ORIGINAL ARTICLE

Fabrication and Structural, Mechanical, and Biological Characterization of Vancomycin-Loaded Chitosan-Hydroxyapatite-Gelatin Beads for Local Treatment of Osteomyelitis

Nafiseh Jirofti[1,2],
Azadeh Shahroodi[3],
Jebreil Movaffagh[4,5],
Bibi Sedigheh Fazly Bazzaz[2,5],
Rezvan Yazdian-Robati[6],
Maryam Hashemi[7,8]

[1] PhD in Chemical Engineering, Orthopedic Research Center, Department of Orthopedic Surgery, Mashhad University of Medical Science, Mashhad, Iran
[2] Biotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[3] MSc in Microbiology, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[4] Professor, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[5] Professor, Department of Pharmaceutical Control, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[6] Assistant Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[7] Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[8] Nanotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Received October 30, 2022 ; Accepted March 12, 2023)

Abstract

Background and purpose: Topical antibiotic medication is an alternative method in treatment of local infections, especially osteomyelitis. Currently several biomaterials are used for this purpose. The present study focused on the fabrication and characterization of chitosan and Vancomycin (VCM)-loaded chitosan (CS)-hydroxyapatite (HA)-gelatin (G) bead in treatment of osteomyelitis.

Materials and methods: CS/G/HA/VCM scaffold was prepared by cross-linking using ionotropic gelling. The morphological and mechanical properties, loading efficiency and antibacterial properties were investigated and toxicity assay of fabricated structure was also analyzed.

Results: The lyophilization reduced the area, environment, and sphericity of beads. CS/G/HA/VCM structure showed smaller area (4.5 mm2) and perimeter (180 µm) compared to other structures. Suitable morphology and porosity in fabricated beads were confirmed by SEM images in CS/G/HA and CS/G structures. Reduction of strength was observed after adding VCM into fabricated structure, but this happened less in CS/G/HA/VCM structure. Release on day 14 was 58% for CS/G/HA/VCM structure. AddingVCM into CS/VCM (1.88 Mpa) and CS/G/VCM (10.46 Mpa) structures decreased the mechanical strength while it increased the mechanical strength in CS/G/HA/VCM (83.21 Mpa) structure. No toxic activity of fabricated structures was seen against NIH 3T3 cells. The results of the antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* showed that chitosan beads containing VCM (CS/VCM, CS/G/VCM, CS/G/HA/VCM) could significantly inhibit the growth of *S. aureus* compared to the positive control (VCM 5%)($P<0.001$).

onclusion: According to current study, the CS/G/HA/VCM structure can be introduced as a promising candidate in treatment of osteomyelitis.

Keywords: bead, osteomyelitis, vancomycin, hydroxyapatite

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (220): 1-18 (Persian).

Corresponding Author: Maryam Hashemi - Nanotechnology Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. (E-mail: HashemiM@mums.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و سوم شماره ۲۲۰ اردیبهشت سال ۱۴۰۲ (۱-۱۸)

ساخت و ارزیابی خواص ساختاری، مکانیکی و بیولوژیکی گویچه‌های کیتوزان-هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین حاوی وانکومایسین جهت درمان موضعی استئومیلیت استخوانی

نفیسه جیرفتی[۱و۲]
آزاده شاهرودی[۳]
جبرائیل موفق[۴]
بی‌بی صدیقه فضلی بزاز[۲و۵]
رضوان یزدیان رباطی[۶]
مریم هاشمی[۷و۸]

چکیده

سابقه و هدف: دارورسانی موضعی آنتی‌بیوتیک‌ها روش جایگزین در درمان عفونت‌های استخوانی مطرح شده است. در حال حاضر زیست مواد متعددی برای دارورسانی موضعی مورد استفاده قرار گرفته است. هدف از مطالعه حاضر، تهیه و بررسی خصوصیات گویچه‌های کیتوزان(CS) و کیتوزان-هیدروکسی آپاتیت- ژلاتین حاوی وانکومایسین (CS/G/HA/VCM) در درمان استئومیلیت بود.

مواد و روش‌ها: گویچه‌ها با روش ایجاد اتصال متقاطع به واسطه ژل شدن یونوتروپیک تهیه شدند. خواص ساختاری و مکانیکی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. میزان بارگیری وانکومایسین، پروفایل آزادسازی وانکومایسین از گویچه‌های حاوی دارو و فعالیت آنتی‌باکتریال و میزان سمیت در ساختارهای تولیدی ارزیابی شد.

یافته‌ها: لیوفیلیزه کردن گویچه‌ها در بیش‌تر موارد سبب کاهش در مساحت، محیط گویچه‌ها شده است و گویچه CS/G/HA/VCM مساحت ($۴/۵mm^2$) و کرویت (۱۸۰µm) کم‌تری نسبت به بقیه گویچه‌ها داشت. تصاویر SEM تایید‌کننده مورفولوژی مناسب و تخلخل قابل قبول در گویچه‌های CS/G/HA و CS/G بود. افزودن وانکومایسین به گویچه‌ها، باعث ایجاد حالت شکننده در آن‌ها شد که این تغییرات در گویچه CS/G/HA/VCM کم‌تر بود. هم‌چنین در روز ۱۴مطالعه، میزان رهش دارو در گویچه CS/G/HA/VCM ۵۸ درصد بود. نتایج تست مکانیکی نشان داد که افزودن وانکومایسین به گویچه CS/VCM (۱/۵۵MPa) و CS/G/VCM (۱۰/۴۶MPa) سبب کاهش استحکام مکانیکی آن‌ها و افزودن این دارو به گویچه CS/G/HA/VCM سبب افزایش استحکام مکانیکی (۸۳/۲۱MPa) شد. عدم سمیت تست سمیت گویچه‌ها پس از لیوفیلیزه شدن در برابر سلول‌های NIH 3T3 تایید شد. نتایج تست میکروبی در برابر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که گویچه‌های کیتوزان حاوی دارو (CS/VCM، CS/G/VCM، CS/G/HA/VCM) به شکل معناداری نسبت به کنترل مثبت(وانکومایسین ۵ درصد) افزایش در مساحت هاله عدم رشد داشتند($P<۰/۰۰۱$).

استنتاج: بر اساس نتایج به‌دست آمده ساختار CS/G/HA/VCM احتمالا بتواند به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای کاهش و درمان عفونت‌های استئومیلیت معرفی شود.

واژه های کلیدی: گویچه، استئومیلیت، وانکومایسین، هیدروکسی آپاتیت

مقدمه

بیماری استئومیلیت، عفونت مزمن استخوانی است که بیش از همه توسط باکتری‌های پیوژن و مایکوباکتری‌ها ایجاد می‌شود(۱). وانکومایسین از آنتی‌بیوتیک‌های موثر در درمان عفونت‌های مزمن استخوانی می‌باشد و تاثیر

مولف مسئول: مریم هاشمی- مشهد: دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات نانوفناوری E-mail: HashemiM@mums.ac.ir
۱. دکترای تخصصی مهندسی شیمی، گروه ارتوپدی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات ارتوپدی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پژوهشکده فناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۳. کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۴. استاد، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۵. استاد، گروه کنترل دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۶. استادیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۷. استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۸. مرکز تحقیقات نانوفناوری، پژوهشکده فناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
تاریخ دریافت : ۱۴۰۱/۸/۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۴۰۱/۹/۵ تاریخ تصویب : ۱۴۰۲/۱۲/۲۱

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

آن‌ها در برابر گونه‌های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) بررسی و تایید شده است(۲). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های سیستمیک با مشکلاتی همراه هستند از جمله این‌که به تنهایی غلظت زیادی از دارو را درموضع ایجاد نمی‌کند و تجویز مکرر آن‌ها به فرم سیستمیک موجب سمیت همراه با مشکلات کلیوی وکبدی می‌شود(۳۴). از این‌رو دارورسانی موضعی آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌عنوان یک روش جایگزین در درمان عفونت‌های موضعی به‌خصوص استخوانی مطرح می‌شود. این روش با امکان بارگیری غلظت بالایی از آنتی‌بیوتیک، امکان آزادسازی طولانی مدت، کاهش سمیت سیستمیک و نیز امکان دارورسانی به مناطق فاقد عروق را تامین می‌کند(۵). در حال حاضر زیست مواد متعددی برای دارورسانی موضعی مورد استفاده قرار گرفته‌اند(۶). گویچه‌ها به عنوان سیستم‌های دارورسانی با رهش آهسته و یا کنترل شده دارو، می‌توانند سطح وسیع‌تری از انتقال دارو را فراهم کرده و تخمین راحت‌تری از رفتار انتشار و انتقال جرم را داشته باشند(۸،۷).

هدف از مطالعه حاضر تهیه و بررسی خصوصیات گویچه‌های کیتوزان حاوی وانکومایسین، و موثر در درمان استئومیلیت می‌باشد که توسط ژلاتین و هیدروکسی آپاتیت خواص فیزیکو شیمیائی آن‌ها بهبود داده شده است. ماتریکس‌های کیتوزان به‌عنوان سیستم انتقال موضعی دارو در دارورسانی آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان استئومیلیت و عفونت‌های داخل استخوان کاربرد گسترده‌ای داشته و به‌دلیل ترمیم و بازسازی بافت استخوانی به عنوان جایگزین استخوان، در نقایص استخوانی مورد استفاده قرار می‌گیرند(۹). ژلاتین پروتئینی محلول است که از هیدرولیز نسبی کلاژن حاصل از استخوان‌ها و پوست حیوانات به‌دست می‌آید(۱۱،۱۰). ژلاتین به‌عنوان یک پروتئین طبیعی، زیست سازگاری بالایی داشته و در زمینه دارویی پزشکی کاربرد گسترده‌ای دارد(۱۲). هیدروکسی آپاتیت (HA) یکی از مواد آلی موجود در استخوان‌های بدن می‌باشد که به‌عنوان یکی از مهم‌ترین زیست سرامیک‌ها در پزشکی کاربردهای گسترده‌ای دارد(۱۳). HA به‌دلیل خواص زیستی منحصربه فرد و شباهت ساختاری زیاد به بافت سخت استخوان، در حوزه ارتوپدی توجه زیادی را به خود جلب کرده است و به‌دلیل داشتن خاصیت زیست فعالی، می‌تواند به عدم تحلیل رفتن استخوان و قابلیت تحریک رشد استخوان، ایجاد پیوند مستقیم و چسبندگی مطلوب با بافت استخوان کمک کند(۱۴). در این راستا با توجه به مطالب بیان شده و ویژگی‌های CS، G و HA به‌عنوان حامل‌های داروئی، مطالعه پیش‌رو، تهیه و بررسی خواص ساختاری، مکانیکی و بیولوژیکی گویچه‌های CS و CS/G/HA/VCM و بررسی عملکرد آن‌ها در درمان استئومیلیت می‌باشد. در ادامه خواص ساختاری گویچه‌های ساخته شده و خواص مکانیکی و بیولوژیکی آن‌ها در شرایط برون‌تنی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کیتوزان (CS) با وزن مولکولی پایین و درصد دی‌استیلاسیون ۵۰۰۰۰-۱۹۰۰۰۰، ژلاتین (G) (وزن مولکولی 60 kDa) و هیدروکسی آپاتیت (HA) از کمپانی سیگماآلدریچ تهیه شدند. اسیداستیک گلاسیال (۹۹/۷ درصد)، تری پلی فسفات (TPP) از کمپانی مرک و محیط کشت تریپتیک سویا آگار (TSA-M290-500G) از کمپانی HIMEDIA تهیه شدند. تهیه آنتی‌بیوتیک وانکومایسین (VCM) و محلول فسفات نرمال سالین به ترتیب ازشرکت داروسازی زکریا وشرکت آریا فن‌فرزان انجام گرفت. تمام مواد بدون هیچ‌گونه خالص‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند. هم‌چنین تمام آزمایشات تحت تایید کمیته اخلاق پژوهشی (با کد اخلاق: IR.MUMS.PHARMACY.REC.1398.31) دانشگاه علوم پزشکی مشهد (مشهد، ایران) انجام شد.

ساخت گویچه‌های کیتوزان/ وانکومایسین

ساخت گویچه‌های CS با استفاده از روش ایجاد اتصال متقاطع به واسطه ژل شدن یونوتروپیک

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

(gelation ionotropic) با استفاده از تری‌اتیل فسفات TPP انجام شد(۱۵۱۶). بدین منظور محلولی یکنواخت از CS و VCM با استفاده از انحلال 200 mg از CS و 500mg از VCM در محلول اسیداستیک درصد ۱ ساخته شد و به‌مدت یک ساعت بر روی هم زن با سرعت 1000rpm قرار گرفت. محلول پلیمری حاوی دارو به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد کنار گذاشته شد تا ازخروج حباب‌های هوا اطمینان حاصل شود. بدین‌ترتیب غلظت ۵ درصد از دارو تهیه شد. در ادامه محلول TPP 10% w/v با استفاده از بافر فسفات با pH 6–6.5 تهیه شد. محلول CS حاوی دارو خیلی آهسته به محلول TPP اضافه شد. سپس گویچه‌های کراس لینک شده، با آب مقطر شسته و طی مدت ۲۴ ساعت، لیوفیلیزه شد.

ساخت گویچه‌های کیتوزان/ژلاتین/ وانکومایسین

وزن مشخصی از ژلاتین در استیک اسید۱درصد حل و به نسبت مشخص به محلول CS حاوی VCM اضافه گردید. نسبت وزنی کیتوزان:ژلاتین ۱:۴ در نظر گرفته شد. محلول فوق در دمای 25°C به‌صورت خیلی آهسته به محلول TPP 10% w/v درصد w/v با pH ۶/۵-۶ اضافه و بدین ترتیب غلظت ۴ درصد ژلاتین در گویچه به‌دست آمد. در ادامه گویچه‌ها توسط فیلتراسیون (صافی) جدا و پس از شستشوی کامل به مدت ۲۴ ساعت لیوفیلیزه شدند.

ساخت گویچه‌های کیتوزان/ژلاتین/هیدروکسی آپاتیت/ وانکومایسین

گویچه‌های پلیمری با استفاده از روش ایجاد اتصال متقاطع به واسطه ژل شدن یونوتروپیک، و با استفاده از تیتراسیون محلول‌پلیمری (حاوی دارو و پودر سرامیکی) در محلول تری پلی فسفات تهیه شدند. در این راستا ابتدا محلول w/v ۲ درصد CS با استفاده از حلال اسید استیک ۱درصد تهیه شد. در ادامه پودر HA به مدت ۲ ساعت در آب دیونیزه پراکنده و سپس به آرامی به محلول CS اضافه شد. محلول w/v ۵ درصد از دارو با حل کردن ۵۰۰ mg از VCM در محلول CS به دست آمد. با توجه به نسبت انتخابی کیتوزان:ژلاتین که در این مطالعه با انجام آزمایشاتی، ۱:۴ در نظر گرفته شد، جهت افزودن مقدار معین از ژلاتین به محلول کیتوزان، ابتدا بر اساس نسبت مورد نظر، وزن مشخصی از ژلاتین لیوفیلیزه در مقدار کمی اسید استیک ۱درصد پراکنده شد. در ادامه محلول ژلاتین به‌دست آمده به‌محلول CS و VCM اضافه شد و به‌مدت یک ساعت روی هم زن با سرعت ۱۰۰ rpm قرار داده شد تا محلول یکنواختی به‌دست آید. در نهایت گویچه‌ای کیتوزان/ژلاتین/هیدروکسی آپاتیت/وانکومایسین) CS/G/HA/VCM کراس لینک شده، با آب مقطر اولتراپیور شسته و به مدت ۲۴ ساعت، فریزدرای شدند.

ارزیابی ساختاری گویچه‌ها

بازده تولید

جهت تعیین میزان بازده محصول تولید شده، باید وزن گویچه‌های تولید شده را تعیین کرد و با محاسبه مجموع وزن مواد اولیه و با استفاده از معادله شماره ۱، می‌توان درصد بازده تولید را محاسبه کرد :

معادله شماره ۱ :

$$\text{بازده درصد} = \left(\frac{\text{وزن گویچه‌ها}}{\text{وزن کل مواد اولیه خام}}\right) \times ۱۰۰$$

بررسی ابعادی گویچه‌ها

میزان کرویت، مساحت و قطر به‌عنوان مهم‌ترین خواص ظاهری گویچه‌های تولید شده، از طریق تصاویر گرفته شده به کمک دوربین دیجیتال (OLYMPUS 7.1 M.p) وپردازش آن‌ها توسط "نرم‌افزار نهامین داده پردازان" (MIP) مورد بررسی و اندازه‌گیری قرار گرفت.

بررسی خواص ساختاری و مورفولوژی گویچه‌ها

میزان تخلخل، مورفولوژی سطح و ساختار داخلی گویچه‌های حاوی دارو و فاقد دارو با استفاده از تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (VP 1450–LeoGermany) مورد بررسی قرارگرفت. در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

این راستا ابتدا تمام سطح گویچه‌ها تحت پوشش‌دهی با طلا قرار گرفت و تصاویر به‌دست آمده به کمک نرم‌افزار Image J آنالیز شدند(۱۷).

طیف سنجی مادون قرمز فوریه (FTIR)

جهت بررسی گروه‌های عاملی ناشی از حضور مواد متفاوت در ساختار و واکنش‌های صورت گرفته بین آن‌ها از آنالیز طیف سنجی مادون قرمز فوریه استفاده شد. در این راستا طیف مادون قرمز، FTIR، با دستگاه طیف‌سنج Shimadzu, FTIR-4300 با قدرت تفکیک $1\ cm^{-1}$ و ناحیه طیفی $450\text{-}3500\ cm^{-1}$ انجام گرفت(۱۷).

آنالیز گرماسنجی روبشی تفاضلی (DSC)

آنالیز گرماسنجی DSC برای نمونه‌ها با استفاده از دستگاه DSC (DSC10, Nanjing Dazhan Institute of Electromechanical Technology) انجام شد. آزمایش برای وزن معینی از تمام نمونه‌ها با نرخ گرمای 10 °C/min در دامنه ۲۵ تا ۳۵۰ درجه سانتی‌گراد، تحت اتمسفر نیتروژن، انجام شد.

اندازگیری خواص مکانیکی گویچه‌ها

بررسی خصوصیات مکانیکی گویچه‌ها با استفاده از روش تست تردی (با دستگاه تست تردی) انجام گرفت. دستگاه بیان شده مجهز به یک محفظه پلاستیکی به صورت چرخان می‌باشد که این محفظه دارای لبه‌ای به منظور بارگیری نمونه‌هاست. بعد از قرارگیری نمونه‌ها در محل مشخص شده و ایجاد حالت چرخان در محفظه، گویچه‌ها به صورت متناوب از روی لبه به پائین محفظه افتاده و در نتیجه دچار فرسایش می‌شوند. شاخص یا نسبت تردی که نشان‌دهنده میزان استحکام مکانیکی نمونه‌ها یا مقاومت آن‌ها در برابر خوردگی و فرسایش می‌باشد با استفاده از فرمول داده شده محاسبه شدند:

معادله شماره ۲ :

$$\text{درصد نسبت تردی} = \left(\frac{\text{وزن گویچه‌ها در ابتدا}}{\text{وزن گویچه‌ها بعد از اتمام چرخش مدنظر}}\right) \times ۱۰۰$$

تعیین میزان بارگیری دارویی در گویچه‌ها

جهت تعیین مقدار داروی VCM بارگذاری شده در گویچه‌ها، تعداد مشخصی از گویچه‌های حاوی دارو در محلول اسید استیک ۱درصد حل شد و جذب هر نمونه با روش طیف‌سنجیUV درطول موج ۲۸۰nm (طول موج VCM)، اندازه‌گیری شد. سپس مقدار داروی بارگذاری شده، با استفاده از معادله منحنی استاندارد داروی ونکومایسین محاسبه شد. در این راستا، با تعیین مقدار تئوریک داروی بارگذاری شده در همان تعداد گویچه و مقدار دارویی که از حل کردن همین تعداد گویچه تعیین شد (منحنی استاندارد)، درصد داروی بارگیری شده با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید.

معادله شماره ۳ :

$$\text{درصد داروی بارگیری شده} = \left(\frac{\text{مقدار داروی محاسبه شده}}{\text{مقدار تئوریک دارو}}\right) \times ۱۰۰$$

بررسی میزان آزادسازی دارو در گویچه‌ها

میزان آزاد سازی دارو از گویچه‌های تولید شده با استفاده از دستگاه آزمون سرعت حلالیت انجام‌گرفت. در ابتدا جهت تعیین منحنی استاندارد، جذب نمونه در طول موج ۲۸۰ nm اندازه‌گیری شد. سپس غلظت‌های متفاوت دارو در فاصله ۰/۰۲-۰/۱۲mg/mL در بافر PBS تهیه و جذب توسط دستگاه تعیین شد. در این راستا، گویچه‌ها در دمای ۳۷ °C در سبد دستگاه با سرعت چرخش ۵۰ rpm قرار داده شد. آزادسازی دارو ابتدا در زمان‌های ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه و در ادامه تا ۴۸ ساعت اندازه‌گیری با فاصله زمانی ۲ ساعت انجام گرفت. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، اندازه‌گیری میزان داروی آزاد شده به‌صورت روزانه (هر ۲۴ ساعت یک مرتبه) تا ۱۲ روز ادامه پیدا کرد. آزمایش ۳ بار تکرار شد. نمودار آزادسازی دارو از گویچه‌ها نشان داد که ابتدا آزادی‌سازی دارو سریع بوده، سپس آزادسازی به صورت آهسته با شیب ملایم ادامه یافت و پس از ۱۲ روز به حالت ثابت رسید(۲).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

بررسی میزان سمیت در گویچه‌ها

بررسی میزان سمیت در گویچه‌های تولید شده با استفاده از سلول‌های NIH3T3 در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت انجام گرفت. ابتدا نمونه‌ها توسط غوطه‌ور کردن آن‌ها در الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳ ساعت و اشعه UV به مدت ۲۰ دقیقه سترون شدند. سپس نمونه‌ها را داخل پلیت با ۹۶ چاهک (۵۰۰۰ سلول فیبروبلاست 3T3 رت در هر چاهک) قرارداده و محیط کشت اضافه شد (محیط کشت هر سه روز تعویض گردید). پلیت به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن قرارگرفت و بعد از گذشت ۲۴ ساعت نمونه ها ازداخل انکوباتور برداشته و تکثیر و چسبندگی سلول‌ها در روزهای ۱و ۳، توسط آزمون آلاماربلو بررسی شد(۴). درنهایت با استفاده از فرمول زیر درصد کشندگی محاسبه شد که با کم کردن از صد، درصد زنده ماندن سلول ها محاسبه شد:

$$\%IC=T-UTB-UT \times 100$$

T: میزان جذب غلظت‌های مختلف نمونه‌ها در طول موج 600 nm

B: میزان جذب بلانک (دارای محیط کشت به تنهایی) در طول موج 600 nm

UT: میزان جذب کنترل منفی (دارای محیط کشت به همراه سلول) در طول موج 600nm

بررسی میزان فعالیت ضد باکتریائی گویچه‌ها

میزان فعالیت بیولوژیک ونکومایسین آزاد شده از گویچه‌ها پس از لیوفیلیزه شدن روی استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC6538p) با استفاده از روش انتشار از دیسک آنتی‌بیوتیک در محیط TSA مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا غلظت‌های 20 µg/mL تا 0.62 µg/mL از VCM تهیه شد. مشابه با غلظت‌سازی انجام شده برای دارو، غلظت‌های متفاوتی از گویچه‌های حاوی دارو نیز آماده شد. از گویچه‌های فاقد دارو نیز، غلظت‌های ۰/۶۲ mg/mL، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ تهیه گردید. وانکومایسن ۵ درصد به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. نمونه‌ها داخل پلیت حاوی ۲۴ چاهک ریخته شدند و به تمام چاهک‌ها ۲۰ µL از سوسپانسیون میکروب در محیط کشت با غلظت 10^6 CFU/mL اضافه شد. محیط کشت به‌عنوان کنترل منفی و محیط کشت حاوی میکروب به عنوان کنترل مثبت هر یک در سه چاهک ریخته شد.

آنالیز داده‌ها و محاسبات آماری

نتایج به‌صورت Mean±SD (میانگین± انحراف‌معیار) بیان شدند. جهت محاسبات آماری از برنامه نرم‌افزاری SPSS استفاده شد. مقایسه بین گروه‌های مختلف و کنترل با استفاده از تست ANOVA یک طرفه و Post test Dunnetts و جهت مقایسه بین گروه‌های مختلف Post test Tukeys kramer صورت گرفت. P<۰/۰۵ معنادار و معادل *، P<۰/۰۱ معادل**، P<۰/۰۰۱ معادل*** و P<۰/۰۰۰۱ معادل **** در نظر گرفته شد.

یافته ها

ارزیابی ساختاری گویچه‌های تولید شده

میزان بازده تولید گویچه ها

بازده گویچه‌های تولید شده در حالت‌های مختلف در جدول شماره ۱ ارائه شده است. براساس نتایج به‌دست آمده بیش‌ترین و کم‌ترین بازده به ترتیب مربوط به ساختارهای CS و CS/VCM بوده و افزودن VCMو G باعث کاهش بازده تولیدی نسبت به گویچه‌های CS می‌شوند. بر اساس نتایج به‌دست آمده تفاوت معنی‌داری بین میزان بازده به‌دست آمده در شرایط مختلف مشاهده نشد.

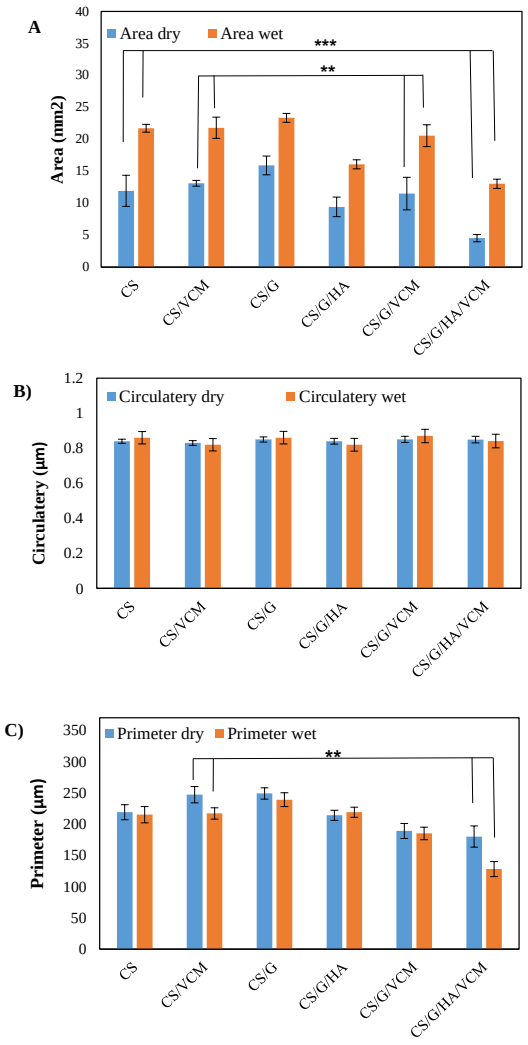
جدول شماره ۱: میزان بازده به‌دست آمده در گویچه‌های تولید شده

نوع گویچه ها	تعداد گویچه	مجموع وزن گویچه (mg)	وزن کل مواد اولیه خام(mg)	بازده (درصد)
CS	۹۳	۱۳۳/۹۲	۲۰۰	۶۶ ± ۱
CS/VCM	۱۰۵	۱۵۸/۱۳	۷۰۰	۲۲±۰/۶
CS/G	۹۰	۳۰۶/۳۶	۶۰۰	۵۱±۰/۸
CS/G/HA	۹۸	۳۰۳/۶۰۴	۷۰۰	۴۳±۰/۶
CS/G/VCM	۱۰۸	۴۷۸/۰۸۸	۱۱۰۰	۴۳±۰/۴
CS/G /HA/VCM	۹۳	۶۵۲/۶۷۹	۱۲۰۰	۵۴±۰/۵

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

بررسی ابعادی گویچه‌های تولیدی

نتایج حاصل از اندازه‌گیری مساحت، محیط، میزان کرویت و قطر گویچه‌ها قبل و بعد از فرآیند لیوفیلیزه در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در نمودارها نشان داده شده است لیوفیلیزه کردن گویچه‌ها در بیش‌تر موارد سبب کاهش مساحت، محیط و کرویت گویچه‌ها شده است.



نمودار شماره ۱: مقایسه میانگین مساحت (Area)، محیط (Circulatery) و کرویت (Primeter) بین گویچه‌ها قبل (Dry) و بعد (Wet) از لیوفیلیزه شدن (سطح معنی‌داری (**) P<۰/۰۵)

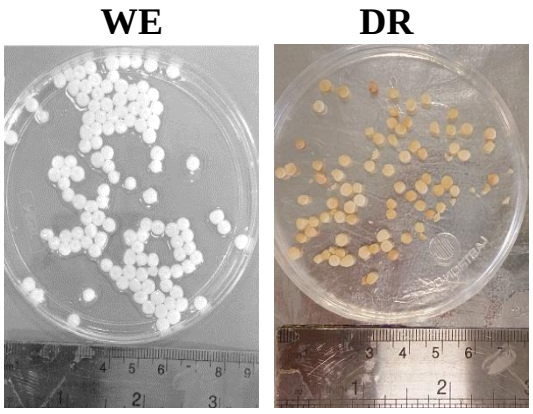
بیش‌ترین تغییرات در محیط برای گویچه‌ای CS/G/HA/VCM و CS/VCM مشاهده شد (P<۰/۰۵).

درمورد تغییرات کرویت تغییرات قابل توجهی بین کرویت گویچه‌ها قبل و بعد از لیوفیلیزه شدن دیده نشد. مساحت گویچه‌های CS/G/HA/VCM و CS/VCM نیز قبل و بعد لیوفیلیزه شدن تفاوت معنی داری نشان داد.

بررسی خواص ساختاری و مورفولوژی گویچه‌ها

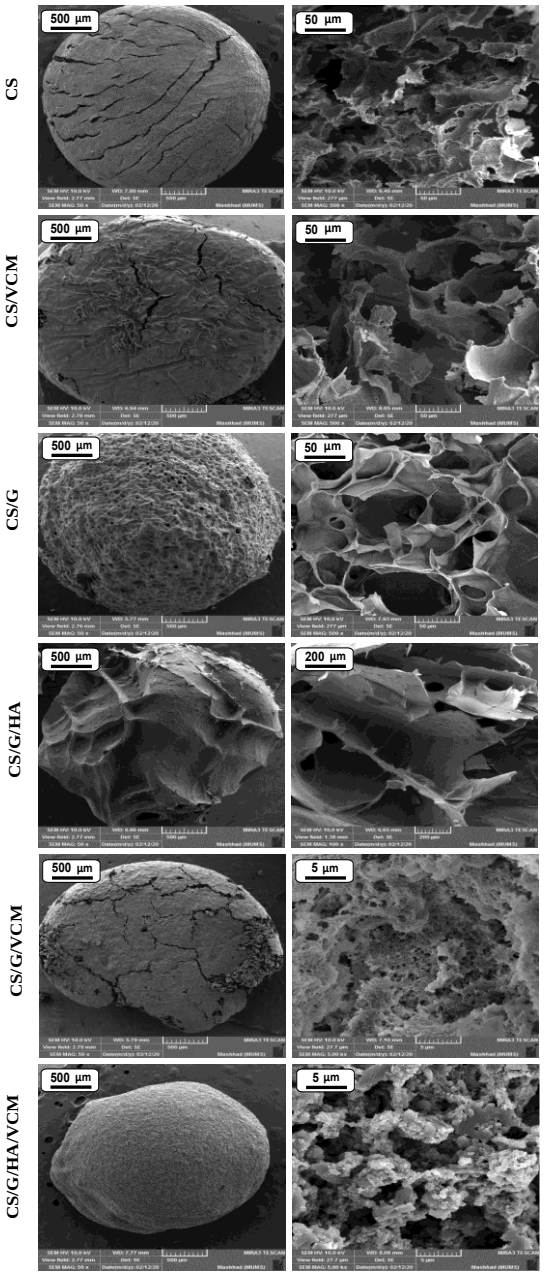
تصویری از گویچه‌های تولیدی (قبل و بعد از لیوفیلیزه) و تصاویر مربوط به بررسی خواص ساختاری در سطوح داخلی و بیرونی گویچه‌های تولید شده در تصاویر SEM به ترتیب در تصاویر شماره ۱ و ۲ ارائه شده است. تصاویر SEM به دست آمده نشان دهنده تخلخل مناسب در گویچه‌های حاوی ژلاتین در مقایسه با گویچه کیتوزان می‌باشد.

هم‌چنین تصاویر نشان دهنده تغیر سطح و تغییر در میزان تخلخل گویچه بعد از اضافه کردن هیدروکسی آپاتیت می‌باشد. بررسی‌ها نشان دهنده مناسب بودن مورفولوژی گویچه‌ها (شکل ظاهری و تخلخل قابل قبول) در گویچه‌های CS/G/HA و CS/G/ می‌باشد(۱۸). در این بین مشخص شد که افزودن وانکومایسین به گویچه‌ها، باعث ایجاد ترک و حالت شکنندگی بر روی سطح آن‌ها می شود که این تغییرات در گویچه CS/G/HA/VCM کم‌تر مشاهده گردید.



تصویر شماره ۱: تصویری از گویچه‌های CS/G/HA/VCM تولید شده در حالت WET و DRY

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

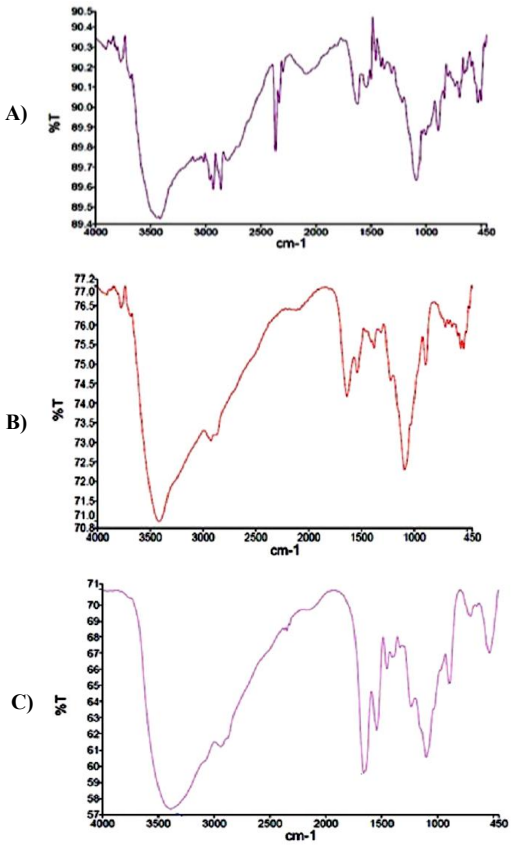


تصویر شماره ۲: تصاویر میکروسکوپ الکترونی رویشی(SEM) گویچه‌های CS، CS/VCM، CS/G، CS/G/HA، CS/G/VCM، CS/G/HA/VCM

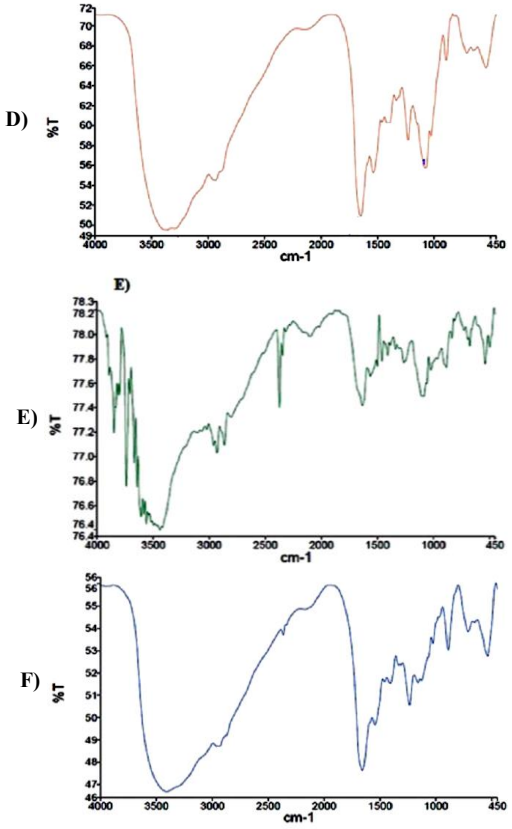
طیف سنجی مادون قرمز فوریه(FTIR)

نتایج حاصل از طیف سنجی مادون قرمز در نمودار شماره ۲ A-F ارائه شده است. براساس طیف ارائه شده در نمودار شماره ۲A ارتعاشات کششی N-H در محدوده‌های $1526cm^{-1}$ و $1634cm^{-1}$ به‌ترتیب نشان‌دهنده گروه‌های کربونیل (C=O) متصل به آمین نوع دوم (NH2) و آمین نوع اول (C=O-NH) در ساختار کیتوزان می‌باشند.

هم‌چنین ارتعاشات کششی نامتقارن مربوط به گروه‌های کربونیل (O-C-O) ناشی از پیوندهای گلیکوزیدی ساختار پلی‌ساکاریدی کیتوزان در نواحی $1148\ cm^{-1}$ و $1110cm^{-1}$ قابل مشاهده می‌باشند. مطابق پیک‌های مشاهده شده در نمودار شماره ۲B در ساختار ترکیبی CS/VCM پیک‌های حاصل در نواحی $1453\ cm^{-1}$، $1546\ cm^{-1}$ و $1660\ cm^{-1}$ به‌ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی حلقه آروماتیک (C=C) و ارتعاشات کششی C=O می‌باشند که در ساختار ترکیبی نواحی یاد شده نسبت به ساختار کیتوزان به سمت افزایش عدد موج و نسبت به ونکومایسین تغییر زیادی نداشته‌اند. پیک جذبی نامتقارن O-C-C در ناحیه cm^{-1} ۱۲۳۵ و ارتعاشات کششی C-N در نواحی $1260cm^{-1}$ و $1064\ cm^{-1}$ قابل مشاهده هستند که نسبت به ساختارهای خالص تغییر ناحیه داشته و تاییدکننده حضور کیتوران و وانکومایسین در ساختار می‌باشند. هم‌چنین ارتعاشات کششی گروه هیدروکسیل O-H (COOH) در ناحیه $3292\ cm^{-1}$ قابل مشاهده می‌باشد.



[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]



نمودار شماره ۲: تصویر طیف سنجی مادون قرمز کویچه‌های A) CS، B) CS/VCM، C) CS/G، D) CS/G/HA، E) CS/G/VCM، F) CS/G/HA/VCM

براساس تصاویرFTIR به‌دست آمده(تصویرشماره۲C-D)، ژلاتین و کیتوزان گروه‌های عاملی مشابهی دارند. در طیف FTIR به‌دست آمده پیک گسترده و پهن در ناحیه $3407\ cm^{-1}$ و پیک ضعیف در ناحیه $2932cm^{-1}$ نشان‌هنده گروه‌های هیدروکسیل (OH) و ارتعاشات کششی پیوند CH2 در ساختار ژلاتین می‌باشد. در ساختار ترکیبی CS/G/VCM پیک گسترده مربوط به ارتعاشات کششی گروه هیدروکسیل به‌راحتی قابل تشخیص است که با پیک مربوط به گروه NH و آمین نوع دوم همپوشانی دارد. به‌دلیل فعل و انفعالات الکترواستاتیک بین کیتوزان با بار مثبت و ژلاتین با بار منفی و تشکیل پلی‌الکترولیت، پیک‌های مربوط به گروه‌های آمید I و II در ساختار CS/G/VCM نسبت به ساختارژلاتین خالص تغییر شدت داشته و این پیک‌ها در نواحی $1648\ cm^{-1}$ و $1535\ cm^{-1}$ قابل مشاهده می‌باشند. علاوه بر مورد بیان شده، افزایش و کاهش شدت پیک‌های آمید I و II تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی بین گروه‌های کربوکسیل و آمید در کیتوزان و ژلاتین را نشان می‌دهد که این امر تایید‌کننده اختلاط همگن و یکنواخت ژلاتین در مخلوط کیتوزان وانکومایسین می‌باشد (نمودار شماره ۲E).

در نمودار شماره ۲F که مربوط به ساختار CS/G/HA/VCM می‌باشد، در ساختار ترکیبی پیک گروه هیدروکسیل مربوط به هیدروکسی آپاتیت با پیک اجزای دیگر در ساختار ترکیبی هم پوشانی پیدا کرده است و ناحیه مربوط به پیک OH در ساختار ترکیبی نسبت به ساختار HA، از $3316\ cm^{-1}$ به $3412\ cm^{-1}$ تغییر یافته است. هم‌چنین مکان پیک مربوط به گروه OH در هیدروکسی آپاتیت، در اثر ترکیب با کیتوزان از ناحیه $1658\ cm^{-1}$ به ناحیه $1648\ cm^{-1}$تغییر یافته است. پیک CH مربوط به PO_4 در HA، در ساختار ترکیبی ضعیف شده و به‌جای ناحیه $1030\ cm^{-1}$ در نقطه $1070cm^{-1}$ قابل مشاهده می‌باشد. هم‌چنین پیک دیگر مربوط به همین گروه در ناحیه$2926\ cm^{-1}$ قابل مشاهده بود که در ساختار ترکیبی در اثر پیوند هیدروژنی بین مولکولی قوی بین گروه هیدروکسیل و آمید در گستردگی پیک OH قرار گرفته و قابل مشاهده نیست. ارتعاشات کششی و خمشی مربوط به گروه NH آمیدی و NH آمین که در مورد کیتوران، وانکومایسین، ژلاتین و HA در محدوده نواحی $3000\text{-}3500\ cm^{-1}$ و قابل مشاهده بود در ساختار ترکیبی حاصل نیز درهمین ناحیه دیده می‌شود.

بررسی رفتار گرمائی گویچه‌ها به روش DSC

بر اساس منحنی ارائه شده در نمودار شماره ۳A پیک اندوترمیک (گرماگیر) گویچه کیتوزان که مربوط به حذف آب (دهیدراسیون) می‌باشد، در دمای $81/20\ ^oC$ مشاهده می‌شود و در دمای $256\ ^oC$ تخریب پلیمر اتفاق افتاده است. پیک اگزومتریک (گرمازا) کیتوزان در دمای حدود$300\ ^oC$ می‌باشد که شیفت این پیک به دمای $256\ ^oC$ مربوط به وجود TPP در

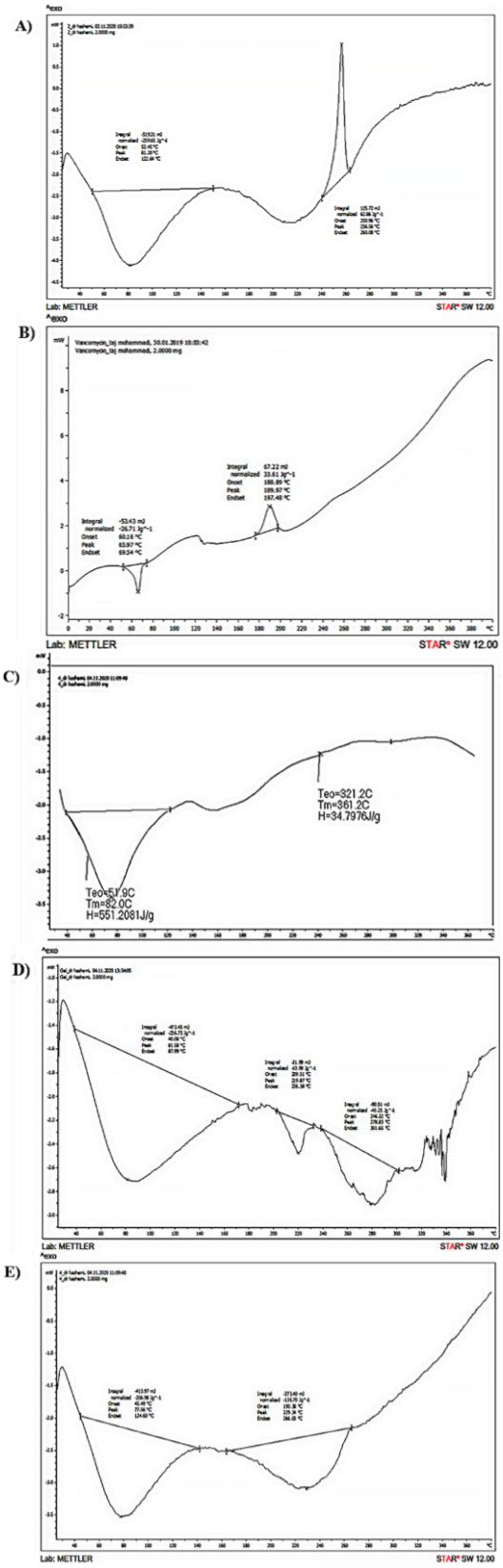
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

گویچه کیتوزان می‌باشد که دارای پیک اگزومتریک در حدود ۲۰۷°C است. براساس نمودار شماره 5B، پیک‌های اندومتریک (به علت حذف آب و دهیدراسیون) و پیک‌های اگزومتریک به ترتیب در دماهای ۶۵/۹۷ °C و ۱۸۹/۹۷ °C اتفاق افتاده است. هم‌چنین پیک اندوترمیک مربوط به گویچه کیتوزان حاوی وانکومایسین در دمای ۸۲°C که مربوط به حذف آب می‌باشد و پیک پهن اگزوترمیک در دمای ۳۶۱/۲ °C مربوط به تجزیه همین نمونه می‌باشد و به دلیل هم‌پوشانی وانکومایسین و کیتوزان این پیک به‌صورت شکل عریض‌تر مشاهده شده است (نمودار شماره 3C).

در مورد ژلاتین براساس منحنی ارائه شده در تصویر 5D، سه نقطه اندومتریک در دماهای ۸۱/۵۵ °C، ۲۱۹/۸۷ °C و ۲۷۸/۸۳ °C و پیک اگزومتریک در دمای حدود ۳۳۰ مشاهده شد. پیک اندومتریک اولیه ممکن است مربوط به حالت ساختار هلیکس به کویل باشد که با دمای انتقال شیشه همپوشانی داشته است.

گویچه‌های CS/G/VCM دارای دو پیک اندومتریک در دماهای ۷۷/۵۶ °C و ۲۲۹/۳۴ °C می‌باشند. پیک اگزومتریک آن بعد از ۳۰۰ است که تقریبا ماده تخریب شده و می‌توان گفت وجود ژلاتین در گویچه CS/VCM باعث شیفت پیک‌ها شده است (نمودار شماره 3E). هیدروکسی آپاتیت یک پیک اندومتریک در ناحیه ۸۱ °C دارد (نمودار شماره 5F).

هم‌چنین در نمودار شماره 5G مشاهده می‌شود که گویچه‌های CS/G/HAVCM دو پیک اندومتریک در دماهای ۸۵/۳۵ °C و ۲۳۴ °C، و یک پیک اندومتریک در ۳۲۹ °C دارند که در این دما تخریب پلیمر نیز اتفاق افتاده است. هم‌چنین نمودارهای حاصل شده تایید می‌کنند که وجود هیدروکسی آپاتیت در گویچه CS/G/HA/VCM باعث شیفت پیک‌ها شده است.

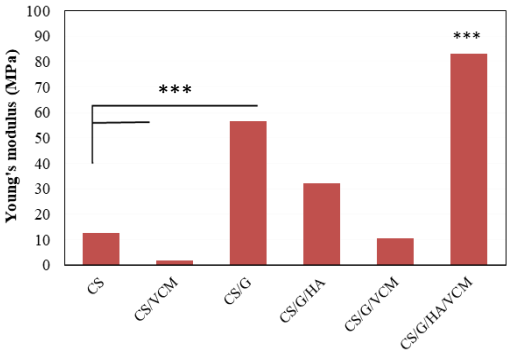


نمودار شماره ۳: تصاویر رفتارگرمایی گویچه‌ها با آنالیز DSC: CS(A، VCM(B، CS/VCM(C، G(D، CS/G/VCM(E، HA(F و CS/G/HA/VCM (G

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

اندازه‌گیری خواص مکانیکی گویچه‌های تولید شده

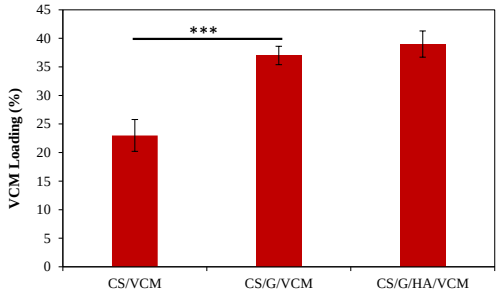
نتایج مربوط به بررسی خواص مکانیکی در گویچه‌های تولید شده در شرایط مختلف، در نمودار شماره ۴ ارائه شده است. افزودن ژلاتین در گویچه‌ها، استحکام مکانیکی را نسبت به گویچه‌های کیتوزان فاقد ژلاتین، به شکل معنی‌داری افزایش می‌دهد (P<۰/۰۵). در مقابل افزودن وانکومایسین حالت عکس را نشان داده و خواص مکانیکی در نمونه‌های CS/VCM و CS/G/VCM به‌صورت معنی‌داری نسبت به نمونه‌های فاقد VCM کاهش داشته است (P<۰/۰۵). اضافه شدن هیدروکسی آپاتیت به گویچه‌های کیتوزان حاوی ژلاتین استحکام مکانیکی را نسبت به گویچه‌های کیتوزان حاوی ژلاتین به تنهایی کم کرده است، اما این کاهش تفاوت معنی‌داری را ایجاد نکرده است (P=۰/۰۹). هم‌چنین براساس نتایج به‌دست آمده تفاوت معنی‌داری در میزان مدول یانگ در گروه گویچه‌های CS/G/HA/VCM با بقیه گویچه‌ها مشاهده شد (P<۰/۰۵).



نمودار شماره ۴: مقایسه خواص مکانیکی (مدول یانگ) در گویچه‌های CS، CS/G، CS/G/HA، CS/VCM، CS/G/VCM، و CS/G/HA/VCM

تعیین میزان بارگیری دارویی در گویچه‌ها

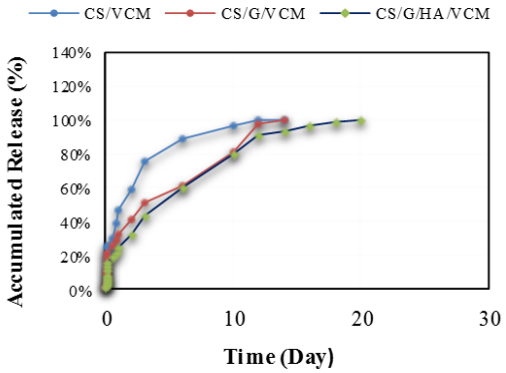
با توجه به نمودار شماره ۵ مشخص می‌شود که افزودن ژلاتین به شکل معنی‌داری درصد بارگیری دارو را نسبت به گویچه‌های CS افزایش داد (P<۰/۰۰۱) اما تفاوت معنی‌داری در بارگذاری دارو بین گویچه‌های CS با CS/G/HA/VCM مشاهده نشد.



نمودار شماره ۵: درصد بارگیری وانکومایسین در گویچه‌ها پس از لیوفیلیزه شدن

بررسی میزان آزادسازی دارو در گویچه‌ها

میزان آزادسازی دارو در بین گویچه‌های حاوی دارو بعد از لیوفیلیزه شدن طی ۲۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج آن در نمودار شماره ۶ ارائه شده است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که میزان آزادسازی تجمعی داروی وانکوماسین در روز دوم در گویچه‌های CS/VCM، CS/G/VCM و CS/G/HA/VCM به ترتیب درصد ۳۷، درصد ۳۸ و درصد ۲۰ است که تفاوت معنی‌داری با رهش در دو گروه دیگر را نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۵). هم‌چنین در روز چهاردهم مطالعه میزان رهاسازی دارو در ساختارهای CS/VCM، CS/G/VCM و CS/G/HA/VCM به‌ترتیب ۸۵، ۸۹ و ۵۸ درصد به‌دست آمد. میزان رهایش دارو در ساختار CS/G/HA/VCM تفاوت معنی‌داری با ساختارهای CS/VCM، CS/G/ در بازه‌های زمانی ۵ و ۱۴ روز نشان داد (P<۰/۰۰۱).



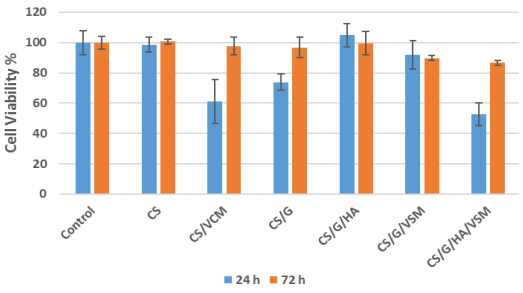
نمودار شماره ۶: بررسی میزان آزادسازی وانکومایسین در ساختارهای CS/VCM ، CS/G/VCM ، و CS/G/HA/VCM

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

در بررسی درصد تجمعی آزادسازی دارو در بین گویچه‌های مختلف، گویچه‌های گروه کیتوزان حاوی وانکومایسین پس از ۱۰ روز ۱۰۰ درصد دارو را آزاد کردند ولی این درصد در گروه گویچه‌های CS/G/VCM در روز ۱۲ مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با گروه قبل نداشتند (P>۰/۰۱). این در حالی بود که گروه CS/G/HA/VCM در روز بیستم رهش ۱۰۰ درصدی دارو داشتند.

بررسی میزان سمیت گویچه‌ها

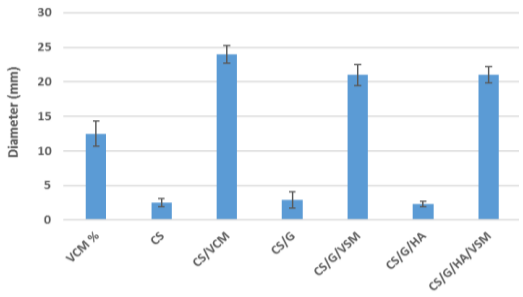
بررسی میزان سمیت در ساختارهای تولید شده در برابر سلول‌های NIH 3T3 در بازه زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت (نمودار شماره ۷). نتایج نشان داد در هیچ‌کدام از بازه‌های زمانی مطالعه، سمیتی مشاهده نشده است و تفاوت معنی‌داری بین نتایج به دست آمده بین گویچه‌های تولید شده با نمونه کنترل وجود ندارد.



نمودار شماره ۷: بررسی میزان زنده مانی سلول‌های NIH3T3 پس از مواجهه با گویچه‌های CS، CS/G، CS/G/HA، CS/VCM، CS/G/VCM و CS/G/HA/VCM

بررسی میزان فعالیت ضدباکتریائی گویچه‌ها

میزان فعالیت بیولوژیک ونکومایسین آزاد شده از گویچه‌ها پس از لیوفیلیزه شدن روی استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC6538p) با استفاده از روش انتشار از دیسک در محیط TSA مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن در نمودار شماره ۸ نشان داده شده است. بعد از انجام آزمون One Way ANOVA در بین گروه‌ها مشخص شد که گویچه‌های کیتوزان حاوی دارو (CS/VCM، CS/G/VCM، CS/G/HA/VCM) به شکل معنی‌داری نسبت به کنترل مثبت (وانکومایسین ۵ درصد) افزایش در مساحت هاله عدم رشد در باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس داشتند (P<۰/۰۰۱). این تفاوت در بین گروه‌های ذکر شده تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵).



تصویر شماره ۱۰: نمودار مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد در برابر استافیلوکوکوس اورئوس پس از ۲۴ ساعت

بحث

وانکومایسین به عنوان آنتی‌بیوتیکی موثر در درمان عفونت‌های مزمن استخوانی معرفی می‌شود(۱۹). روش انتقال موضعی آنتی‌بیوتیک می‌تواند ضمن کاهش عوارض سیستمیک، شرایط آزادسازی طولانی مدت غلظت بالای موضعی دارو را فراهم کند(۲۰). گویچه‌ها سیستم‌های دارورسانی با مزایایی از جمله تحویل آهسته رهش یا کنترل شده دارو هستند که باعث کاهش عوارض جانبی دارو و کاهش دفعات دوز مصرفی می‌شوند(۲۱). تهیه و فرمولاسیون داروهای مبتنی بر ساختارگویچه از طریق ایجاد اتصال متقاطع در پلیمرها و پلیمریزاسیون مونومرها و سپس اتصال متقاطع با مونومرهای چند عاملی می‌باشد(۲۲). برای ساخت گویچه‌ها از پلیمرهای زیستی که به‌طور طبیعی در زنجیره جانبی شان دارای گروه‌های عاملی هیدروکسیل، آمین، آمید، اتر، کربوکسیلات و سولفونات می‌باشند، می‌توان استفاده کرد(۲۴،۲۳). در مطالعات مختلفی برای حمل وانکومایسین از گویچه‌های متفاوتی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

از جمله poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), polymethylmethacrylate و کلسیم سولفات استفاده شده است که نتایج رضایت بخشی را به دنبال داشتند(۲۵).

محققان نشان داده‌اند درگویچه‌های کیتوزانی با ساختار داخلی یکنواخت، محلول سدیم تری پلی‌فسفات (TPP) که یک پلیمرآنیونی است، با کیتوزان با خاصیت پلی‌کاتیونیکی واکنش داده و فیلم پیچیده پلی‌الکترولیتی را بر روی سطح محلول تشکیل می‌دهد. این فیلم پیچیده پلی‌الکترولیتی قادر است که مقادیر بیش‌تری از دارو را بعد از کراس لینک شدن در ساختار شبکه‌ای خود حمل کرده و دارو را برای مدت زمان طولانی‌تری رها کند(۲۶).

در مطالعه‌ای Cui و همکاران نشان دادندکه افزودن کلاژن به کیتوزان با نسبت‌های۱:۲، ۱:۱ و ۲:۱ ، سبب بهبود خصوصیات مکانیکی، مقاومت در برابر تخریب شبکه پلیمری و نیز افزایش تکثیر سلولی می‌شود. هم‌چنین در این مطالعه، با انجام Fractal analysis مشخص شد نسبت ۲:۱ از کلاژن:کیتوزان به عنوان ساختاری متعادل از لحاظ تخلخل و یکپارچگی بافت است(۲۷).

Sindi و همکاران در تحقیقات خود نشان دادند که ژلاتین می‌تواند به صورت معنی‌داری باعث بهبود خواص بیولوژیکی ساختارها شود(۲۸۲۹). هم‌چنین نشان داده شده است که طراحی و ساخت داربست‌ها با خاصیت آب‌دوستی بالا می‌تواند به صورت موثری در بهبود خواص بیولوژی داربست‌ها در کاربردهای مهندسی بافت مفید واقع شود(۳۰۳۱). تایید شده است که افزودن ژلاتین به گویچه کیتوزان سبب تورم‌پذیری بیش‌تر گویچه می‌شود که امری موثر در جذب دارو می‌باشد(۳۲۳۳).

از این‌رو، هدف مطالعه پیش‌رو ساخت و بررسی خصوصیات گویچه‌های کیتوزان حاوی وانکومایسین جهت کاربرد در درمان استئومیلیت می‌باشد که توسط ژلاتین و هیدروکسی آپاتیت خواص فیزیکو شیمیائی آن بهبود داده شده است. در مطالعه حاضر ابتدا ژلاتین با نسبت‌های مختلفی به گویچه‌کیتوزان اضافه شد و مشاهده گردید که در نسبت ژلاتین به کیتوزان ۱:۱ و ۱:۲ نمونه‌ها بعد از لیوفیلیزه سریع شکسته می‌شوند ولی در نسبت ۱:۴ از پایداری مناسبی برخوردار هستند و این ساختار مورد بررسی‌های بیش‌تر ساختاری، مکانیکی و بیولوژیکی قرار گرفت.

در مطالعات اندازه‌گیری بازده تولید گویچه‌ها، نتایج نشان داد که وزن گویچه‌ها پس از لیوفیلیزه شدن نسبت به مواد خام مصرفی کاهش پیدا کرده است. گویچه‌های کیتوزان بیش‌ترین بازده و گویچه‌های کیتوزان حاوی وانکومایسین درصد کم‌ترین میزان بازده را داشتند. دلیل کاهش در بازده گویچه‌های کیتوزان حاوی وانکومایسین، کاهش در میزان خواص مکانیکی و شکنندگی این گویچه‌ها پس از لیوفیلیزه شدن است که باعث کاهش تعداد گویچه‌ها پس از فریز درای و در نتیجه کاهش در بازده می‌شود. مابقی گویچه‌ها تفاوت معنی‌داری در میزان بازده مربوط به مواد خام با یکدیگر نداشتند.

هم‌چنین نتایج حاصل از ارزیابی ابعادی گویچه‌ها، نشان‌دهنده کاهش در مساحت، محیط و کرویت گویچه‌ها بعد از لیوفیلیزه کردن می‌باشد. تصاویر SEM نشان‌دهنده مناسب بودن مورفولوژی گویچه‌ها از نظر شکل ظاهری و تخلخل قابل قبول در گویچه‌های CS/G/HA و CS/G بود. در این بین مشخص شد که با اضافه شدن وانکومایسین به گویچه‌ها، از نظر ظاهری و استحکام شکننده می‌شوند که این تغییرات درگویچه CS/G/HA/VCM کم‌تر مشاهده شد. در راستای مطالعات انجام شده توسط محققین، دلیل آن نیز می‌تواند کمپلکس یکنواخت‌تر و محکم‌تر این ساختار باشدکه دارو را بهتر در خود نگه دارد(۳۶-۳۴). بر اساس آنالیز FTIR انجام شده هیچ‌گونه گروه عاملی یا واکنش ناخواسته در ساختارهای تولید شده مشاهده نمی‌شود. هم‌چنین نتایج DSC تاییدکننده ساختار بلورین در گویچه‌های تولیدی می‌باشند که به‌دلیل استفاده از روش ایجاد اتصال متقاطع در تهیه گویچه‌ها می‌باشد که منجر به تشکیل شبکه پلیمری با خواص مطلوب جهت کاربردهای مهندسی بافت استخوان می‌شود(۳۷).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

افزودن ژلاتین به شکل معنی‌داری درصد بارگیری دارو را نسبت به گویچه‌های CS افزایش داد و تفاوت در میزان بارگیری را می‌توان به ساختار بیدها و میزان تخلل آن نسبت داد(۳۸).

در راستای نتایج به دست آمده توسط Toshihiro و همکاران، افزودن ژلاتین به ساختار گویچه‌ها، باعث افزایش زمان آزادسازی دارو تا ۱۶ روز شده است و گویچه CS/G/HA/VCM رهش آهسته‌تری از وانکومایسین را نشان می‌دهد(۳۹). در مطالعه انجام گرفته توسط Bishop و همکاران، مشخص شد افزودن ونکومایسین موجب کاهش خواص مکانیکی ساختارها می‌شود(۴۰).

هیدروکسی آپاتیت (HAp) به عنوان یک جایگزین زیست سازگار و رسانای استخوانی در زمینه جراحی ارتوپدی مورد استفاده قرار گرفته است. با این حال، این سرامیک به دلیل سختی و شکنندگی به اشکال خاصی که برای جایگزینی استخوان مورد نیاز است شکل می‌گیرد. پودرهای HAp که برای درمان نقایص استخوانی استفاده می‌شوند، این مشکل را دارند که به راحتی از محل‌های کاشته شده مهاجرت می‌کنند. بنابراین، کامپوزیت‌های جدید HAp و پلیمرهای آلی و طبیعی که می‌توانند خواص مکانیکی ضعیف HAp را جبران کنند، مورد توجه قرار گرفته‌اند(۴۲،۴۱). هر چند که مشاهده شده است درصد این ترکیب در کنار پلیمرهای طبیعی می‌تواند در خصوصیات فیزیکوشیمیائی محصول نهائی تاثیر بگذارد. Qiaoling و همکاران ثابت کردند که هر چه محتوای هیدروکسی آپاتیت در کامپوزیت بیش‌تر باشد، کامپوزیت شکننده‌تر است(۴۳).

در مطالعه حاضر، نسبت کیتوزان به هیدروکسی آپاتیت ۷۰ به ۳۰ به عنوان نسبت بهینه انتخاب شد. نتایج مربوط به تست مکانیکی در مطالعه پیش‌رو نیز، نشان داد که اضافه شدن هیدروکسی آپاتیت به گویچه‌های کیتوزان حاوی ژلاتین استحکام مکانیکی را نسبت به گویچه‌های کیتوزان حاوی ژلاتین به تنهایی کم کرده است، اما این کاهش تفاوت معنی‌داری را ایجاد نکرده است.

در مقادیر بالاتر و پائین‌تر هیدروکسی آپاتیت گویچه‌ها، از نظر ظاهری و استحکام مناسب نبودند. هم‌چنین افزودن وانکومایسین خواص مکانیکی در نمونه‌های CS/VCM و CS/G/VCM را به‌صورت معناداری نسبت به ساختارهای فاقد VCM کاهش داده است ($P<0/05$). هرچند که این روند در CS/G/HA/VCM مشاهد نشد و افزودن ونکومایسین به این ساختار سبب افزایش مقاوت مکانیکی آن شد که علت آن نیز شاید به دلیل واکنش‌های وانکومایسین با اجزا موجود در ساختار گویچه باشد که سبب افزایش یا کاهش مقاومت آن می‌شود. نشان داده شده است که برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند جهت‌گیری و اتصال عرضی زنجیره‌های پلیمری در ساختار بید را تحت تاثیر قرار دهند که منجر به تغییر در ویسکوزیته پس از اختلاط، زمان پلیمریزاسیون، غلظت آنتی‌بیوتیک‌های ترکیب شده، و استحکام و سفتی مکانیکی پلیمر مرشوند(۴۴). براساس نتایج به‌دست آمده از تست سمیت ساختارها با سلول‌های NIH 3T3، مشخص شد که گویچه‌ها پس از لیوفیلیزه شدن خاصیت سمی نداشته‌اند که دلیل آن می‌تواند غیر سمی بودن و زیست تجزیه پذیر بودن اجزا مورد استفاده در فرمولاسیون باشد. کیتوزان به عنوان پلیمری با خاصیت ضدمیکروبی وسیع شناخته شده است(۴۵). وانکومایسین هنوز آنتی بیوتیک انتخابی در درمان بیماری‌های استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی فعالیت بیولوژیک ونکومایسین آزاد شده از گویچه‌ها پس از لیوفیلیزه شدن بر روی میکروارگانیسم‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC6538) و گرم منفی اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) نشان داد که گویچه‌های کیتوزان حاوی دارو (CS/VCM، CS/G/VCM و CS/G/HA/VCM) به‌شکل معناداری نسبت به کنترل مثبت (ونکومایسین ۵ درصد) افزایش در مساحت هاله عدم رشد در باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس داشتند و این تفاوت در بین سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

هدف از این مطالعه، تهیه و بررسی خصوصیات گویچه‌های کیتوزان حاوی وانکومایسین موثر در درمان استئومیلیت می‌باشد که توسط ژلاتین و هیدروکسی آپاتیت خواص فیزیکو شیمیائی آن بهبود داده شده است. گویچه‌های تولید شده از نظر خواص ساختاری، مکانیکی و بیولوژیکی گویچه‌های مورد ارزیابی قرار گرفتند. براساس نتایج به‌دست آمده گویچه‌های CS/G/HA/VCM به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای کاهش و درمان عفونت‌های استئومیلت معرفی می‌گردند.

تضاد منافع: هیچ تضاد منافعی وجود ندارد.

سپاسگزاری

از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد برای تامین هزینه این مطالعه سپاسگزاری می‌شود. مقاله حاضر قسمتی از رساله دکترای حرفه‌ای خانم فائزه ابهری در رشته داروسازی می‌باشد (شماره گرنت971923). هم‌چنین تمام آزمایشات تحت تایید کمیته اخلاق (کد اخلاق: IR.MUMS.PHARMACY.REC.1398.31) معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد.

References

1. del Pozo EG, Collazos J, Cartón JA, Camporro D, Asensi V.Bacterial osteomyelitis: microbiological, clinical, therapeutic, and evolutive characteristics of 344 episodes. Rev Esp Quimioter 2018; 31(3): 217-225.
2. Kalalinia F, Taherzadeh Z, Jirofti N, Amiri N, Foroghinia N, Beheshti M, et al. Evaluation of wound healing efficiency of vancomycin-loaded electrospun chitosan/poly ethylene oxide nanofibers in full thickness wound model of rat. Int J Biol Macromol 2021; 177: 100-110.
3. Movaffagh J, Bazzaz SF, Taherzadeh Z, Hashemi M, Moghaddam AS, Tabatabaee SA, et al. Evaluation of wound-healing efficiency of a functional Chitosan/Aloe vera hydrogel on the improvement of re-epithelialization in full thickness wound model of rat. J Tissue Viability 2022; 31(4): 649-656.
4. Jirofti N, Golandi M, Movaffagh J, Ahmadi FS, Kalalinia F. Improvement of the Wound-Healing Process by Curcumin-Loaded Chitosan/ Collagen Blend Electrospun Nanofibers: In Vitro and In Vivo Studies. ACS Biomater Sci Eng 2021; 7(8): 3886-3897.
5. Liu H, Wang C, Li C, Qin Y, Wang Z, Yang F, et al. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. RSC Adv 2018; 8(14): 7533-7549.
6. Santos LF, Correia IJ, Silva AS, Mano JF. Biomaterials for drug delivery patches. Eur J Pharm Sci 2018; 118: 49-66.
7. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. Adv Drug Deliv Rev 2010; 62: 83-99.
8. Singh N, Aery S, Juneja S, Kumari L, Lone MS, Dar AA, et al. Chitosan Hydrogels with Embedded Thermo-and pH-Responsive Microgels as a Potential Carrier for Controlled Release of Drugs. ACS Appl Bio Mater 2022; 5(7): 3487-3499.
9. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. Adv Drug Deliv Rev 2007; 59(4-5): 207-233.
10. Thitiset T, Damrongsakkul S ,Yodmuang S, Leeanansaksiri W, Apinun J, Honsawek S. A

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

novel gelatin/chitooligosaccharide/demineralized bone matrix composite scaffold and periosteum-derived mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. Biomater Res 2021; 25(1): 19.

11. Kazemzadeh G, Jirofti N, Kazemi Mehrjerdi H, Rajabioun M, Alamdaran SA, Mohebbi-Kalhori D, et al. A review on developments of in-vitro and in-vivo evaluation of hybrid PCL-based natural polymers nanofibers scaffolds for vascular tissue engineering. J Ind Text 2022; 52: 15280837221128314.
12. Raucci MG, D'Amora U, Ronca A, Demitri C, Ambrosio L. Bioactivation routes of gelatin-based scaffolds to enhance at nanoscale level bone tissue regeneration. Front Bioeng Biotechnol 2019; 7: 27.
13. Nakhaei M, Jirofti N, Ebrahimzadeh MH, Moradi A.Different methods of hydroxyapatite-based coatings on external fixator pin with high adhesion approach, Plasma Process Polym 2023; p. e2200219.
14. Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. J Artif Organs 2005; 8(3): 131-136.
15. Patil P, Chavanke D, Wagh M. A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelispheres. Int J Pharm Pharm Sci 2012; 4: 27-32.
16. Sacco P, Paoletti S, Cok M, Asaro F, Abrami M, Grassi M, et al. Insight into the ionotropic gelation of chitosan using tripolyphosphate and pyrophosphate as cross-linkers. Int J Biol Macromol 2016; 92: 476-483.
17. Rahnama S, Movaffagh J, Shahroodi A, Jirofti N, Fazly Bazzaz BS, Beyraghdari M, et al. Development and characterization of the electrospun melittin-loaded chitosan nanofibers for treatment of acne vulgaris in animal model. J Ind Text 2022; 52: 15280837221112410.
18. Bose S, Vahabzadeh S, Bandyopadhyay A. Bone tissue engineering using 3D printing. Materials Today 2013;16(12):496-504.
19. Lade H, Kim J-S. Bacterial targets of antibiotics in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antibiotics 2021; 10(4): 398.
20. Nandi SK, Bandyopadhyay S, Das P, Samanta I, Mukherjee P, Roy S, et al. Understanding osteomyelitis and its treatment through local drug delivery system. Biotechnol Adv 2016; 34: 1305-1317.
21. Şanli O,Ay N, Işıklan N. Release characteristics of diclofenac sodium from poly (vinyl alcohol)/ sodium alginate and poly (vinyl alcohol)-grafted-poly (acrylamide)/sodium alginate blend beads. Eur J Pharm Biopharm 2007; 65(2): 204-214.
22. Kim JK, Kim HJ, Chung J-Y, Lee J-H, Young S-B, Kim Y-H. Natural and synthetic biomaterials for controlled drug delivery. Arch Pharm Res 2014; 37(1): 60-68.
23. Hennink WE, van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. Adv Drug Deliv Rev 2002; 54(1): 13-36.
24. Rani M, Agarwal A, Negi YS. Chitosan based hydrogel polymeric beads–As drug delivery system. BioResources 2010; 5(4): 2765-2807.
25. Ueng SW, Lin S-S, Wang I, Yang C-Y, Cheng R-C, Liu S-J, et al. Efficacy of vancomycin-releasing biodegradable poly (lactide-co-glycolide) antibiotics beads for treatment of experimental bone infection due to Staphylococcus aureus. J Orthop Surg Res 2016; 11(1): 52.
26. Peers S,Montembault A, Ladavière C. Chitosan hydrogels for sustained drug delivery. J Control Release 2020; 326: 150-163.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

27. Cui F, Li G, Huang J, Zhang J, Lu M, Lu W, et al. Development of chitosan-collagen hydrogel incorporated with lysostaphin (CCHL) burn dressing with anti-methicillin-resistant Staphylococcus aureus and promotion wound healing properties. Drug Deliv 2011; 18(3): 173-80.
28. Ndlovu SP, Ngece K, Alven S, Aderibigbe BA. Gelatin-based hybrid scaffolds: promising wound dressings. Polymers 2021; 13(17): 2959.
29. Pezeshki-Modaress M, Rajabi-Zeleti S, Zandi M, Mirzadeh H, Sodeifi N, Nekookar A, et al. Cell-loaded gelatin/chitosan scaffolds fabricated by salt-leaching/lyophilization for skin tissue engineering: In vitro and in vivo study. J Biomed Mater Res A 2014; 102(11): 3908-3917.
30. Jirofti N, Mohebbi-Kalhori D, Masoumi R. Enhancing biocompatibility of PCL/PU nano-structures to control the water wettability by NaOH hydrolysis treatment for tissue engineering applications. J Ind Text 2022; 51(2S): 3278S-3296S.
31. Kazemzadeh G, Jirofti N, Mohebbi-Kalhori D, Sarhaddi F, Taheri R. Pathological examination of blended and co-electrospinning hybrid polycaprolactone/polyurethane nanofibers for soft tissue engineering applications. J Ind Text 2022; 51(4S): 6816S-6837S.
32. Shafabakhsh R, Yousefi B, Asemi Z, Nikfar B, Mansournia MA, Hallajzadeh J. Chitosan: A compound for drug delivery system in gastric cancer-a review. Carbohydr Polym 2020; 242: 116403.
33. Ohmes J, Saure LM, Schütt F, Trenkel M, Seekamp A, Scherließ R, et al. Injectable Thermosensitive Chitosan-Collagen Hydrogel as A Delivery System for Marine Polysaccharide Fucoidan. Mar Drugs 2022; 20(6): 402.
34. Hsieh P-H, Tai C-L, Lee P-C, Chang Y-H. Liquid gentamicin and vancomycin in bone cement: a potentially more cost-effective regimen. J Arthroplasty 2009; 24(1): 125-130.
35. Lian X, Liu H, Wang X, Xu S, Cui F, Bai X. Antibacterial and biocompatible properties of vancomycin-loaded nano-hydroxyapatite/ collagen/poly (lactic acid) bone substitute. Prog Nat Sci 2013; 23(6): 549-556.
36. Liu J, Wang W, Wang X, Yu D, Wang Z, Wang W. PL/Vancomycin/Nano-hydroxyapatite Sustained-release Material to Treat Infectious Bone Defect. Open Life Sci 2020; 15(1): 92-107.
37. Tang G, Tan Z, Zeng W, Wang X, Shi C, Liu Y, et al. Recent advances of chitosan-based injectable hydrogels for bone and dental tissue regeneration. Front Bioeng Biotechnol 2020; 8: 587658.
38. Dion A, Berno B, Hall G, Filiaggi MJ. The effect of processing on the structural characteristics of vancomycin-loaded amorphous calcium phosphate matrices. Biomaterials 2005; 26(21): 4486-4494.
39. Kushibiki T, Mayumi Y, Nakayama E, Azuma R, Ojima K, Horiguchi A, et al. Photocrosslinked gelatin hydrogel improves wound healing and skin flap survival by the sustained release of basic fibroblast growth factor. Sci Rep 2021; 11: 23094.
40. Bishop AR, Kim S, Squire MW, Rose WE, Ploeg H-L. Vancomycin elution, activity and impact on mechanical properties when added to orthopedic bone cement. J Mech Behav Biomed Mater 2018; 87: 80-86.
41. Adamski R, Siuta D. Mechanical, structural, and biological properties of chitosan/ hydroxyapatite/silica composites for bone tissue engineering. Molecules 2021; 26(7): 1976.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

42. Yamaguchi I, Tokuchi K, Fukuzaki H, Koyama Y, Takakuda K, Monma H, et al. Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites. J Biomed Mater Res 2001; 55(1): 20-27.
43. Hu Q, Li B, Wang M, Shen J. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/ hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. Biomaterials 2004; 25(5): 779-785.
44. Van Vugt TA, Arts JJ, Geurts JA. Antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads and spacers in treatment of orthopedic infections and the role of biofilm formation. Front Microbiol 2019; 10: 1626.
45. Naeimi M, Tajedin R, Farahmandfar F, Naeimi M, Monajjemi M. Preparation and characterization of vancomycin-loaded chitosan/ PVA/PEG hydrogels for wound dressing. Mater Res Express 2020; 7(9): 095401.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]