مقادیر تجمعی رهایش نانوذرات نقره از فیلم کلسیم آلزینات بر حسب زمان. شمایی از فیلم کلسیم آلزینات حاوی نانو نقره (الف) قبل و (ب) بعد از قرار گرفتن در محلول فسفات بافر سالین به مدت ۸ ساعت

**بررسی ویژگی ضدباکتریایی پانسمان:** ویژگی ضدباکتریایی پانسمان‌ها به دو روش انجام شد. نتایج آزمون کمیته غلظت مهارکنندگی با یک غلظت که در آن رشد باکتری صفر بوده ارائه می‌شود. نتایج رشد باکتری پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری برای دو گروه مورد آزمون انجام شد. هنگامی که نانوذرات نقره به طور مستقیم در محیط کشت قرار می‌گیرند، میزان کمیته غلظت مهارکنندگی (MIC) بر رویه سویه مورد نظر غلظت‌های کمتر از ۱۲/۵ g/ml تعیین شد. حداقل غلظت مهارکنندگی پانسمان ۱۰۰ g/ml است. با توجه به ابعاد ۱ سانتی‌متر مربع نمونه‌ها این غلظت به دست آمده برابر ۱۳/۲g نانو نقره به ازای واحد سطح پانسمان است. نتایج آزمون انتشار از دیسک به صورت هاله بدون رشد گزارش می‌شود. در شکل ۴ عکس هر پلیت پس از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در گرمخانه آورده شده است.

می‌تواند دلیل حضور نانو ذرات نقره در پانسمان‌ها باشد. نتایج بدست آمده از آنالیز اسپکتروفوتومتر پانسمان‌ها، رهایش نانو ذرات نقره را در پانسمان‌های بارگذاری شده با Ag NPs نشان داد که تصویر FE-SEM نیز این نتیجه (حضور نانوذره نقره) را تایید می‌کند.

**پروفایل رهایش نانوذره از پانسمان:** هنگامی که آلزینات در تماس با مایعاتی مانند تراوش زخم قرار می‌گیرد، یون‌های کلسیم با یون‌های سدیم جایگزین می‌شوند و آلزینات توان

چنان که در شکل ۳ دیده می‌شود در ۱۵ دقیقه نخست نزدیک ۲۰ درصد عامل ضدباکتریایی رهایش یافته و به حالت انفجاری نزدیک شده‌است. باقیمانده نانوذرات در حدود ۶ ساعت آینده در محیط آزاد شده‌اند. همچنین گرچه پس از گذشت ۸ ساعت از رهایش هنوز انتهای نمودار حالت خط با شیب صفر پیدا نکرده اما می‌توان بازده رهایش عامل ضدباکتریایی را ۸۰ درصد در نظر گرفت. همچنین شایان توجه است که تا صفر شدن شیب خط انتهایی نمودار همچنان رهایش تدریجی نانوذرات از پانسمان ادامه دارد. این به آن معنی است که پانسمان در بازه‌های زمانی بیش از ۸ ساعت توان رهایش عامل ضدباکتریایی را دارد و این نکته برای پانسمان‌ها یک برتری به شمار می‌آید، زیرا از تعویض پیاپی پانسمان جلوگیری می‌کند. با توجه به نتایج این پژوهش، این هیدروژل برای رهایش کنترل شده ذرات نانوذره نمونه مناسبی است.



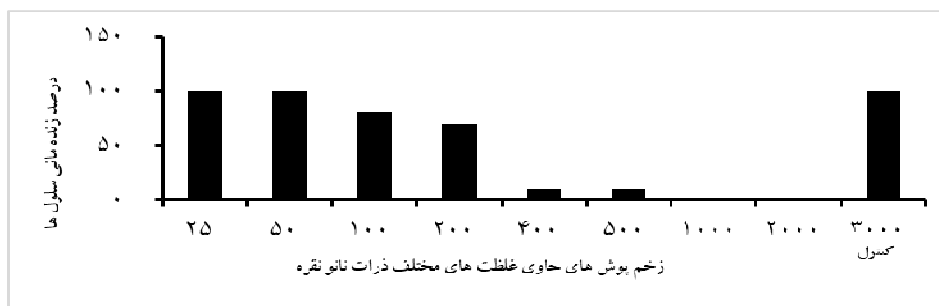
شکل ۴. آزمون بررسی خواص ضدباکتریایی با روش انتشار از دیسک. غلظت‌های مختلف از پانسمن که در محیط کشت قرار داده شده است. الف) ۵۰، ب) ۱۰۰، ج) ۲۰۰، د) ۳۰۰، ه) ۴۰۰، و) ۵۰۰، ز) ۱۰۰۰، ح) ۲۰۰۰، میکروگرم بر لیتر. نمونه‌های (ط و ی) به ترتیب نمونه‌های کنترل منفی هیچ گونه ماده آنتی باکتریال

اسپکتروفوتومتر خوانده شد. تغییر رنگ ظاهری چاهک‌های سلولی تیمار شده با معرف MTT نشانگر میزان زنده‌مانی سلول‌ها در مجاورت پانسمن‌هاست. برپایه شکل ۵ در مدت ۴۸ ساعت برای پانسمن حاوی نانوذرات با غلظت‌های کمتر از ۵۰ g/ml درصد زنده‌مانی ۱۰۰ درصد بوده‌است. همچنین، برای غلظت‌های ۲۰۰ g/ml و ۱۰۰ g/ml هم به ترتیب ۷۲ درصد و ۸۵ درصد زنده‌مانی سلولی مشاهده شد که این مقادیر برای درصد زنده‌مانی سلول در مجاورت نانوذرات نقره عددی پذیرفتنی است.

پس از پایان گام‌های آزمون ضدباکتریایی، سمیت سلولی و رهایش از نتیجه حاصل از آنها در کنار یکدیگر استفاده شد تا میزان نهایی از نقره که باید بر پانسمن بارگذاری شود تعیین شود که به طور همزمان فعالیت ضدباکتریایی داشته، همچنین، سمیت سلولی ایجاد نکند.

چنان که در نتایج آزمون انتشار از دیسک دیده می‌شود از غلظت ۴۰۰ ppm تا غلظت‌های بالاتر هاله بدون رشد را به خوبی می‌توان دید. این هاله به این معنی است که حضور نانوذرات نقره در پانسمن و رهایش آن هنگام قرار گرفتن در محیط از رشد باکتری جلوگیری کرده‌است. بالاتر بودن این غلظت نسبت به غلظتی که در آزمون حداقل غلظت مهار کنندگی بدست آمد را می‌توان به تدریجی بودن رهایش ذرات مربوط دانست. در غلظت‌های بالا آن میزانی که نخست رهایش می‌یابد طبیعتاً بیشتر خواهد بود، بنابراین، موفق به جلوگیری از رشد می‌شود، حال آن که در غلظت‌های پایین‌تر، چون که تمام عامل ضدباکتریایی در لحظه پانسمن در محیط آزاد نمی‌شود، بنابراین تا حدودی رشد مشاهده می‌شود.

آزمون سمی بودن سلولی: میزان زنده ماندن سلولی با روش رنگ سنجی MTT بررسی و کدورت‌ها با دستگاه



شکل ۵. نمودار درصد زنده‌مانی سلول‌ها در مدت زمان ۴۸ ساعت در مجاورت پانسمن‌های حاوی غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره

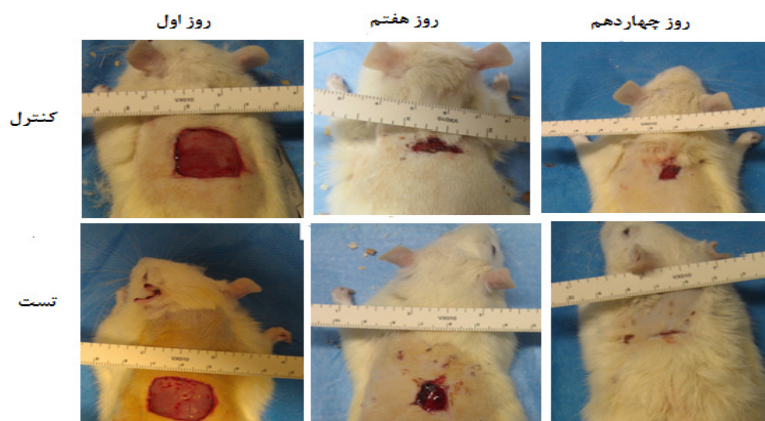
بدن موجود زنده (بیست عدد موش صحرایی نر) پرداخته می‌شود.

ارزیابی‌های هیستومورفومتری: در این ارزیابی میزان ترمیم زخم در روز اول، ۷ و ۱۴ محاسبه شد و دو گروه از لحاظ

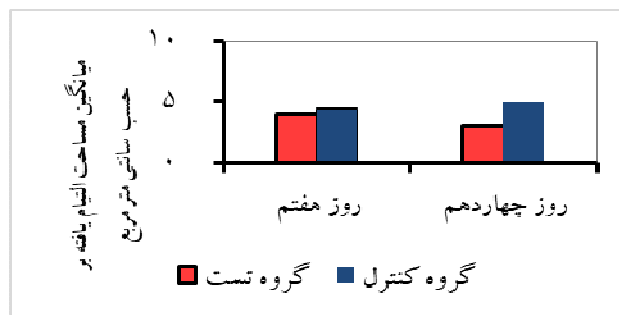
آزمایش‌های حیوانی: تا به اینجا پانسمن از لحاظ ویژگی‌های فیزیکی و رفتارهای آزمایشگاهی ارزیابی شد. در این بخش از مطالعه به بررسی و مقایسه اثر پانسمن تولید ساخته شده در این پژوهش با پانسمن‌های معمولی بر روند ترمیم زخم در

آپی درم مشاهده می‌شود. واکنش التهابی تک‌هسته‌ای خفیف وجود داشته و فیبروبلاست‌ها به میزان قابل توجهی دیده می‌شوند. عروق خونی فراوان بوده و رشته‌های کلاژن تشکیل شده در درم دیده می‌شود. در روز ۱۴ می‌توان مشاهده کرد آپی درم کاملاً بازسازی شده و لایه شاخی نیز تشکیل شده است. واکنش التهابی قابل ملاحظه‌ای دیده می‌شود. رشته‌های کلاژن نیز در درم با ضخامت قابل توجه دیده می‌شود. بافت پر عروق بوده و تعداد زیادی فیبروبلاست دیده می‌شود.

آمارای مقایسه شدند. برای بررسی مورفومتری در روزهای ۱، ۷ و ۱۴ از زخم‌ها عکس برداری و مساحت زخم‌ها با نرم‌افزار ایمیج جی محاسبه و اختلاف مساحت زخم‌ها در روزهای ۷ و ۱۴ نسبت به روز اول اندازه‌گیری شد (شکل ۶). مساحت التیام یافته زخم در واقع گردآوری از انقباض زخم و آپی‌تلیالیزاسیون است، بنابراین، تغییر مساحت زخم به طور همزمان ناشی از پیشروی این دو فرایند خواهد بود (شکل ۷). همانطور که در شکل ۷ گروه کنترل در روز ۱۴ می‌توان دید آپی درم از یک سمت در حال بازسازی است. اگرچه آپی درم بازسازی شده ولی کامل نیست. مهاجرت سلول‌های پوششی



شکل ۶. Error! No text of specified style in document. از زخم مربوط به گروه کنترل و آزمایش در روزهای ۱، ۷ و ۱۴ پس از ایجاد ضخم با ضخامت کامل



شکل ۷. نمودار میانگین مساحت التیام یافته در دو گروه

بین روزهای ۷ و ۱۴ معنی‌دار است. بنابراین، در هفته دوم آزمایش، روند ترمیم زخم در گروه آزمایش با شتاب بیشتری رخ داده است.

در جدول ۳ تحلیل آماری نتایج هیستومورفومتری مساحت زخم‌ها بین گروه آزمایش و گروه کنترل و همچنین، مساحت زخم‌ها در روزهای ۷ و ۱۴ در هر گروه مقایسه شده است. مشاهده می‌شود که تغییر مساحت زخم‌ها در گروه آزمایش

جدول ۳. مقایسه نتایج هیستومورفومتری در روزهای ۷ و ۱۴ برای هر دو گروه آزمایش و کنترل

p-value	روز چهاردهم	روز هفتم		
۰/۰۵	۵/۱۶۹	۳/۴۸۲	Mean	گروه آزمایش
	۴/۴۵۸	۳/۳۰۱	median	
	۱/۵۴۰	۱/۴۳۳	Std.Dev	
	۰/۶۸۹	۰/۴۵۳	Std.Err	
۰/۶۱۴	۴/۴۵۱	۴/۲۰۰	Mean	گروه کنترل
	۴/۴۹۵	۴/۱۵۹	median	
	۰/۹۱۰	۰/۸۵۱	Std.Dev	
	۰/۴۰۷	۰/۲۸۳	Std.Err	

تفاوت ممکن است به دلیل حضور نقره در پانسمان باشد که باعث ایجاد کانون‌های التهابی شده است.

جدول ۴ امتیاز هیستوپاتولوژی را در روز ۱۴ بین دو گروه کنترل و آزمایش نشان می‌دهد بین حضور سلول‌های التهابی و تشکیل بافت پوستی از لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار است. همان‌طور که انتظار می‌رفت در روز ۱۴، گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل از لحاظ تشکیل بافت پوستی تفاوت فاحشی داشت.

**ارزیابی هیستوپاتولوژی:** برای بررسی روند ترمیم زخم از لحاظ هیستوپاتولوژی پنج شاخص عامل در نظر گرفته شده است و برای هر کدام از این پنج عامل چهار سطح از پیشرفت آورده شده است. بنابراین، نتایج هیستوپاتولوژی تا حدودی به صورت کمی گزارش شده‌اند. در جدول ۴ روند هیستوپاتولوژی ترمیم زخم بین گروه‌های آزمایش و کنترل در روز ۷ و ۱۴ دیده می‌شود، در روز ۷ تنها در مورد حضور سلول‌های التهابی و کلاژن تفاوت موجود معنی‌دار است. این

جدول ۴. بررسی امتیازهای هیستوپاتولوژی بافت‌ها در روز ۷ و ۱۴

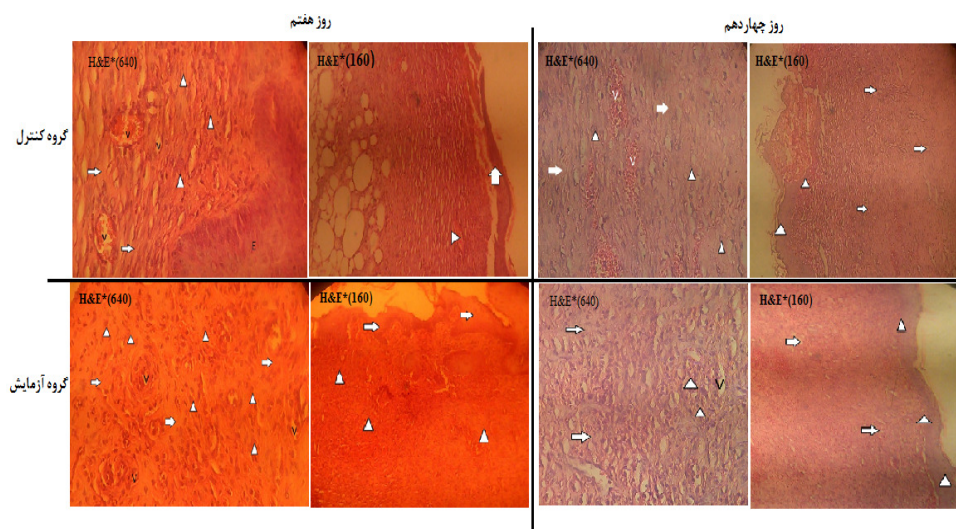
تشکیل بافت پوستی		سلول‌های التهابی		فیبروبلاست		عروق جدید		روز هفتم	
آزمایش	کنترل	آزمایش	کنترل	آزمایش	کنترل	آزمایش	کنترل	آزمایش	کنترل
۱	۱	۲	۲	۴	۴	۴	۴	۴	۳
۱	۱	۳	۲	۴	۴	۴	۴	۳	۳
۲	۱	۲	۱	۴	۴	۴	۴	۴	۳
۱	۱	۳	۱	۴	۴	۴	۴	۴	۳
۱	۱	۲	-	۴	-	۴	-	۴	۳
p=۰/۴۰۷		p=۰/۰۴۷		p=۱		p=۱		p=۰/۰۰۹	
تشکیل بافت پوستی		سلول‌های التهابی		فیبروبلاست		عروق جدید		روز چهاردهم	
آزمایش	کنترل	آزمایش	کنترل	آزمایش	کنترل	آزمایش	کنترل	آزمایش	کنترل
۴	۲	۳	۲	۴	۴	۴	۴	۴	۴
۴	۲	۳	۲	۴	۴	۴	۴	۴	۴
۴	۲	۳	۲	۴	۴	۴	۴	۴	۴
۴	۱	۲	۲	۴	۴	۴	۴	۴	۴
۴	۲	۳	۱	۴	۴	۴	۴	۴	۴
p=۰/۰۰۰۰۴		p=۰/۰۰۸		p=۱		p=۱		p=۰/۱۴۱	

میزان چشمگیری پیرامون بافت جوانه‌ای دیده می‌شوند. رگ‌های خونی تازه تشکیل شده فراوان بوده و رشته‌های کلاژن در حال تشکیل در درم دیده می‌شود. همچنین، در شکل ۸ در روز ۷ گروه آزمایش می‌توان دید که اپی‌درم در

در روز ۷ کنترل چنان که در شکل ۸ نشان داده شده است اپی‌درم از یک سو در حال بازسازی است. اپی‌درم بازسازی شده و مهاجرت سلول‌های پوششی اپی‌درم مشاهده می‌شود. واکنش التهابی تک هسته‌ای وجود داشته و فیبروبلاست‌ها به

دیده می شود و ضخامت قابل توجهی دارند. بافت پر عروق بوده و تعداد زیادی فیبروبلاست دیده می شود.

حال بازسازی و پیشرفت است. واکنش التهابی چشمگیری وجود دارد. رشته های کلاژن نیز در حال بازسازی



شکل ۸. نمایی از اپی درم در حال نوزایش (E)، عروق تازه تشکیل شده (V) در ناحیه ترمیم همراه با فیبروبلاست ها (نوک پیکان) و رشته های کلاژن تازه تشکیل شده (پیکان)

فیلم های تک لایه ای حاصله نتیجه ای مشابه یافته های این پژوهش است. هیدروژل ها شبکه های پلیمری آب دوست سه بعدی هستند که مقادیر زیادی آب یا مایعات بیولوژی را به درون خود جذب می کنند، با این حال در آب حل نمی شوند. رهایش عامل ضدباکتریایی از آلژینات هیدروژل شده می تواند به سه مکانیسم (۱) رهایش ذرات از سطح هیدروژل، (۲) نفوذ نانوذرات ماتریس متورم شده آلژینات و (۳) رهایش ناشی از فرسایش هیدروژل در محیط خارجی نسبت داده شود (۲۸). در ابتدا نرخ های بالاتری برای رهایش عامل ضدباکتریایی مشاهده می شود و این به دلیل انحلال عامل ضدباکتریایی موجود در سطح هیدروژل است. در زمان های طولانی تر رهایش عامل ضدباکتریایی در کنترل مکانیزم نفوذ قرار می گیرد و به همین دلیل است که شیب نمودار کاسته می شود و نرخ رهایش در مقایسه با نرخ رهایش در ابتدا به طور قابل ملاحظه ای کاهش می یابد.

در سال ۲۰۱۰ ژوزف و همکاران (۲۹) از کامپوزیت های هیدروژلی برای رهایش عوامل ضدباکتریایی آب گریز استفاده و به این منظور میکروامولسیون های حاوی عامل ضدباکتریایی

## بحث و نتیجه گیری

ویژگی های هر نوع از فراورده های آلژینات با توجه به جلبک دریایی که آلژینات از آن استخراج شده است، بر اساس نسبت های متفاوت اسید ال-گلوکونیک L-Guluronic و دی-مانورونیک D-Mannuronic در آلژینات و تعادل میزان حضور کلسیم و سدیم در پانسمن، تعیین می شود. آلژینات غنی از بلوک های M، ژل های آمورف نرمی ایجاد می کند که بیشتر در محلول پراکنده و متوقف می شود. از آن سو آلژینات های غنی از بلوک های G تمایل دارد که در محلول بیشتر متورم شود در حالی که ساختار نخستین خود را حفظ می کند. در تماس با خون، یون های کلسیم در آلژینات با یون های سدیم در خون جانشین می شود که این رخداد به افزایش انحلال پانسمن به معنی ایجاد ژل می انجامد. جانشینی برخی یون های کلسیم با یون سدیم در این ماده فرایند تولید ژل را شتاب می دهد اما ممکن است سبب کاهش توانایی فیلم در ایجاد آبشار انعقادی بشود (۲۶).

هنین ای تو و همکاران (۲۷) در سال ۲۰۱۲ عامل ضدباکتریایی ایوپروفن را در شبکه سدیم آلژینات بارگذاری کردند و

میکروگرم نانوذره نقره در واحد سطح پانسمن، خاصیت ضدباکتریایی دیده می‌شود.

اگر میزان  $100\text{ g/ml}$  از نانوذرات یا  $14$  میکروگرم نانوذره به طور موثر در محیط حضور داشته باشد، همزمان بدون آن که سمیت ایجاد شود، نقره فعالیت ضدباکتریایی خواهد داشت. با توجه به بازده رهائش دارو که حدود  $80$  درصد محاسبه شد، استفاده از پانسمن حاوی  $17/5$  میکروگرم نانوذره نقره به ازاء واحد سطح یا اعمال غلظت  $125\text{ g/ml}$  بر پانسمن منجر به حالتی می‌شود که همه شرایط مورد نظر ما را در بدست آوردن یک پانسمن مطلوب اغنا می‌کند.

در بررسی روند ترمیم زخم از لحاظ هیستوپاتولوژی نشان داده شد که فاز التهابی یکی از فازهای ترمیم زخم بوده و برای التیام زخم یک فاز پیش نیاز است. این فاز می‌تواند به چند دلیل آغاز شود که یکی از این دلایل خود آسیب دیدگی است، به همین دلیل در مراحل اولیه التیام زخم تعیین این که پاسخ التهابی بخشی از روند طبیعی ترمیم زخم است یا این که حاصل از ماده استفاده شده است، کار دشواری است (۲۹).

همچنین، در سال  $2018$  مطالعه‌ای برای ترمیم زخم بر روی یک سوختگی درجه دوم انجام شد که در این تحقیق از نانوکامپوزیت‌های جدید بر پایه آلژینات و نانوذرات نقره استفاده شد که نتایج میکروسکوپی، کاهش التهاب و بهبود ساختار ماتریکس خارج سلولی بدون عوارض نامطلوب را نشان داد.

کلسیم آلژینات با تامین رطوبت محیطی، منجر به اپی‌تلیالیزاسیون دوباره و ایجاد سریع‌تر گوشت نو در زخم می‌شود. در یک بررسی بالینی، زخم تعداد قابل توجهی بیمار که با کلسیم آلژینات پانسمن شده بودند در روز دهم به طور کامل التیام یافت در حالی که برای گروه دیگر که با گاز پارافین پانسمن انجام شده بود چنین روندی مشاهده نشد. پانسمن‌های کلسیم آلژینات پیشرفتی اساسی در بهبود زخم‌های شکاف پوستی ایجاد شده در محل اهدای عضو است. در یک مطالعه دیگر در بیماران سوختگی، کلسیم آلژینات به روشنی از شدت درد می‌کاهد و همچنین به دلیل آسانی استفاده و مراقبت، مورد علاقه کارکنان پرستاری هم هست. استفاده ترکیبی از کلسیم سدیم آلژینات و یک پانسمن

را با آلژینات مخلوط کردند. آنها موفق به بهبود مدت زمان رهائش شدند و توانستند در مدت زمان  $24$  ساعت رهائش کمابیش ثابتی از دارو را مشاهده کنند. البته در همین مطالعه هم  $80$  درصد دارو در  $6$  ساعت ابتدایی رهائش آزاد شده است که از این جهت بین پژوهش حاضر و مطالعه‌ای که پیش از این انجام شده مشابهت وجود دارد. گرچه در این حالت میزان پیوست‌های عرضی آلژینات ثابت است، اما باید توجه داشت که میزان اتصالات عرضی در رفتار رهائش تاثیرگذار است. با افزایش میزان کلسیم، دانسیته اتصالات عرضی افزایش می‌یابد، اتصالات عرضی بیشتر یعنی تخلخل‌های کوچک‌تر و نفوذ آهسته‌تر، پس نرخ رهائش کاهش می‌یابد (۲۹).

به نظر می‌رسد که اختلافی که در حداقل غلظت مهارکنندگی بین دو حالت  $\text{Ag NPs -Alg}$  و  $\text{Ag NPs}$  مشاهده می‌شود، به توان زخم پوش در رهائش ذرات نقره و همچنین، میزان نفوذ نانوذرات آزاد شده در محیط مربوط شود. با تکیه بر این نتایج می‌توان گفت که فیلم آلژینات تمام میزان نانوذرات بارگذاری شده بر روی آن را رهائش نمی‌دهد. این که چه میزان از عامل ضدباکتریایی رهائش می‌یابد به طور ویژه با اندازه‌گیری پروفایل رهائش بررسی شده است.

در یک جمع‌بندی کلی نشان داده شد که در غلظت‌های پایین‌تر  $100\text{ g/ml}$  نانو ذرات نقره سمیت سلولی ایجاد نمی‌کنند. آزمون‌های سمیت بر ورق‌های به ابعاد  $1$  سانتی‌متر مربع انجام شد. هر ورق به این ابعاد توانایی جذب  $0/14$  میلی‌لیتر محلول را دارد، پس، با حضور  $14$  میکروگرم نانوذره نقره در واحد سانتی‌متر مربع از پانسمن، سمیت سلولی ایجاد نمی‌شود. از طرف دیگر در آزمون ضدباکتریایی مشخص شد که در صورت حضور مستقیم نانوذرات نقره در محیط حداقل غلظت مهارکنندگی کمتر از مقادیر  $12/5\text{ g/ml}$  است و این یعنی آن که به ازای واحد حجم،  $12/5$  میکروگرم نانو نقره در محلول موجود است. اما در صورتی که پانسمن با ابعاد  $1$  سانتی‌متر مربع در محیط جامد قرار گیرد به علت مشکل ناتوانی کافی نانو ذرات برای نفوذ در محیط آگار در غلظت‌های بالاتر از  $400\text{ g/ml}$  خاصیت ضدباکتریایی مشاهده می‌شود. در چنین حالتی هم یعنی به ازاء حضور  $56$

بود. تاثیر پانسمان بر روند ترمیم زخم در محیط بدن موجود زنده (موش صحرایی) بررسی و نشان داده شد که با حضور پانسمان، زخم انقباض یافته و اپی تلیالیزاسیون رخ می دهد. گفتنی است که شرایط زخم در محیط بدن شرایط دینامیکی است، حال آن که آزمون سمیت سلولی در شرایط استاتیک انجام شده است. زمانی که غلظتی از نانوذرات در شرایط استاتیک سمیت ایجاد نکند، این اطمینان وجود دارد که در شرایط دینامیک قطعاً خطری وجود نخواهد داشت و با در نظر گرفتن این نکته حاشیه امنیت رعایت می شود.

### سپاسگزاری و سپاسداری

این نوشتار برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم آتنا فرهنگیان بوده است. بدینوسیله از همه افرادی که در این پژوهش همکاری داشته اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می شود. نویسندگان اعلام می دارند که هیچ گونه تضاد منافی ندارند.

غشائی زیست انسدادی در مدیریت زخم شکافی در محل اهداء عضو درد و مشکل تشکیل سرم و نشتی را زدود که این مشکلات به طور معمول زمانی مشاهده می شوند که از یک پانسمان زیست انسدادی به تنهایی استفاده می شود (۱۱).

در این مطالعه ورق کلسیم آلزینات به عنوان یک لایه از پانسمان در نظر گرفته شد و عامل ضدباکتریایی نانوذرات نقره بر روی آن بارگذاری شد. در نتیجه پانسمانی تولید شود که به طور همزمان روند ترمیم زخم را شتاب داده و از ایجاد عفونت در زخم و به تعویق افتادن ترمیم آن جلوگیری کند. عکس های FE-SEM بارگذاری را تایید کردند و تا حدودی یک نواختی توزیع ذرات در ساختار آلزینات را نشان دادند. خواص ضدباکتریایی پانسمان آماده شده به روش حداقل غلظت مهارکنندگی بررسی و مشخص شد غلظت های بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در پانسمان فعالیت ضدباکتریایی نشان می دهند. پانسمان در غلظت های بالای ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سمیت ایجاد می کند. بازده رهایش نانوذرات نقره در محیط رهایش PBS در حدود ۸۰ درصد

### منابع

1. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine* 1999; 341: 738-746.
2. Schultz GS, Barillo DJ, Mazingo DW, Chin GA. Wound bed preparation and a brief history of TIME. *International wound journal* 2004; 1: 19-32.
3. Nguyen D, Orgill D, Murphy G. The pathophysiologic basis for wound healing and cutaneous regeneration. *Biomaterials for treating skin loss*. Philadelphia: Elsevier, 2009: 25-57.
4. Paul W, Sharma CP. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends Biomater Artif Organs* 2004; 18: 18-23.
5. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of pharmaceutical sciences* 2008; 97: 2892-2923.
6. Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, et al. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound repair and regeneration* 2003; 11: S1-S28.
7. Lee KY, Jeong L, Kang YO, Lee SJ, Park WH. Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews* 2009; 61: 1020-1032.
8. Jin SG, Yousaf AM, Kim KS, et al. Influence of hydrophilic polymers on functional properties and wound healing efficacy of hydrocolloid based wound dressings. *International journal of pharmaceutics* 2016; 501: 160-166.
9. Zhao X, Wu H, Guo B, Dong R, Qiu Y, Ma PX. Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing. *Biomaterials* 2017; 122: 34-47.
10. Ebrahimi-Hosseinzadeh B, Pedram M, Hatamian-Zarmi A, et al. In vivo evaluation of gelatin/hyaluronic acid nanofiber as Burn-wound healing and its comparison with ChitoHeal gel. *Fibers and Polymers* 2016; 17: 820-826.
11. Fonder MA, Lazarus GS, Cowan DA, Aronson-Cook B, Kohli AR, Mamelak AJ. Treating the chronic wound: a practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2008; 58: 185-206.
12. Patrulea V, Ostafe V, Borchard G, Jordan O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2015; 97: 417-426.
13. Orive G, Tam SK, Pedraz JL, Hallé J-P. Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials* 2006; 27: 3691-3700.
14. Shapiro L, Cohen S. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials* 1997; 18: 583-590.



15. Bouhadir KH, Lee KY, Alsberg E, Damm KL, Anderson KW, Mooney DJ. Degradation of partially oxidized alginate and its potential application for tissue engineering. *Biotechnology progress* 2001; 17: 945-950.
16. DiPietro LA. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock* (Augusta, Ga) 1995; 4: 233-240.
17. Lerman B, Oldenbrook L, Eichstadt SL, Ryu J, Fong KD, Schubart PJ. Evaluation of chronic wound treatment with the SNaP wound care system versus modern dressing protocols. *Plastic and reconstructive surgery* 2010; 126: 1253-1261.
18. Gupta V, Kakkar G, Gill AS, Gill CS, Gupta M. Comparative Study of Nanocrystalline Silver Ion Dressings with Normal Saline Dressings in Diabetic Foot Ulcers. *Journal of Clinical & Diagnostic Research* 2018; 12.
19. Khodke PB, Popat RR, Burakale PV, Chinchole PP, Shrikhande VN. Silver nanoparticles-A review. *Research Journal of Pharmacy and Technology* 2017; 10: 1820.
20. Graham C. The role of silver in wound healing. *British journal of nursing* 2005; 14: S22-S28.
21. Lansdown AB. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. *Journal of wound care* 2002; 11: 125-130.
22. Thomas S. Alginate dressings in surgery and wound management—Part 1. *Journal of wound care* 2000; 9: 56-60.
23. Li M, Tang Z, Sun H, Ding J, Song W, Chen X. pH and reduction dual-responsive nanogel cross-linked by quaternization reaction for enhanced cellular internalization and intracellular drug delivery. *Polymer Chemistry* 2013; 4: 1199-1207.
24. Archana D, Dutta J, Dutta P. Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, in vitro and in vivo studies. *International journal of biological macromolecules* 2013; 57: 193-203.
25. Clark R, Bradbury S. SILVERCEL® non-adherent made easy. *Wounds International*, London 2010.
26. Terrill P, Sussman G, Bailey M. Absorption of blood by moist wound healing dressings. Primary Intention: *The Australian Journal of Wound Management* 2003; 11: 7.
27. Thu H-E, Zulfakar MH, Ng S-F. Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing. *International journal of pharmaceutics* 2012; 434: 375-383.
28. Rao KK, Ha C-S. pH Sensitive hydrogels based on acryl amides and their swelling and diffusion characteristics with drug delivery behavior. *Polymer bulletin* 2009; 62: 167.
29. Josef E, Zilberman M, Bianco-Peled H. Composite alginate hydrogels: an innovative approach for the controlled release of hydrophobic drugs. *Acta Biomaterialia* 2010; 6: 4642-4649.