

## سنتز سبز نانوذرات روی و بررسی تغییرات آن بر روی آنزیم‌های کبدی و تأثیر آن بر ترمیم زخم‌های ناشی از سوختگی در رت‌های نر از نژاد ویستار آزمایشگاهی

زهرا سینایی پور فرد<sup>۱</sup>، نوشین نقش<sup>۲</sup>، نسرین یزدان پناهی<sup>۳</sup>، غلامرضا امیری<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی، گروه زیست‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. نویسنده مسئول: [n\\_naghsh@yahoo.com](mailto:n_naghsh@yahoo.com)

۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۴- دانشیار گروه فیزیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۸

### چکیده

**زمینه و هدف:** در حال حاضر روی و ترکیبات آن به عنوان یک راه حل مناسب برای درمان عفونت در سوختگی‌ها، زخم‌های باز و زخم‌های مزمن به کار برده می‌شوند. این مطالعه با هدف بررسی اثر موضعی نانوذرات سبز روی بر روی پارامترهای بیوشیمیایی خون و ترمیم بافت پوست در هنگام ترمیم زخم در موش سفید آزمایشگاهی طراحی و اجرا شد.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق تجربی، ۴۲ رت نر از نژاد ویستار به ۷ گروه ۶ تایی مورد بررسی قرار گرفتند. سپس با ایجاد سوختگی به اندازه ۲ سانتیمتر در پشت رت‌ها ایجاد و بلافاصله تیمار با پماد نانوذرات روی (۱٪، ۴٪، ۱۶٪) و پماد زینک اکساید و وازلین خالص به مدت ۲۱ روز انجام شد. پس از نمونه‌گیری از پوست رت‌ها درصد بهبود زخم در آن‌ها محاسبه شد. همچنین از قلب رت‌ها خونگیری انجام شد و سرم خون رت‌ها برای بررسی پارامترهای بیوشیمیایی استفاده شد.

**نتایج:** درصد بهبود زخم در گروه پماد ۴ درصد و پماد زینک اکساید نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود. در ضمن تمامی غلظت‌های به کار برده شده در این تحقیق، از نظر تأثیر بر روی آنزیم‌های کبدی ایمن بودند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که پماد ۴٪ نانوذرات روی بهترین گروه تیمار بوده که باعث تسریع بهبود زخم‌های پوستی شد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، پماد تولید شده توسط نانوذرات سبز شناسایی شده احتمالاً می‌تواند به عنوان یک ترمیم‌کننده قوی در ضایعات پوستی به طور طبیعی مورد استفاده قرار گیرد.

**کلمات کلیدی:** نانوذرات سبز روی، ترمیم زخم، پارامترهای بیوشیمیایی

## مقدمه

نانوفناوری امروزه شاهد پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه تولید نانومواد و استفاده از روش‌ها و مواد جدید بوده است، با توسعه و کشف روش‌های جدید و نگرانی‌ها در مورد آلودگی محیط زیست توسط نانوذرات از طریق روش‌های شیمیایی و محصولات جانبی آن‌ها بیشتر شده است، بنابراین نیاز به روش‌های شیمی سبز که سالم، غیر سمی و سازگار با محیط زیست هستند احساس می‌شود (۱ و ۲). لذا نانوذرات سنتز شده به روش‌های بیولوژیک بخاطر داشتن ویژگی‌های نوین و هم‌چنین سازگاری با محیط زیست نقش مهمی را در پزشکی نوین بر عهده دارد (۳). استفاده از موجودات زنده مانند میکروارگانیسم‌ها از قبیل قارچ، باکتری، مخمر، اکتینومیست و یا ماکرو ارگانیسم‌ها مثل گیاهان، جلبک‌ها به عنوان واسطه‌ای در سنتز نانوذرات از ترکیبات معدنی، می‌توانند روشی دیگر در کنار روش‌های شیمیایی و فیزیکی برای تولید نانوذرات به حساب آیند. سنتز سبز، در واقع یک روش پایین به بالا است با این تفاوت که در روش پایین به بالا یک ماده شیمیایی به عنوان حلال و نیز کاهنده عمل می‌کند ولی در سنتز زیستی عصاره طبیعی محصولات زیستی مانند برگ، دانه و یا میوه‌ها برای سنتز نانوذرات مورد استفاده قرار می‌گیرد. عصاره‌های گیاهی ممکن است هم به عنوان عوامل کاهنده و هم کنترل کننده رشد نانوذرات در سنتز سبز نانوذرات، عمل نمایند. نوع عصاره مورد نیاز برای سنتز سبز، با توجه به ویژگی‌های شناخته شده نانوذرات انتخاب می‌شود. چرا که عصاره‌های مختلف حاوی غلظت‌ها و

ترکیب‌های متفاوت از مواد گوناگون آلی هستند. سنتز سبز این نانوذرات و مکانیسم آن‌ها وابسته به ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان مانند آلکالوئیدها، فنول‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، تریپنوئیدها و غیره می‌باشد. بنابراین این ترکیبات گیاهی نقش مهمی را در سنتز سبز نانوذرات ایفا می‌کنند (۴). به طور کلی روش‌های تولید زیستی نانوذرات نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی به دلیل کاهش هزینه، انرژی و زمان اولویت دارد، این روش نیازمند استفاده از حلال‌های سمی و مواد خطرناک برای محیط زیست نمی‌باشند. تولید سبز نانوذرات روشی دوستدار طبیعت است که در آن از حلال‌های طبیعی استفاده می‌شود ساخت و تجمع نانوذرات با استفاده از روش‌های شیمی سبز از سال ۱۹۹۰ مورد توجه واقع شد و در طی زمان استفاده از گیاهان سبز برای تهیه زیستی نانوذرات تا حدودی شناخته شده است (۵). لذا گیاهان و فرآورده‌های گیاهی در جهت تولید نانوذرات خیلی بیشتر مورد توجه محققین واقع شده است. علاوه بر این، نانوذرات تولید شده توسط گیاهان دارویی باریسک کمتری می‌تواند در مواردی مانند انتقال دارو کاربرد داشته باشد. هم‌چنین تحقیقات نشان داده که نانوذرات ساخته شده توسط گیاهان نسبت به نانوذرات حاصل از فعالیت سایر موجودات سریع‌تر ساخته شده و با ثبات تر می‌باشند (۶). نانوذرات در سطح جهانی با توجه به ویژگی‌های منحصر به فردی که دارند می‌توانند در زمینه‌هایی مثل تشخیص نانوپزشکی و خواص ضد - میکروبی کاربرد داشته باشند (۷ و ۸). یکی از مهم‌ترین نانوذرات اکسید روی می‌باشد که در اکثر کشورها به

محسوب می‌شود و علاوه بر آن نقش ضد آپوپتوزی و خواص آنتی اکسیدانی روی نیز به اثبات رسیده است. نانو ذره اکسید روی همانند نانوذرات دیگر دارای خواص کاتالیتی، مغناطیسی، نوری و بیولوژیکی (ضد میکروبی) خاصی می‌باشد (۱۱). استفاده از این نانوذره برای درمان عفونت زخم‌های سوختگی توسعه پیدا کرده است (۱۲). اما سمیت پوستی احتمالی نانوذرات باعث نگرانی شده است (۱۳). ارتباط قوی و همبستگی مثبتی بین آنزیم‌های کبدی و درجه سوختگی وجود دارد. علت افزایش آنزیم‌های کبدی (AST, ALT, ALP) به دلیل آسیب سلول‌های کبدی است. بازیابی عملکرد کبد باعث بهبود عوارض و مرگ و میر بیماران سوختگی شدید می‌شود (۱۴). افزایش آنزیم‌های کبدی بلافاصله پس از آن ناشی از شعله ور شدن کبد است که منجر به آسیب گرانول‌های کبدی با آزاد شدن آنزیم‌های کبدی می‌شود. البته نوع سمیت تولید شده توسط نانوذرات، به ویژگی‌ها و مسیر ورود آن‌ها به داخل سیستم زنده بستگی دارد (۱۵) و نانوذرات، با قطر و غلظت متفاوت دارای توزیع و اثر متفاوت در بافت‌های بدن می‌باشند (۱۶). پس یکی از ویژگی‌های مهم نانوذرات، برای تعیین انتشار آن‌ها در شرایط زنده، سرنوشت بیولوژیکی مسمومیت و توانایی هدف قرار دادن آن‌ها اندازه آن‌ها می‌باشد (۱۲). هر چه قطر نانوذرات کوچک تر باشد، نفوذ آن‌ها به سلول‌ها و اثرات مولکولی آن‌ها بر ساز و کارهای داخل سلول افزایش می‌یابد (۱۷ و ۱۸). مطالعات نشان داده که نانوذرات بر روی فعالیت آنزیم‌های مختلف کبدی تأثیر دارد. آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) مهم‌ترین آنزیم

شکل صنعتی مورد استفاده قرار گرفته است استفاده از نانوذرات روی در لوازم آرایشی باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد در پوست می‌شود و بنابراین می‌تواند به DNA و پروتئین‌های این سلول‌ها آسیب برساند و در نهایت منجر به سرطان شود (۹). همچنین این نانو ذره در زمینه بیولوژی، داروسازی و پزشکی کاربرد زیادی دارد نانو مواد به دلیل بروز خواص زیادی که ناشی از سطح موثر و واکنش پذیری زیاد آن‌ها است مورد توجه قرار دارند. از طرف دیگر با پیشرفت‌های سریع در نانو فناوری، نانو مواد با اشکال و اندازه‌های بسیار متنوعی ساخته شده و در تولید محصولات و ابزارهای مختلف صنعتی و پزشکی به کار می‌روند (۱۰). روی یکی از عناصر کمیاب (Trace element) است که مقادیر کم آن برای بدن ضروری است، اما در مقادیر بالا سمی است و قادر به القای آپوپتوز (Apoptosis) و نکروز (Necrosis) است. رایج‌ترین ترکیب روی شکل اکسید آن (ZnO) است که استفاده از آن به دلیل این که بالاترین غلظت عنصر روی را در خود دارد و دیگر آنکه جذب آن در بدن زیاد است و دستگاه گوارش آن را بهتر تحمل می‌کند، ترجیح داده می‌شود. نانو اکسید روی یکی از انواع جدید روی با خاصیت بیولوژیکی خاص و سمیت کم است که کارایی لازم برای تقویت دفاع آنتی اکسیدانی دارد و در عین حال دارای قدرت جذب بیشتری نسبت به دیگر ترکیبات محتوی روی است. از طرفی به دلیل اینکه رونویسی DNA بخش مهمی از تکوین سلول‌های جنسی است، روی عنصر حیاتی برای تولید سلول‌های جنسی

گروه آمینو ترانسفراز می‌باشد که با انتقال واحدهای آمینو، آلفا-کتواسید را به آمینو اسیدها کاتالیز می‌کنند. این آنزیم‌ها جزو آنزیم‌های غیر عملکردی پلاسما می‌باشد که در ارزیابی وضعیت کبد و حضور در پلاسما خون اطلاعاتی در مورد آسیب یا صدمه بافت کبد می‌دهد و مشخص شده که نشت آنزیم‌های کبدی به داخل خون دلیل قوی بر آسیب‌های کبدی می‌باشد. نانوذرات قادر به عبور از غشاهای زیستی هستند و به سلول‌ها، بافت‌ها و اعضای که اجازه عبور مواد در اندازه‌های معمول را نمی‌دهند وارد می‌شوند. محققان طی مطالعاتی دریافتند که آنزیم ALT برای کبد اختصاصی بوده و آسیب سلول‌های کبدی باعث افزایش آزاد شدن این آنزیم می‌گردد بنابراین یکی از دلایل انتخاب آنزیم ALT در این مطالعه، بررسی اثرات احتمالی تخریبی نانوذرات اکسید روی بر سلول‌های کبدی بوده است (۱۹). پس با توجه به اهمیت بررسی مقایسه‌ای نانوذرات شیمیایی روی و عدم سنجش تاثیرات ترمیم کننده روی بر زخم‌های پوستی و نانوذرات در محیط زیست یافت می‌شوند و در علم پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. با این حال، قرار گرفتن در معرض نانوذرات و ارتباط آن‌ها با سایر اجزا و میکرومولکول‌ها می‌تواند منجر به سرطان شود. اما به نظر می‌رسد که روی سلول‌های غیر سرطانی نیز تأثیر منفی دارد. تحقیقات نشان می‌دهد که نانوذرات می‌توانند ژنی را ایجاد کنند که تصور می‌شود محرکی برای رشد سرطان باشد (۲۰). به همین دلیل تصمیم بر این شد که در این تحقیق از نانوذرات سبز استفاده کنیم که احتمالاً نسبت به نانوذرات شیمیایی برای

انسان و محیط زیست بسیار کمتر مضر و مقرون به صرفه هستند. نانوذرات اکسید فلز می‌توانند وارد رگ‌های خونی و بافت‌های مغز شوند و در نتیجه فراهمی زیستی را افزایش دهند. این ممکن است منجر به اثرات سمی و پاسخ‌های التهابی در مغز و تخریب سیستم عصبی مرکزی شود (۲۱). مطالعات نشان داده است که نمک روی از طریق استنشاق، پوست و دستگاه گوارش وارد بدن می‌شود و می‌تواند باعث تهوع، مسمومیت، استفراغ و پوست و ریه شود (۲۲). از طرفی، افزایش تشکیل ادم در بیماران سوختگی ممکن است منجر به آسیب سلولی، با آزاد شدن آنزیم‌های کبدی شود. آنزیم‌های کبدی مانند آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) و آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) حساس ترین شاخص‌های آسیب سلول‌های کبدی هستند.

آسیب سلولی یا تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی، این آنزیم‌ها را به گردش خون نشت می‌کند. سدیم کم و پتاسیم بالا به دلیل افزایش نفوذپذیری عروق و ادم سلولی رخ می‌دهد. این آنزیم‌ها ممکن است نشانگرهای پیش بینی کننده پیش آگهی در بیماران سوختگی باشند. مطالعه MGHalaet al نشان می‌دهد که ALT، AST، ALP و گاما GT افزایش یافته است، به دلیل اختلال در عملکرد کبد در بیماران سوختگی (۲۳). سوختگی منجر به افزایش تشکیل ادم می‌شود که به نوبه خود منجر به آسیب سلولی با آزاد شدن آنزیم‌های کبدی می‌شود (۲۴). مشاهده شده است که ALT، AST و ALP سرم در هفته اول پس از سوختگی به اوج خود رسیدند و به محدوده طبیعی ۳-۵ هفته پس از سوختگی نزدیک شدند. اگر آسیب کبدی

### عصاره گیری

برای تهیه عصاره گیاه اکالیپتوس ملیودورا، برگ‌های گیاه اکالیپتوس در آذرماه ۱۳۹۹ از مرکز جهاد کشاورزی استان اصفهان جمع‌آوری شد، سپس به روش جوشاندن استخراج شد و در نهایت عصاره گیاه از فیلترهای ۴ میکرونی عبور داده شد. سپس محلول ۰/۱ مولار کلرید روی تهیه و به مدت ۱۵ دقیقه روی صفحه داغ آهنربایی قرار گرفت. سپس محلول کلرید روی با عصاره به دست آمده به نسبت ۱:۱ ترکیب شد و نانوذرات به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفته شدند. حدود غلظت‌ها از روی مقالات و بر اساس آزمون و خطا بر روی پیش آزمایش مشخص شدند. سپس محلول تولید شده سپس ۶ بار شسته شده، سانتریفیوژ شده و روی صفحه قرار داده می‌شود و در دمای اتاق خشک می‌شود. در نهایت، از رسوب خشک شده به عنوان نانوذرات اکسید روی سبز به عنوان ماده پایه پماد استفاده می‌شود.

پراش پرتو ایکس (X-Ray Diffraction):

محلول حاوی نانوذرات روی سه بار به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (۱۲۰۰۰ دور در دقیقه)، سپس مایع رویی خارج شد و دور ریخته شد و رسوب در صفحه یا پلیت خشک شد. در نهایت پودر خشک شده برای نانوذرات کریستالی توسط XRD مورد بررسی قرار گرفت (این بررسی در دانشگاه اصفهان، دانشکده فیزیک مورد بررسی قرار گرفت). همچنین جهت بررسی خواص دقیق تر پودر نانوذرات حاصل، برای TEM به دانشگاه فردوسی مشهد ارسال گردید (۲۹).

ادامه یابد، آنزیم‌ها بالا می‌مانند یا دوباره افزایش می‌یابند (۲۳، ۲۴). نشان داده شده است که کبد پس از یک آسیب حرارتی نقش مهمی ایفا می‌کند. افزایش در تشکیل ادم ممکن است منجر به آسیب سلولی با آزاد شدن آنزیم‌های کبدی شود (۲۲، ۲۳). گزارش‌ها نشان داد که AST و ALT افزایش یافته و به مدت ۴ تا ۶ هفته در سرم آزاد می‌شوند که نشان می‌دهد آسیب کبدی بلافاصله پس از سوختگی وجود دارد. سطح بیلی روبین سرم تنها به مدت ۲ هفته پس از سوختگی افزایش یافت (۲۷).

در سپسیس، کلستاز داخل کبدی اغلب بدون انسداد خارج کبدی قابل اثبات رخ می‌دهد. این پدیده در ارتباط با تعدادی از فرآیندها، مانند هیپوکسی، سمیت دارویی، یا تغذیه کامل تزریقی توصیف شده است (۲۸). با توجه به خواص مفید نانوذرات سبز روی، جهت سنجش ایمن بودن این نانوذرات، لذا در مطالعه‌ی حاضر بعد از مجاورت زخم‌ها با دوز مشخصی از نانوذرات سبز روی، اثر این ذرات بر روی میزان آنزیم‌های کبدی مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### سنتز نانوذرات روی با استفاده از برگ گیاه

#### اکالیپتوس:

کلیه مراحل آزمایشگاهی با کد اخلاقی IR.IAU.NAJAFABAD.REC.1400.021 به تایید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد نجف آباد رسیده است.

۴- گروه درمان با پماد اکسید روی ۲۵ درصد: سوختگی ایجاد شد و این پماد به مدت ۲۱ روز به صورت موضعی در روز یک بار استفاده شد.

۵- گروه درمان با پماد ۱ درصد (حاوی پودر نانوذرات روی سبز + اوسرین): سوختگی ایجاد می‌شود و این پماد به مدت ۲۱ روز یک بار در روز به صورت موضعی استفاده می‌شود (GI ۰.۲ پودر نانو + GI ۲۴.۸ اوسرین).

۶- گروه درمانی با پماد ۴٪ (حاوی اوسرین + پودر نانوذرات سبز روی سبز): سوختگی رخ داد و پماد به صورت موضعی یک بار در روز به مدت ۲۱ روز استفاده شد (GI ۱ پودر نانو + GI ۲۴ اوسرین).

۷- گروه درمانی با پماد ۱۶ درصد (حاوی اوسرین + نانوذرات سبز پودر روی) سوختگی رخ داد و پماد یک بار در روز به مدت ۲۱ روز به صورت موضعی درمان شد (GI ۴ پودر نانو + GI ۲۱ اوسرین).

طبق بررسی رفرنس‌های متعدد و جهت بررسی کوتاه مدت تأثیرات نانوذرات سبز روی بر بهبود زخم‌های پوستی، درمان به مدت ۲۱ روز متوالی تکرار شد و در روز بیست و دوم بیهوشی با کلروفورم انجام شد و سپس خونگیری از قلب رت‌ها انجام گرفت و سرم خون جهت تشخیص پارامترهای بیوشیمیایی استخراج شد (۳۱).

جهت سنجش تأثیرات پماد حاوی نانوذرات سبز روی در روز ۲۱ ام، قطر سوختگی در گروه‌های مختلف اندازه‌گیری و با گروه شاهد مقایسه شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های ALT (آلانین آمینوترانسفراز)، ALP (آلکالین فسفاتاز) و AST (آسپارات آمینوترانسفراز)

این مطالعه در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان انجام شد. در مجموع ۴۲ سرت نر از نژاد ویستار با وزن ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم از انستیتو پاستور ایران، پژوهشکده تهران خریداری و به لانه حیوانات دانشگاه منتقل شدند. پس از انتقال رت‌ها به اتاق حیوانات، تراشه‌های چوبی کف قفس هر چند روز یکبار تعویض می‌شد و غذا و آب مصرفی نیز در همان مدت تعویض می‌شد. دمای اتاق نگهداری حدود ۲۳ درجه سانتیگراد بود.

دوره ۲۴ ساعته بر اساس ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. بنابراین، دما و نور در یک سطح ثابت قرار گرفتند. برای بیهوشی، از ترکیب کتامین (۲ میلی گرم بر کیلوگرم) - زایلازین (۳ میلی گرم بر کیلوگرم) استفاده شد و رت‌ها از شکم روی سطح میز قرار گرفتند و به آن‌ها ماده ترکیبی بیهوشی تزریق شد و موهای پشت رت‌ها با کرم اصلاح برداشته شد. سپس با کمک هویه در مدت ۳۰ ثانیه دمای آن به ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد رسید و سوختگی به قطر دو سانتیمتر در پشت موش ایجاد شد. هویه قبلاً به مدت ۳۰ ثانیه گرم شده بود و به مدت ۱۰ ثانیه در پشت حیوان قرار داده شده بود (۳۰).

این مطالعه شامل هفت گروه بود:

۱- گروه کنترل ۱: بدون سوختگی و پماد روی آن‌ها استفاده نشده است.

۲- گروه کنترل ۲: فقط سوختگی ایجاد شد.

۳- گروه درمان با وازلین خالص: سوختگی ایجاد شد، وازلین خالص به مدت ۲۱ روز بر روی سوختگی اعمال شد.

پارامتریک داده‌ها در سطح ۰/۰۵ آزمون فاکتوریل کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میانگین و انحراف معیار آزمون دانکن بررسی شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS21 تجزیه و تحلیل شد. مقایسه آماری بین گروه‌های دریافت کننده پماد نانوذرات سبز با درصد های ۰/۱، ۰/۴ و ۰/۱۶ با گروه دریافت کننده پماد اکسید روی و گروه وازلین خالص و کنترل انجام شد. میانگین‌ها با حروف مشترک بر اساس آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند.

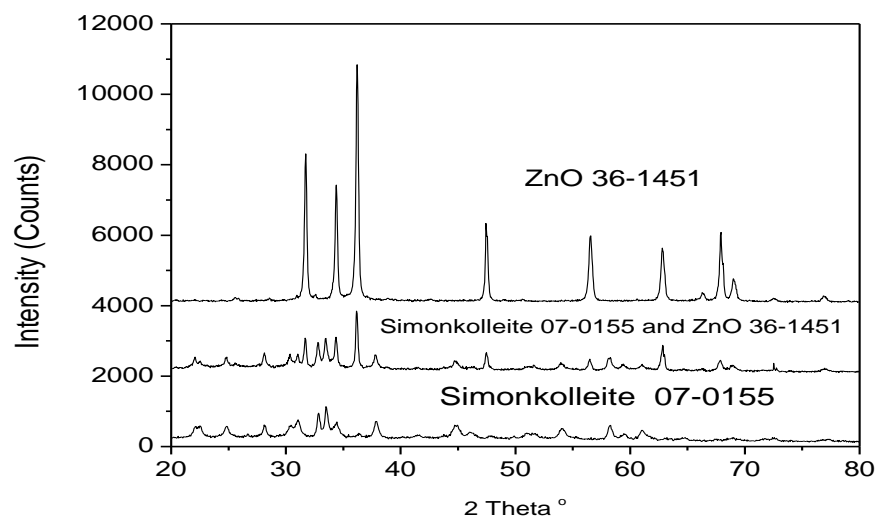
### نتایج

#### تعیین نانوذرات اکسید روی

در این مطالعه، الگوی XRD نانوذرات اکسید روی سبز (simonkolleite) در شکل ۱ نشان داده شده است. این ذرات دارای خواص آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به نانوذرات اکسید روی خالص هستند.

پس از خونگیری، نمونه به مدت ۱ ساعت در آزمایشگاه قرار داده شد. برای تهیه سرم، نمونه های خون با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند (Labnet, PRISM R، ایالات متحده). سپس جداسازی سرم از لخته با استفاده از سمپلر (سمپلر متغیر و قابل اتوکلاو، برند، آلمان) انجام شد (۳۲).

از تمام رت‌ها در پایان روز بیست و دوم خونگیری از قلب انجام شد و سپس هر نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس نمونه‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد منجمد می‌شوند تا سنجش آنزیمی انجام شود. آنزیم‌های کبدی شامل ALT، ALP و AST با استفاده از کیت های تست پارس آزمون در آزمایشگاه نوبل اصفهان بررسی شدند. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی شد و داده‌ها نرمال بودند. سپس با استفاده از آزمون‌های



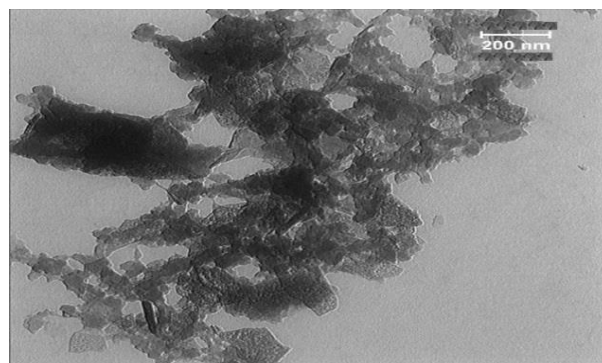
شکل ۱. الگوی XRD نانوذرات zno و zn5(OH)8CL2.H2O simonkolleite

### میکروسکوپ الکترونی عبوری یا TEM

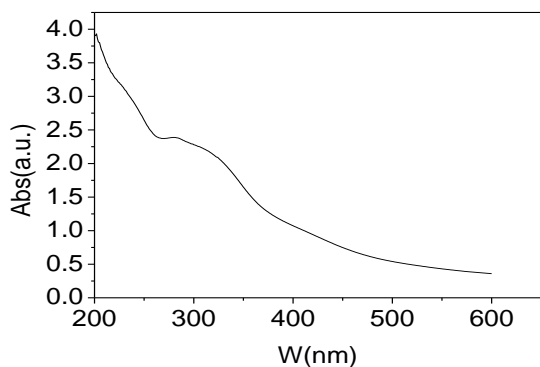
شکل ۲ ذرات simonkolleit را نشان می‌دهد. در این

تصاویر اندازه نانوذرات حدود ۴۵ نانومتر و ذرات شش

ضلعی هستند.



شکل ۲. تصویر TEM از نانوذرات اکسید روی



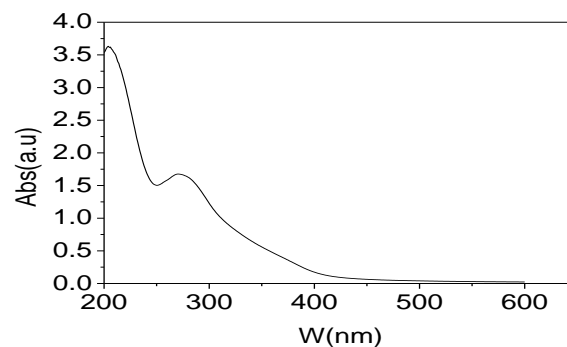
شکل ۴. طیف جذب UV-vis نانوذرات simonkolleit

### تجزیه و تحلیل FTIR نانوذرات simonkolleite

نانوذرات سبز سنتز شده از عصاره آبی برگ‌های اکالیپتوس به دلیل پیوند هیدروژنی به گروه‌های هیدروکسیل، اوج خود را در  $3452.92 \text{ cm}^{-1}$  دارند. قله  $2854.13 \text{ cm}^{-1}$  آلدئیدها را نشان می‌دهد. قله  $1620.88 \text{ cm}^{-1}$  نیز گروه کربونیل را نشان می‌دهد.  $1044.26 \text{ cm}^{-1}$  Peak گروه آمینی برای ارتعاش کششی ناشی از ارتعاش کششی است. پیک  $466.689 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به اکسید فلز و قله  $2925.48 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به خمش متیلن است (شکل ۵).

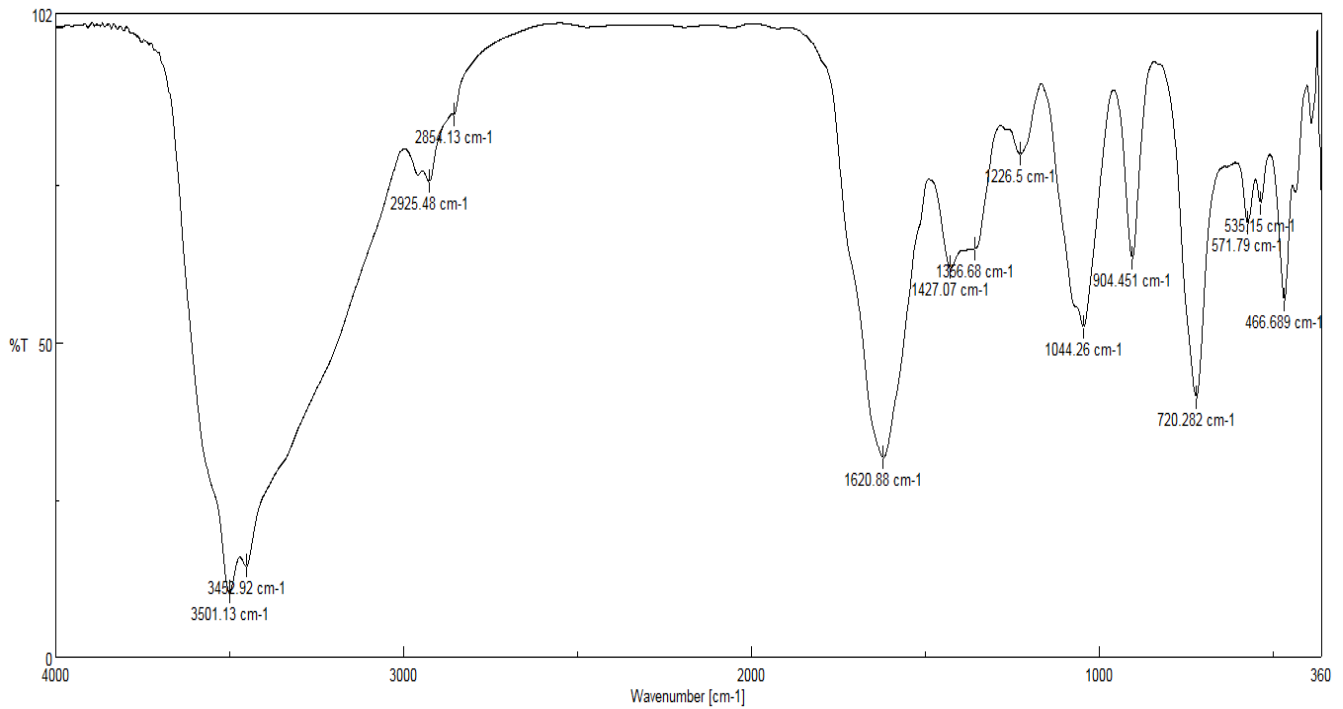
### اندازه‌گیری طیف سنجی ذرات simonkolleite و اکالیپتوس ملیدورا (Uv-vis):

در شکل ۳ طیف جذب نانوذرات توسط اسپکتروفوتومتر (Uv-visSERIES8000CECIL) انجام شده است. نرخ جذب simonkolleite در محدوده طول موج ۲۷۹ نانومتر و محدوده طول موج عصاره اکالیپتوس ۲۷۱ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴).



شکل ۳. طیف جذب UV-vis عصاره اکالیپتوس



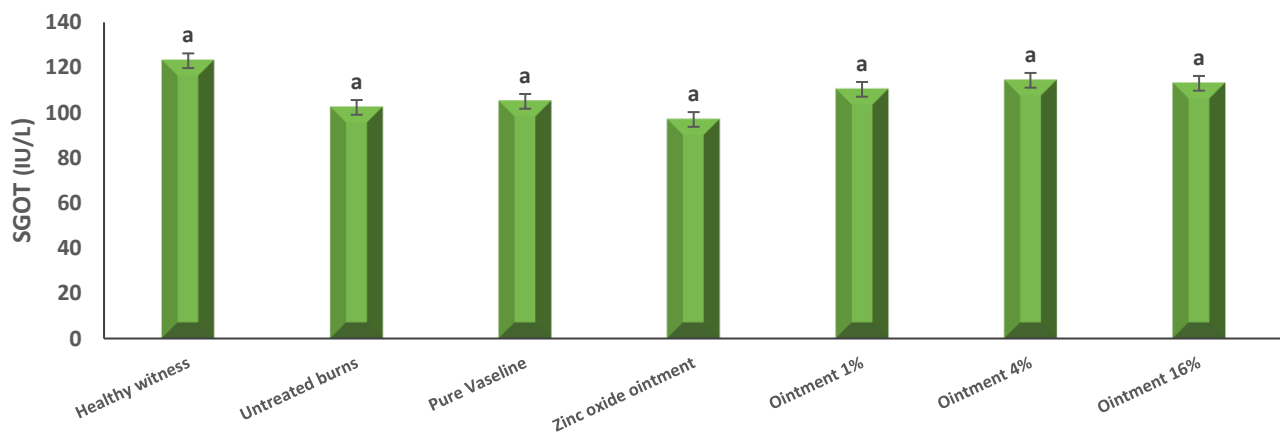


شکل ۵. تجزیه و تحلیل FTIR نانوذرات simonkolleite

### SGOT

بالاترین و در گروه پماد اکسید روی کمترین بود، اما این تفاوت‌ها معنی دار نبود. در سطح ۱٪ معنی دار نیست (شکل ۶).

مقایسه این عامل بین گروه‌های مورد مطالعه تفاوت محسوس و معنی داری را نشان نمی‌دهد (P-value = 0.169 = آنالیز واریانس). میانگین در گروه کنترل سالم

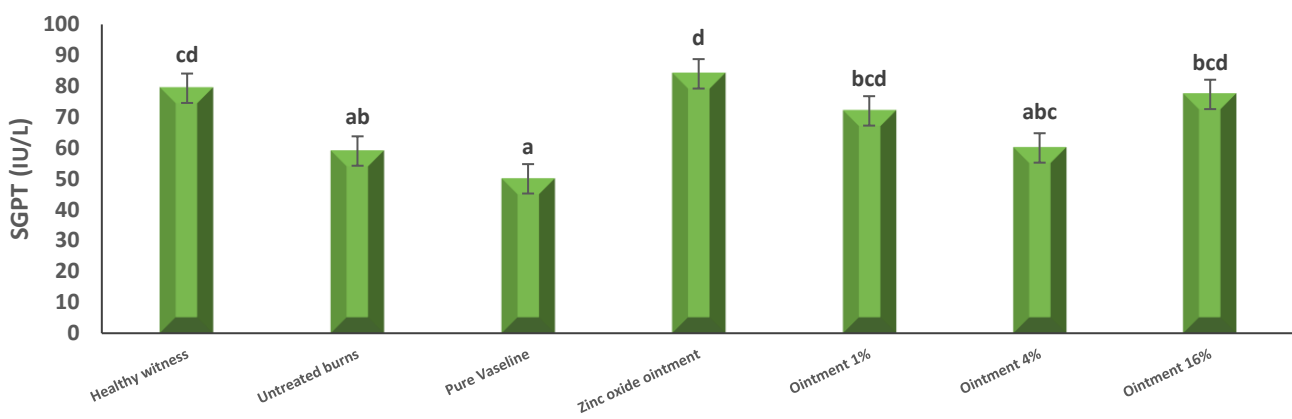


شکل ۶. فعالیت آنزیم SGOT در همه گروه‌ها ( $p < 0.05$ )

## SGPT

گروه وازلین خالص به  $2/00 \pm 5/00$  کاهش یافت و این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P = 0/043$ ). همچنین میانگین فعالیت SGPT در گروه دریافت‌کننده پماد اکسید روی  $84 \pm 23$  بود که نسبت به وازلین خالص  $2/00 \pm 5/00$  افزایش معنی‌داری داشت. میانگین فعالیت این آنزیم در سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت ( $P = 0/016$ ) (شکل ۷).

مقایسه میانگین این عامل بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان داد ( $P\text{-value} = 0.09 > 0.05 =$  تجزیه و تحلیل واریانس). میانگین در گروه وازلین خالص کمترین و با دو گروه پماد اکسید روی و کنترل سالم که بالاترین میانگین را داشتند تفاوت معنی‌داری داشت. میانگین در سایر گروه‌ها تقریباً مشابه بود و از نظر آماری تفاوتی نداشت. مقایسه میانگین SGPT در گروه‌های مختلف با آزمون ANOVA نشان داد که میانگین فعالیت SGPT در گروه کنترل سالم  $2/5 \pm 79/33$  بود که در

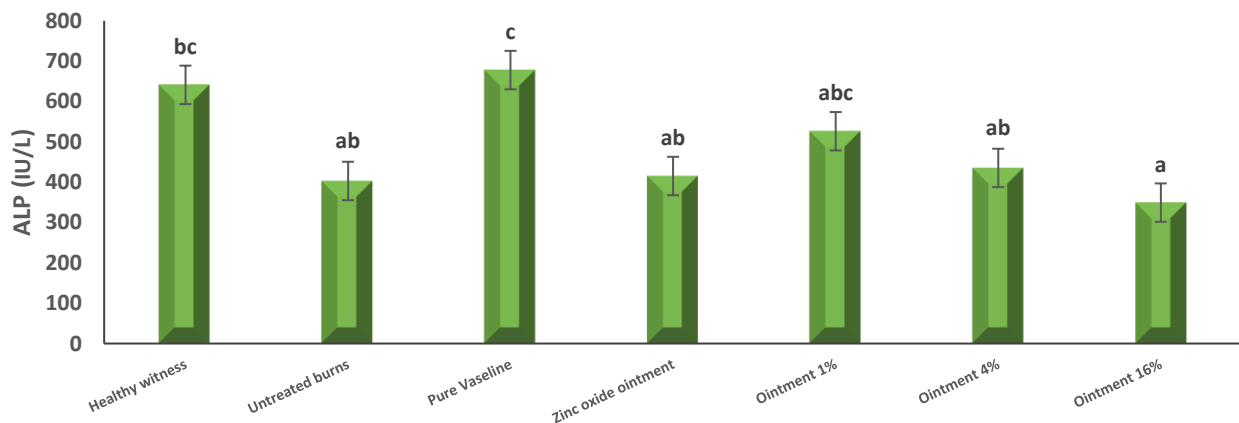


شکل ۷. فعالیت آنزیم SGPT در همه گروه‌ها ( $p < 0/05$ )

## ALP

در گروه پماد ۱۶ درصد کمترین میزان بوده و تنها با دو گروه کنترل سالم و وازلین خالص (بیشترین میانگین) تفاوت معنی‌داری وجود دارد. میانگین در سایر گروه‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۸).

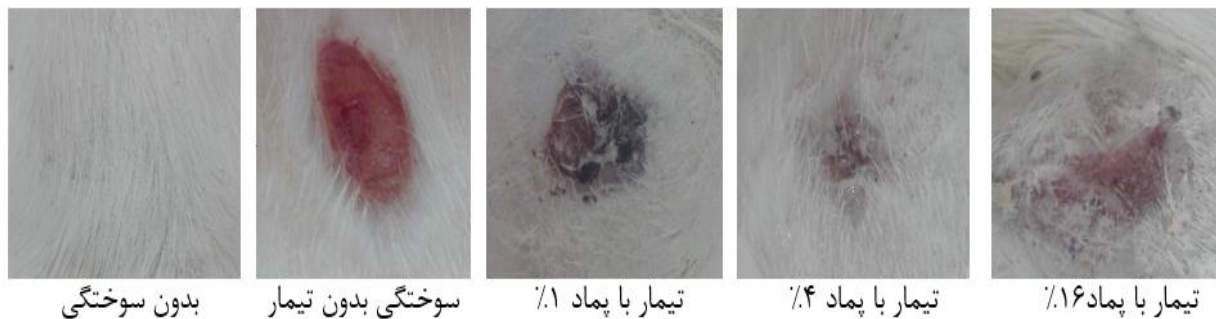
مقایسه میانگین فعالیت این عامل در بین گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری را نشان داد ( $P = 0/047 > 0/05$ ). اما مقدار احتمال مرزی است و پس از آزمون توکی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. با توجه به آمار توصیفی می‌توان گفت که میانگین



شکل ۸. فعالیت آنزیم SGPT در همه گروه‌ها ( $p < 0/05$ )

کنترل می باشد. مقایسه میانگین قطر زخم در بین گروه‌های مورد مطالعه نشان داد میانگین قطر زخم در گروه شاهد سوختگی بر حسب میلی متر ( $20 \pm 8.64$ ) با گروه حاوی نانوذرات سبز روی ( $20 \pm 4.48$ ) تفاوت معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0.05$ ).

از آنجایی که قطر سوختگی در گروه‌های مختلف مقایسه گردیده است، نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می دهد که پماد ۴ درصدی حاوی نانوذرات سبز روی تاثیرات ترمیم کننده بهتری در مقایسه با سایر غلظت‌های تیمار در مقایسه با گروه



شکل ۹. مقایسه تاثیرات پماد حاوی نانوذرات روی در گروه‌های مختلف تیمار با گروه شاهد

داری در میزان فعالیت آنزیم های کبدی نداشته اند (شکل ۶، ۷ و ۸).

Jani و همکاران در سال ۱۹۹۰ نشان دادند که سمیت نانوذرات اکسید روی بر روی آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرائی نر با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی مرتبط بوده و در غلظت‌های بالا به بافت کبد آسیب می‌رساند و باعث افزایش سطح آنزیم‌های کبدی در پلاسما می‌شود (۳۴). با توجه به مطالعات انجام شده احتمالاً از اواسط دوره که عوامل التهابی افزایش یافت، فعالیت آنزیم‌های کبدی افزایش یافته (نتایجی که در کار ما دیده نشده)، اما پس از ترمیم

## بحث

از آنجایی که ارزیابی عملکرد کبد برای نتیجه پس از سوختگی یکی از فاکتورهای مهم جهت ایمن بودن پمادها و ترکیبات ضد سوختگی است، هم‌چنین کاهش آسیب کبدی و ترمیم عملکرد کبد باعث بهبود عوارض و مرگ و میر بیماران سوختگی شدید می‌شود (۳۳). بنابراین به دلیل اینکه در این مطالعه از نانو پمادها برای ترمیم زخم برای سه گروه استفاده شد، لذا در این تحقیق، به بررسی فعالیت آنزیم‌های کبدی پرداخته شد. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان دادند که نانوذرات به کار رفته در تمام دوزهای مختلف ایمن بوده و تاثیر معنی

تیرگی ناشی از سوختگی تا حد زیادی بهبود یافت. نتایج به دست آمده از تحقیقات محققین فوق در راستای نتایج مطالعه حاضر در غلظت ۴ درصد (شکل ۹) برای بهبود و ترمیم زخم‌های حاصل از سوختگی می باشد. (۳۷).  
گیمر و همکارانش از نانو اکسید روی همراه با دی اکسید تیتانیوم برای ساخت کرم ضد آفتاب استفاده کردند، زیرا به راحتی توسط لایه شاخی پوست جذب می شود (۳۸). پارک و همکارانش به این نتیجه رسیدند که نانوذرات روی با قطر ۱۰۰ نانومتر دارای خواص سمی هستند، اما نانوذرات با قطر ۲۰ نانومتر عملکرد خوبی برای درم دارند. نتایج حاصل از این تحقیق در راستای نتایج به دست آمده از تحقیق ما بود که احتمالاً مشابه بودن قطر نانوذرات (۱۶ نانومتر) با تحقیق فوق، دلیل به دست آمدن نتایج مشابه است در مطالعه Park و همکاران در سال ۲۰۱۰، نتایج نشان داد سمیت نانوذرات روی توسط تیزولی بلو و تترازولیم برومید تشخیص داده می شود که پوست تحت درمان با پماد نانوذرات اکسید روی دارای زخم‌های کوچک تر و جای سوختگی بسیار کوچک است. نتایج به دست آمده از تحقیقات فوق در راستای گروه درمان با پماد ۴ درصد، در مطالعه فوق می باشد. این نتایج به وضوح قابل مشاهده بود و از عمیق شدن زخم جلوگیری کرد (۳۸).

### تعارض منافع

نویسندگان مقاله تعرضی در منافع ندارند.

### فهرست منابع

1. Nagati V, Koyyati R, Donda MR, Alwala J, Kundle KR, Padigya PR. Green Synthesis and characterization of Silver

ضایعات پوستی در روز ۲۱ ام، این التهابات فروکش کرده و متعاقباً فعالیت آنزیم‌های کبدی به حالت عادی بازگشت. در مطالعه دیگری Chiang و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که تاثیرات نانوذرات اکسید روی و کلرید روی بر روی کبد و کلیه موش‌ها باعث افزایش فعالیت پلاسمایی ترانس آمینازها و همچنین افزایش معنی دار محتوای روی در کبد و کلیه شده است. یعنی نانوذرات در این اندام‌ها رسوب کرده اند و از طرفی به علت افزایش فعالیت ترانس آمینازها به کبد آسیب رسانده اند. نتایج به دست آمده از تحقیق ما بر خلاف یافته‌های محققین فوق بر ایمن بودن نانوذرات سبز حاوی روی بر آنزیم‌های کبدی دارد احتمالاً تفاوت در نحوه ساخت، قطر نانوذره و غلظت به کار رفته در تحقیق ما در روز ۲۱ دلیل عمده این تفاوت است (۳۵). Wang و همکارانش در سال ۲۰۰۸ سمیت نانوذرات روی را به طور خوراکی از طریق گاوآژ در موش بررسی کردند. در مقایسه با گروه کنترل، سلول‌های طحال و مغز طبیعی بودند، در حالی که سایر اندام‌های اصلی از جمله قلب، ریه‌ها، کبد و کلیه‌ها از بین رفته بودند. دلیل ایمن بودن تحقیق ما در مقایسه با یافته‌های محققین فوق، احتمالاً متفاوت بودن نحوه تیمار موضعی در مقایسه با گاوآژ می باشد (۳۶). Cross و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در مطالعه خود دریافتند که کاربرد موضعی نانوذرات روی با قطر ۲۵-۳۰ نانومتر باعث شفافیت پوست می شود. در آزمایشی که در طول درمان پوست سوخته انجام شد،

nanoparticles from *Cajanus cajan* leaf extract and its antibacterial activity. *Int J Nanomater Biostruc.* 2012; 2(3): 39-43.

2. Atta AM, Al-Lohedan HA, Ezzat AO. Synthesis of silver nanoparticles by green method stabilized to synthetic human stomach fluid. *Molecules*. 2014;19(5):6737-53.
3. Poovizhi J, Krishnaveni B. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles synthesized from *calotropis procera*. *Int J Pharmaceut Sci Drug Res*. 2015; 7(5): 425-431.
4. Karimi J, Mohsenzadeh S. Plant synthesis of silver nanoparticles by *Achilleawilhelmsii* Pharmaceutical plant. *Razi Journal of Medical Sciences*. 2013; 20(111): 64-9.
5. Supraja S, Mohammed AS, Chakravarthy N, Jayaprakash PA, Elumalai S, Kalimuthu K, et al. Green synthesis of silver nanoparticles from *Cynodon Dactylon* leaf extract. *Int J Chem Tech Res*. 2013; 5(1):271-7.
6. Ramesh P, Rajendran A, Meenakshisundaram M. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using flower extract *cassia auriculata*. *J NanoSci NanoTechnol*. 2014; 2(1): 41-5.
7. Jamdagni P, Khatri P, Rana JS. Nanoparticles based DNA conjugates for detection of pathogenic microorganisms. *Int Nano Lett*. 2016; 6(3):139-46.
8. Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *J Adv Res*. 2016; 7(1):17-28.
9. Handy RD, von der Kammer F, Lead JR, Hassellöv M, Owen R, Crane M. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*. 2008;17(4):287-314.
10. Choi, O., Deng, K.K., Kim, N.J., Ross, N.J., Jr, L., Surampalli, R.Y., Hu, Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth, *Water Res*. (2008) 42, 3066–3074.
11. Christ-Crain M, Meier CPuder J, Staub J, Huber P, Keller U. Changes in liver function correlate with the improvement of lipid profile after restoration of euthyroidism in patients with subclinical hypothyroidism. *Excli J*. 2004; 3: 9.
12. Panyam J, Labhsetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003; 55: 329-47.
13. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl pharmacol*, 2009; 236: 310-8.
14. Rastogi ID. Nanotechnology: safety paradigms *J Toxicol Environ Health*. 2012; 4: 1-12.
15. Susan WP, Williw GM, Maaik VJ. Nanosilver- a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicol*. 2009; 3: 109-38.
16. Portney NG, Ozkan M. Nanotechnology: drug delivery, imaging, and sensing. *Anal Bioanal Chem*. 2006; 384: 620-30.
17. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro* 2005; 19: 975-83.
18. Heikal TM, Ghanem HZ. and Soliman, MS. Protective effect of green tea extracts against Dimethoate induced DNA damage and oxidant/antioxidant status in male rats. *Biol Health Sci. Bulletin* 2011; 3: 1-11.
19. Parivar K, Yaghmaie P, Hayati Roodbari N, Mohammadi Mohaghegh P. Effect of synchronized oral administration and topical application kombucha on third-

degree burn wounds regeneration in mature rats. *Medical Sciences* 2012; 22: 1-11.

20. Hala M. G., Mahfouz M. H. (2008). Biochemical Alterations Of Amino Acids, Neurotransmitters And Hepatic Functions After Thermal Injury In Rats. *Egyptian Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2008; 26 (2): 13-28.

21. Jeschke MG, Low JF, Spies M, et al. Cell proliferation, apoptosis, NF-kappaB expression, enzyme, protein, and weight changes in livers of burned rats. *Am. J. hysiol.Gastrointest.Liver. Physiol* 2001; 280: 1314–1320.

22. Jeschke MG, Low JF, Spies M, Vita R, Hawkins HK, Herndon DN, Barrow RE. Cell proliferation, apoptosis, NF-kappaB expression, enzyme, protein, and weight changes in livers of burned rats. *Am. J. Physiol.Gastrointest.Liver.Physiol* 2001; 280: G1314 -G1320.

23. Moshage H. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J.Pathol* 1997; 181: 257-266.

24. Liao CC, Rossignol AM. Landmarks in burn prevention. *Burns* 2000; 26(5): 422-434.

25. Cano N, Gerolami A. Intrahepatic cholestasis during total parenteral nutrition. *Lancet*. 1983; 1: 985.

26. Burns Fact sheet N°365. WHO. April 2014. Archived from the original on 2015; 11: 10.

27. Wallace A. B.. The Treatment of Burns. Lord Horder. Oxford University Press 1941.

28. Moss DW, Henderson R. Clinical enzymology. In: Burtis CA, Ashwood ER. Eds. *Tietz textbook of clinical chemistry* 3th ed. Philadelphia:W.B Saunders Company 1999; 617-712.

29. Kwon JT, Hwang SK.. Minai-Tehrani A. Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice. *J Occup Health* 2008; 50; 1-6.

30. Batra N, Nehru B, Bansal MP. Influence of lead and zinc on rat male reproduction at biochemical and

histopathological levels. *J Appl Toxicol* 2002; 1(6): 507-512.

31. Lockman PR, Oyewumi MO, Koziara JM, Roder KE, Mumper RJ, Allen DD. Brain uptake of thiamine-coated nanoparticles. *J Control Release* 2003; 93(3): 271-282.

32. Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT.. *Pharm J. Pharmacol* 1990; 42: 821-826.

33. Chiang HM, Xia Q, Zou X, Wang C, Wang S, Miller BJ, Howard PC, Yin JJ, Beland FA, Yu H, Fu PP. Nanoscale ZnO induces cytotoxicity and DNA damage in human cell lines and rat primary neuronal cells. *J Nanosci Nanotechnol* 2012; 12(3): 2126-2135.

34. Wang B, Feng W, Wang M, Wang T, Gu Y, Zhu M, Ouyang H, Shi J, Zhang F, Zhao Y. Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. *J Nanopart Res* 2008;10: 263-276.

35. Joh DY, Kinder J, Herman LH, Ju S. Single-walled carbon nanotubes as excitonic optical wires. *Nat Nanotecho* 2011; 16: 51-56.

36. Cross SE, Innes B, Roberts MS, Tsuzuki T. Robertson TA, McCormick P. Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin Pharmacol Physiol* 2007; 20: 148-54.

37. Gamer A, Leibold E, van Ravenzwaay B. (2006). The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. *Toxicol In Vitro* (2006); 20: 301–307.

38. Park YH, Kim JN, Jeong SH, Choi JE, Lee SH, Choi BH, et al. Assessment of dermal toxicity of nanosilica using cultured keratinocytes, a human skin equivalent model and an in vivo model. *Toxicology* 2010; 267: 17.



## Green synthesis of zinc nanoparticles and investigation of its changes on liver enzymes and its effect on wound healing caused by burns in laboratory Wistar male rats

Zahra Sinaee pour Fard<sup>1</sup>, Noushin Naghsh<sup>2</sup>, Nasrin Yazdanpanahi<sup>3</sup>, Gholam Reza Amiri<sup>4</sup>

1- PhD student of Physiology, Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

2- Associate Professor, Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. Corresponding author: n\_naghsh@yahoo.com

3- Assistant Professor, Department of Biotechnology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

4- Associate Professor, Department of Physic, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Received: 2022.08. 11

Accepted: 2022.10.31

### Abstract

**Introduction & Objective:** Currently, zinc and its compounds are used as a suitable material for the treatment of infection in burns, open wounds and chronic wounds. This investigation, was designed and carried out with the aim the local effect of green zinc nanoparticles on blood biochemical parameters and skin tissue repair during wound healing in laboratory rat.

**Materials and methods:** In this experimental study, 42 male Wistar rats were divided into 7 groups of 6. Then, by creating a 2 cm burn on the back of the rats, treatment was immediately performed with zinc nanoparticles ointment (1%, 4%, 16%) and zinc oxide ointment and pure Vaseline for 21 days. After sampling from the percentage of wound repair in the skin of rats was calculated. Similarly, blood sampling was done from the hearts of rats and serum was used to check biochemical parameters.

**Results:** The percentage of wound healing in the 4% ointment group and zinc oxide ointment was significantly higher than the control group. In addition, all the concentrations of ointment were safe in terms of their effect on liver enzymes.

**Conclusion:** The results of investigation showed that the ointment of 4% zinc nanoparticles was the best treatment group, which accelerated the repair of skin wounds. Based on the results of the present experimental study, probably the ointment produced by the identified green nanoparticles could be suggested as a strong repair agent in skin lesions naturally.

**Key words:** green zinc nanoparticles, wound repair, Liver enzymes.