BRIEF REPORT

Effect of Silver Nanoparticles Produced by Paenibacillus on Rat Cutaneous Wound Healing

Parastoo Pourali[1],
Masoomeh Moghaddasi[2],
Behrooz Yahyaei[1]

[1] Assistant Professor, Department of Medical Sciences, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran
[2] MSc in Microbiology, Department of Biology, College of Basic Sciences, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

(Received December 28, 2016 ; Accepted January 15, 2018)

Abstract

Background and purpose: Silver nanoparticles have different biological effects and are used in treatment of burn infections, open and choronic wounds.

Materials and methods: In this study, the bacterial strains of *Paenibacillus* genus were isolated from soil samples in Damghan, Iran and identified using molecular method. After preparing the condition for silver nanoparticles production, the biological production was proved through spectrophotometry, transmission electron microscopy (TEM), and X- ray diffraction analysis (XRD). Then, wound induction was done on rats' skin and the healing effect of nanoparticles was investigated in three groups of rats (treatment, control and phenytoin, n=8 per group). At days 3, 7, 14, and 21 after treatments, the wound area was measured in all groups. Afterwards, wound sampling was carried out for histological evaluations.

Results: Silver nanoparticles were produced in spherical shapes (40nm) by *Paenibacillus* genus. The rate of wound healing was faster in treatment group (the coverage texture was completely formed on day 14) compared to that in other groups.

Conclusion: The silver nanoparticles produced had healing property effects which could accelerate wound healing.

Keywords: silver nanoparticle, wound healing, *Paenibacillus*

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (163): 107-112 (Persian).

*** Corresponding Author: Behrooz Yahyaei -** Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran (E-mail: behroozyahyaei@yahoo.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۳ مرداد سال ۱۳۹۷ (۱۱۲-۱۰۷)

بررسی تاثیر نانوذرات نقره تولید شده به وسیله *Paenibacillus* بر التیام زخم جلدی موش صحرایی

پرستو پورعلی[۱]
معصومه مقدسی[۲]
بهروز یحیایی[۱]

چکیده

سابقه و هدف: نانوذرات نقره دارای اثرات زیستی مختلف بوده و برای درمان عفونت سوختگی‌ها، زخم‌های باز و مزمن به کار می‌روند.

مواد و روش‌ها: ابتدا باکتری‌های موبوط به‌جنس *Paenibacillus* از خاک منطقه دامغان جداسازی و با روش مولکولی شناسایی *شدند*. پس از ایجاد شرایط جهت تولید نانوذرات نقره، تولید زیستی آن از طریق اسپکتروفوتومتر، میکروسکوپ الکترونی گذاره و پراش اشعه ایکس تایید گردید. به منظور بررسی اثر التیام بخشی نانوذرات پس از ایجاد زخم در پوست موش صحرایی، سه گروه ۸ تایی (درمان، شاهد و فنیتوئین) استفاده گردید. در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از درمان مساحت زخم اندازه‌گیری و از زخم‌ها نمونه‌برداری و مطالعات بافت‌شناسی انجام شد.

یافته‌ها: نانوذرات نقره توسط جنس *Paenibacillus* به شکل کروی و ابعاد ۴۰ nm تولید شدند. درصد بهبود زخم در گروه درمان سریع‌تر از سایر گروه‌ها بود به طوری‌که در روز ۱۴ بافت پوششی آن کاملا تشکیل گردید.

استنتاج: نانوذرات نقره تولیدی دارای خواص التیام بخشی بوده به‌طوری که باعث تسریع بهبود زخم می شوند.

واژه های کلیدی: نانوذرات نقره، التیام زخم ، *Paenibacillus*

مقدمه

امروزه نانوذرات سازگار با بدن انسان بسیار مورد توجه واقع شده‌اند که از جمله آن‌ها انواع طلا و نقره می‌باشند. این نانوذرات توسط روش‌های فیزیکی و شیمیایی قابل تولید بوده ولی از آن‌جا که روش فیزیکی روشی زمان بر و روش شیمیایی روشی سمی می‌باشد، امروزه تلاش در تولید سبز نانوذرات به واسطه موجودات زنده انجام که روش زیستی خوانده می‌شود(۱). در فرایند ترمیم زخم مشاهده شد چنان‌چه هماهنگی میان سلول‌ها و فاکتورهای مختلف التیام بخشی از بین رود، این روند با مشکل مواجه خواهد شد. برای مثال مشاهده شد در زخم‌های مزمن، کلونیزاسیون باکتری‌ها و عدم تولید اینترلوکین‌هایی مانند IL-6، تغییر در pH پوست آسیب دیده و بسیاری از فاکتورهای بیوشیمیایی دیگر سبب جلوگیری از روند ترمیم زخم می‌شوند. مطالعات نشان داده است که نانوذرات نقره دارای خواص ضد التهابی، ضد باکتریایی، ضد رگ‌زایی، ضد پلاکتی با توانایی تنظیم سایتوکاین‌های درگیر در ترمیم زخم می‌باشند(۲). با این حال تاکنون مطالعات اندکی درمورد اثرات مذکور

مولف مسئول: بهروز یحیایی– شاهرود: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود E-mail:behroozyahyaei@yahoo.com
۱. استادیار، گروه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران
۲. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۱۰/۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۱۰/۲۹ تاریخ تصویب :۱۳۹۶/۱۰/۲۵

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

در مورد نانوذرات تولید شده به روش زیستی انجام شده است و لذا هدف از مطالعه حاضر تعیین اثرات نانوذرات زیستی در ترمیم زخم می باشد.

مواد و روش ها

ابتدا باکتری‌ها از نمونه خاک با شوک حرارتی و کشت بر روی محیط نوترینت آگار جداسازی شدند و جنس *Paenibacillus* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با روش PCR مورد شناسایی قرار گرفت(۳). کلونی خالص آن در محیط کشت نوترینت براث کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت و انجام سانتریفیوژ، به سوپرناتانت کشت محلول نیترات نقره در حجم نهایی ۱ میلی‌مولار افزوده شد و نمونه‌ها در شیکر انکوباتور در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت جهت تولید نانوذرات نقره قرار داده شدند(۴). پس از ظهور تغییر رنگ محیط کشت از زرد به قهوه ای که اولین نشانه از تولید نانوذرات نقره بود، حضور نانوذرات با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۳۰۰nm تا ۶۰۰، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و پراش اشعه ایکس (XRD) تایید گردید(۵). جهت بررسی خواص التیام بخشی تعداد ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار، دارای وزن ۲۵۰g-۲۰۰ از خانه حیوانات انستیتو رازی خریداری و به منظور تطابق با محیط ۱۰ روز در حیوانخانه در شرایط دما و رطوبت مناسب و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. بعد از این مدت ابتدا با دوز رقیق از کلروفورم بیهوش شدند و سپس یک زخم در ناحیه پشت با ابعاد ۱cm×۱ ایجاد گردید. سپس حیوانات به ۳ گروه ۸تایی درمان، فنیتوئین و شاهد تقسیم شدند. برای گروه درمان یکبار در روز دو قطره از محلول نانوذرات نقره و در گروه فنیتوئین یکبار پماد فنیتوئین و در گروه شاهد هیچ تیماری استفاده نشد. وسعت زخم در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و۲۱ با واحد میلی‌متر مربع اندازه‌گیری گردید. در هر یک از روزهای مذکور ۲ نمونه از هر گروه معدوم و نمونه بافتی از محل ترمیم زخم جدا و تثبیت شد. پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین(۶) در نهایت نمونه‌ها از لحاظ میزان ارتشاح سلول‌های التهابی، فیبروپلازی، رشته‌های کلاژن، آنژیوژنز، تشکیل بافت پوششی و ضمائم پوست مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون K-S بررسی شد و پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، از آزمون ANOVA یک جهته استفاده گردید.

یافته ها و بحث

مشاهدات بافت‌شناسی نشان داد که روند بهبود زخم در گروه درمان به طور بارز نسبت به دو گروه شاهد و فنیتوئین با روند بهتر و سریع‌تری انجام شد. درصد جمع شدگی زخم در جدول شماره ۱ آمده است.

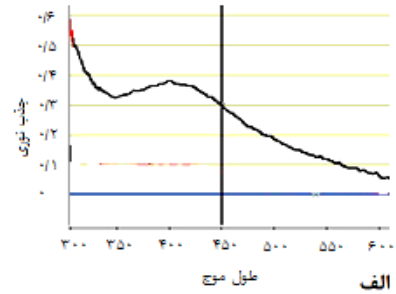
جدول شماره ۱: درصد جمع شدگی زخم

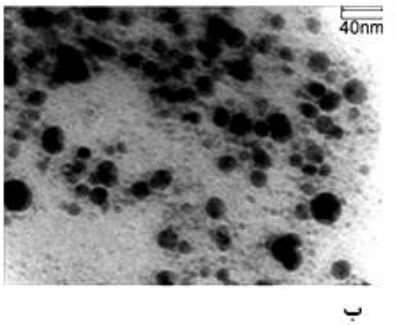
گروه \ روز	۳	۷	۱۴	۲۱
شاهد	۰ درصد	۱۹ درصد	۴۴ درصد	۹۱ درصد
فنیتوئین	۰ درصد	٪۱۰	۳۶ درصد	۸۸ درصد
درمان	۱۰ درصد	٪۴۴	۹۶ درصد	۱۰۰ درصد

ترمیم زخم فرایندی پیچیده است که شامل ۳ مرحله فاز التهابی، تکثیر و تمایز می‌باشد. در مرحله اول به دلیل ایجاد زخم و تولید سایتوکاین‌های التهابی، نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها به محل وارد شده که با التهاب و فیبروپلازی همراه است. در مرحله دوم آنژیوژنز، تولید ماتریکس خارج سلولی به همراه تولید رشته‌های کلاژن دیده می‌شود و در طی فاز سوم، عملکرد آنزیم‌هایی هم‌چون پروتئیناز در محل زخم سبب ایجاد ترمیم کامل زخم می‌شود(۷). مطالعات نشان داده است که در برخی از شرایط این فرایند دچار اختلال می شود و استفاده از داروها می‌تواند به تسریع آن کمک کند(۸). در مطالعه حاضر نانوذرات تولیدی جهت التیام زخم جلدی مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور تعداد ۱۶ گونه مختلف از باکتری جنس *Paenibacillus* که تولید نانوذرات نقره توسط آن‌ها انجام پذیرفت جداسازی

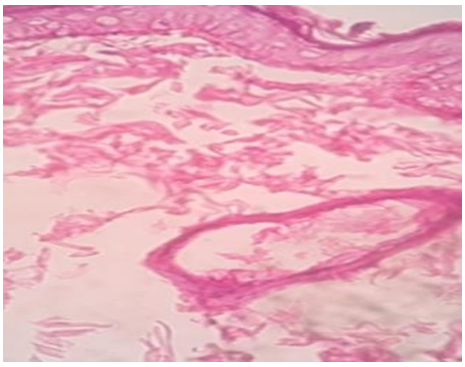
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

گردید و نهایتا یک باکتری با توانایی بالا در تولید نانوذره انتخاب شد. مطالعات اسپکتروفوتومتری حضور پیک جذب نوری در طول موج بین ۴۰۰ nm تا ۴۵۰ که نشانه رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات نقره بود(۹) را نشان داد (تصویر شماره ۱ الف). تصاویر TEM نانوذرات با شکل کروی و اندازه حدود ۴۰nm را نشان دادند (تصویر شماره ۱ ب) وگراف XRD پیک‌های مربوط به نقره را تایید نمود. در روز ۳ درگروه درمان ترشح سلول‌های التهابی بالا و همچنین مهاجرت فیبروبلاست‌ها به فضای زخم قابل مشاهده بود. در روز ۷، در گروه درمان بافت پوششی و ضمائم پوست دیده شدند. میزان فیبروپلازی مناسب و فیبروبلاست‌ها و رشته‌های کلاژن نسبتا ضخیم بودند. در گروه شاهد فیبروپلازی کم و بافت پوششی به میزان‌اندک در حال تشکیل شدن بود و آنژیوژنز دیده نمی‌شد. درگروه فنیتوئین بافت پوششی و لایه شاخی به میزان کم بود، آنژیوژنز دیده نشد و رشته‌های کلاژن نسبتا ضخیم با فیبروپلازی کم دیده شد. در گروه شاهد در روز ۱۴ عدم آنژیوژنز و فیبروپلازی کم و بافت پوششی بسیار نازک در حال تشکیل شدن بود (تصویر شماره ۲).

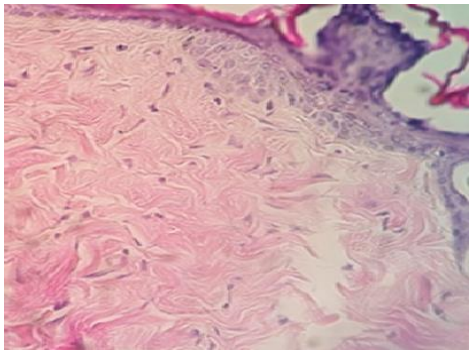




تصویر شماره ۱: نتایج تایید حضور نانوذرات. الف) اسپکتروفوتومتری ب) میکروسکوپ الکترونی


گروه شاهد


گروه فنیتوئین


گروه درمان

تصویر شماره ۲: فتومیکروگراف پوست موش صحرایی، گروه های شاهد، فنیتوئین و درمان، روز ۱۴(H&E×۴۰۰).

در روز ۱۴ در گروه درمان بافت پوششی تشکیل و لایه شاخی خیلی نازک و رشته‌های کلاژن نسبتا ضخیم و ضمائم پوستی دیده می‌شد. تعداد فیبروبلاست‌ها مناسب و آنژیوژنز و سلول‌های التهابی دیده نمی‌شد (تصویر شماره ۲). در گروه فنیتوئین در این روز بافت پوششی و رشته‌های کلاژن نسبتا ضعیف و فیبروپلازی کم بود. در روز ۲۱ در گروه شاهد بافت پوششی به صورت نازک و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

فولیکول‌های مو و رشته‌های کلاژن بسیار ضعیف بود. در روز ۲۱ در گروه درمان بافت پوششی، لایه شاخی، فولیکول‌های مو و غدد سباسه دیده می‌شد. رشته‌های کلاژن و میزان فیبروپلازی مناسب، آنژیوژنز و سلول‌های التهابی دیده نشد. در گروه فنیتوئین بافت پوششی نازک، رشته‌های کلاژن و میزان فیبروپلازی بسیار کم بود. در روند ترمیم زخم مناسب، نشان داده شد که در روز های ابتدایی میزان بالایی از سلول‌های التهابی، فیبروپلازی و آنژیوژنز وجود دارد که با گذشت زمان از آن کاسته شده و بر میزان رشته‌های کلاژن که رفته رفته قطور می‌شود، به همراه تشکیل اپیدرم و ضمائم پوست افزوده می‌گردد(۸). بر این اساس نتایج مطالعه حاضر حاکی از اثر نانوذرات نقره تولیدی در اپیتلیوم سازی سریع‌تر، افزایش کلاژن و تسریع روند التیام بود. روند ترمیم زخم در گروه درمان تفاوت بارزی با سایر گروه‌ها داشت به‌طوری که در روز ۱۴ بافت پوششی به طور کامل تشکیل و سلول‌های التهابی دیده نمی‌شد. در این مطالعه از نانوذرات نقره زیستی استفاده شد زیرا تولید نانوذرات به روش زیستی علاوه بر این‌که اثرات سمی کم‌تری نسبت به دو روش شیمیایی و فیزیکی دارند، مراحل تهیه و تولید آن‌ها نیز به این روش در زمان کوتاه تر و با هزینه کم‌تری انجام می‌شود. همچنین باکتری مورد استفاده به راحتی از محیط جدا و قابل شناسایی می‌باشد. در مطالعات گذشته تولید نانوذرات توسط این جنس گزارش نشده همچنین تا به حال گزارشی از بررسی اثرات نانوذرات نقره زیستی تولید شده توسط *Paenibacillus* بر روی زخم جلدی موش صحرایی انجام نشده است. نتایج میکروسکوپی و ماکروسکوپی در مطالعه حاضر حاکی از آن است که نانوذرات نقره تولید شده به روش زیستی اثر مثبتی در روند ترمیم زخم دارند.

References

1. Pourali P, Badiee H, Sahebali Manafi B, Noorani TB, Rezaei A, Yahyaei B. Biosynthesis of gold nanoparticles by two bacterial and fungal strains, Bacillus cereus and Fusarium oxysporum, and assessment and comparison of their nanotoxicity in vitro by direct and indirect assays. Electron J Biotechnol 2017; 29: 86-93.
2. Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. Adv Colloid Interface Sci 2010; 156(1): 1-13.
3. Pourali P, Yahyaei B, Ajoudanifar H, Taheri R, Alavi H, Hoseini A. Impregnation of the bacterial cellulose membrane with biologically produced silver nanoparticles. Curr Microbiol 2014; 69(6): 785-793.
4. Pourali P, Baserisalehi M, Afsharnezhad S, Behravan J, Ganjali R, Bahador N, et al. The effect of temperature on antibacterial activity of biosynthesized silver nanoparticles. Biometals 2013; 26(1): 189-196.
5. Yahyaei B, Peyvandi N, Akbari H,Pourali P. Production, assessment, and impregnation of hyaluronic acid with silver nanoparticles that were produced by Streptococcus pyogenes for tissue engineering applications. Applied Biological Chemistry 2016; 59(2): 227-237.
6. Pourali P, Yahyaei B. Biological production of silver nanoparticles by soil isolated bacteria and preliminary study of their cytotoxicity and cutaneous wound healing efficiency in rat. J Trace Elem Med Biol 2016; 34: 22-31.
7. Schreml S, Szeimies RM, Karrer S, Heinlin J, Landthaler M, Babilas P. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. J Eur Acad Dermatol Venereol 2010; 24(4): 373-378.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

8. Hesaraki S, Farahpour M, Yahyaei B. Effects of Ceylon cinnamon ethanolic extract and flaxseed oil on cutaneous wounds healing in rat. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 2016; 31(6): 1005-1012 (Persian).

9. Nikbakht M, Yahyaei B, Pourali P. Green Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Using Fruit Aqueous and Methanolic Extracts of Berberis vulgaris and Ziziphus vulgaris. J Pure Appl Microbiol 2015; 9(1): 349-355.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]