

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

Nafiseh Jirofti^{1,2},
Azadeh Shahroodi³,
Jebreil Movaffagh^{4,5},
Bibi Sedigheh Fazly Bazzaz^{2,5},
Rezvan Yazdian-Robati⁶,
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. Adding VCM 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).

Conclusion: 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)

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

نفسه جبرفتی^۱
آزاده شاهرودی^۳
جبرائیل موفق^۴
بی بی صدیقه فضلی بزاز^۵
رضوان یزدیان رباطی^۶
مریم هاشمی^۸

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 $(4/5 \text{ mm}^2)$ و کرویت $(180 \mu\text{m})$ کم‌تری نسبت به بقیه گویچه‌ها داشت. تصاویر SEM تایید کننده 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 ۱۴ مطالعه، میزان رهش دارو در گویچه CS/G/HA/VCM ۵۸ درصد بود. نتایج تست مکانیکی نشان داد که افزودن وانکومایسین به گویچه CS/VCM $(1/55 \text{ MPa})$ و CS/G/VCM $(1/46 \text{ MPa})$ سبب کاهش استحکام مکانیکی آن‌ها و افزودن این دارو به گویچه CS/G/HA/VCM سبب افزایش استحکام مکانیکی $(83/21 \text{ MPa})$ 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 استفیلوکوکوس اورئوس نشان داد که گویچه‌های کیتوزان حاوی دارو (CS/G/HA/VCM, CS/G/VCM, CS/VCM) به شکل معناداری نسبت به کنترل مثبت (وانکومایسین ۵ درصد) افزایش در مساحت هاله عدم رشد داشتند ($P < 0/001$).

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

واژه‌های 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

E-mail: HashemiM@mums.ac.ir

مؤلف مسئول: مریم هاشمی - مشهد: دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات نانو فناوری

۱. دکتری 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 میکروپ 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 هموگلوبینو پاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۷. استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۸. مرکز تحقیقات نانو فناوری، 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

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 این که به تنهایی غلظت زیادی از دارو را در موضع ایجاد نمی‌کند و تجویز مکرر آن‌ها به فرم سیستمیک موجب سمیت همراه با مشکلات کلیوی و کبدی 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 به‌عنوان 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 (۷، ۸).

هدف از مطالعه حاضر تهیه و بررسی خصوصیات گویچه‌های کیتوزان حاوی وانکومايسين، و موثر در درمان استئومیلیت می‌باشد که توسط ژلاتین و هیدروکسی آپاتیت خواص فیزیکی شیمیایی 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 به‌عنوان 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 (۱۰، ۱۱). 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 منحصربه‌فرد 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 HA و G، CS به‌عنوان حامل‌های دارویی، 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 سیگماآلدریج تهیه شدند. اسیداستیک گلاسیال (۹۹/۷ درصد)، تری پلی فسفات (TPP) از کمپانی مرک و محیط کشت تربیتیک سویا آگار (TSA-M290-500G) از کمپانی HIMEDIA تهیه شدند. تهیه آنتی‌بیوتیک وانکومايسين (VCM) و محلول فسفات نرمال سالین به ترتیب از شرکت داروسازی زکریا و شرکت 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/ وانکومايسين

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

(gelation ionotropic) با استفاده از تری اتیل 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 به مدت یک ساعت بر روی هم زن با سرعت 1000rpm قرار گرفت. محلول پلیمری حاوی دارو به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد کنار گذاشته شد تا از خروج حباب‌های هوا اطمینان حاصل شود. بدین ترتیب 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 اسید ۱ درصد 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 به صورت خیلی آهسته به محلول TPP 10% w/v درصد ۶/۵-۶ pH با اضافه و بدین ترتیب غلظت ۴ درصد ژلاتین در گویچه به دست 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 محلول پلیمری (حاوی دارو و پودر سرامیکی) در محلول تری پلی فسفات تهیه شدند. در این راستا ابتدا محلول ۲ w/v CS با استفاده از حلال اسید استیک ۱ درصد تهیه شد. در ادامه پودر HA به مدت ۲ ساعت در آب دیونیزه پراکنده و سپس به آرامی به محلول CS اضافه شد. محلول ۵ w/v 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 ۱ درصد پراکنده شد. در ادامه محلول ژلاتین به دست آمده به محلول CS و VCM اضافه شد و به مدت یک ساعت روی هم زن با سرعت ۱۰۰ rpm قرار داده شد تا محلول یکنواختی به دست آید. در نهایت گویچه‌ای کیتوزان/ژلاتین/هیدروکسی آپاتیت/وانکومایسین (CS/G/HA/VCM کراس لینک شده، با آب مقطر اولترایپور 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:

$$\text{بازده درصد} = \left(\frac{\text{وزن گویچه‌ها}}{\text{وزن کل مواد اولیه خام}} \right) \times 100$$

بررسی ابعادی گویچه‌ها

میزان کرویت، مساحت و قطر به عنوان مهم‌ترین خواص ظاهری گویچه‌های تولید شده، از طریق تصاویر گرفته شده به کمک دوربین دیجیتال (OLYMPUS 7.1 M.p) و پردازش 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 قرار گرفت. در

این راستا ابتدا تمام سطح گویچه‌ها تحت پوشش دهی با طلا قرار گرفت و تصاویر به دست آمده به کمک نرم افزار 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 $450\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ 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 $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ در دامنه ۲۵ تا $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ درجه سانتی‌گراد، تحت اتمسفر نیتروژن، انجام شد.

اندازه‌گیری 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:

$$100 \times \left(\frac{\text{وزن گویچه‌ها در ابتدا}}{\text{وزن گویچه‌ها بعد از اتمام چرخش مدنظر}} \right) = \text{درصد نسبت تردی}$$

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 ۱ درصد حل شد و جذب هر نمونه با روش طیف‌سنجی UV در طول موج 280 nm (طول موج VCM)، اندازه‌گیری شد. سپس مقدار داروی بارگذاری شده، با استفاده از معادله منحنی استاندارد داروی ونکوماپسین 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:

$$100 \times \left(\frac{\text{شده محاسبه داروی مقدار}}{\text{دارو تئوریک مقدار}} \right) = \text{درصد داروی بارگیری شده}$$

بررسی میزان آزادسازی دارو در گویچه‌ها

میزان آزاد سازی دارو از گویچه‌های تولید شده با استفاده از دستگاه آزمون سرعت حلالیت انجام گرفت. در ابتدا جهت تعیین منحنی استاندارد، جذب نمونه در طول موج 280 nm اندازه‌گیری شد. سپس غلظت‌های متفاوت دارو در فاصله $0\text{--}12\text{ mg/mL}$ در بافر PBS تهیه و جذب توسط دستگاه تعیین شد. در این راستا، گویچه‌ها در دمای $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ در سبد دستگاه با سرعت چرخش 50 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 به صورت 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).

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 به مدت ۳ ساعت و اشعه UV به مدت ۲۰ دقیقه سترون شدند. سپس نمونه‌ها را داخل پلیت با ۹۶ چاهک (۵۰۰۰ سلول فیروبلاست 3T3 رت در هر چاهک) قرار داده و محیط کشت اضافه شد (محیط کشت هر سه روز تعویض گردید). پلیت به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد دی‌اکسید کربن قرار گرفت و بعد از گذشت ۲۴ ساعت نمونه‌ها از داخل انکوباتور برداشته و تکثیر و چسبندگی سلول‌ها در روزهای ۱ و ۳، توسط آزمون آلاماربلو بررسی شد (۴). در نهایت با استفاده از فرمول زیر درصد کشندگی محاسبه شد که با کم کردن از صد، درصد زنده ماندن سلول‌ها 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 باکتریایی گویچه‌ها

میزان فعالیت بیولوژیک و نکومایسین آزاد شده از گویچه‌ها پس از لیوفلیزه 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 ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۰/۶۲ mg/mL تهیه گردید. وانکومایسین

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 ۱۰^۶ CFU/mL اضافه شد. محیط کشت به عنوان کنترل منفی و محیط کشت حاوی میکروب به عنوان کنترل مثبت هر یک در سه چاهک ریخته شد.

آنالیز داده‌ها و محاسبات آماری

نتایج به صورت Mean±SD (میانگین±انحراف معیار) 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<۰/۰۰۵ معنادار و معادل *، P<۰/۰۱ معادل **، P<۰/۰۰۱ معادل *** و P<۰/۰۰۰۱ معادل **** در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ارزیابی ساختاری گویچه‌های تولید شده

میزان بازده تولید گویچه‌ها

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

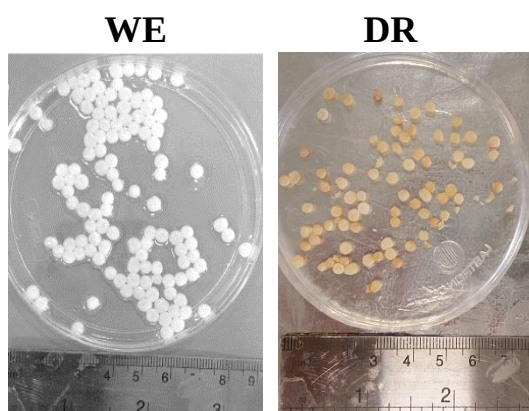
جدول شماره ۱: میزان بازده به دست آمده در گویچه‌های تولید شده

نوع گویچه‌ها	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	۶۵۲/۶۹۹	۱۲۰۰	۵۴±۰/۵

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

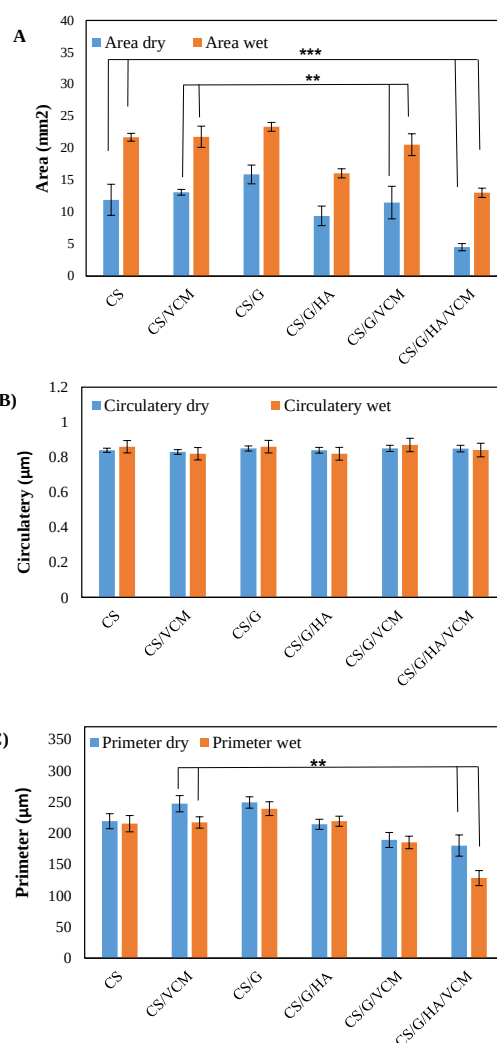
هم‌چنین تصاویر نشان دهنده تغییر سطح و تغییر در میزان تخلخل گویچه بعد از اضافه کردن هیدروکسی آپاتیت می‌باشد. بررسی‌ها نشان دهنده مناسب بودن مورفولوژی گویچه‌ها (شکل ظاهری و تخلخل قابل قبول) در گویچه‌های CS/G/HA و CS/G/HA می‌باشد (۱۸). در این بین مشخص شد که افزودن وانکومایسین به گویچه‌ها، باعث ایجاد ترک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

بررسی ابعادی گویچه‌های تولیدی

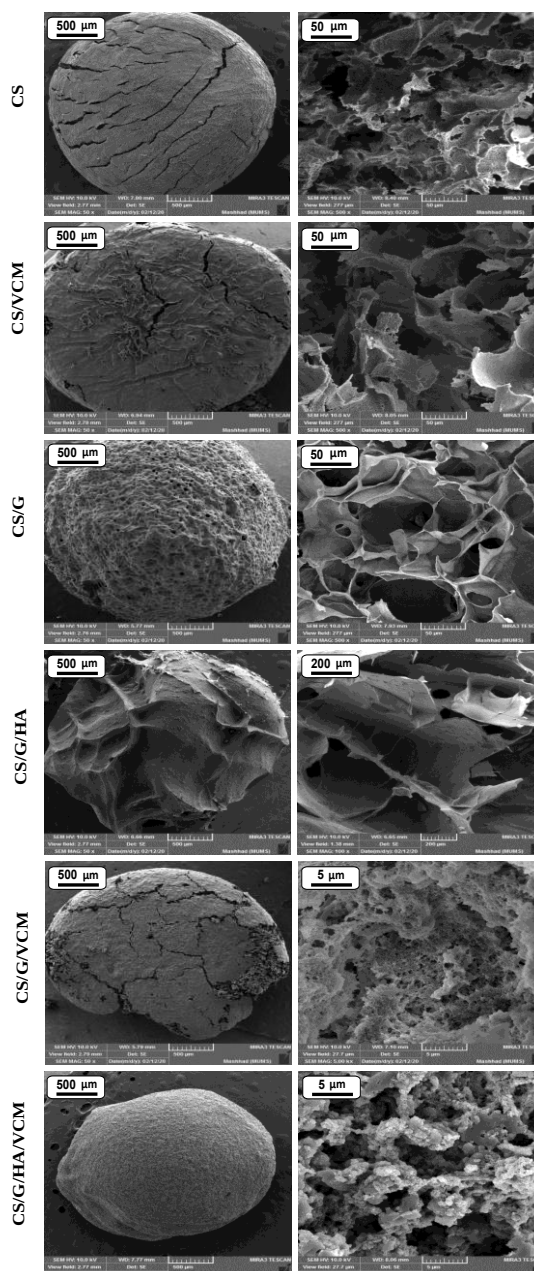
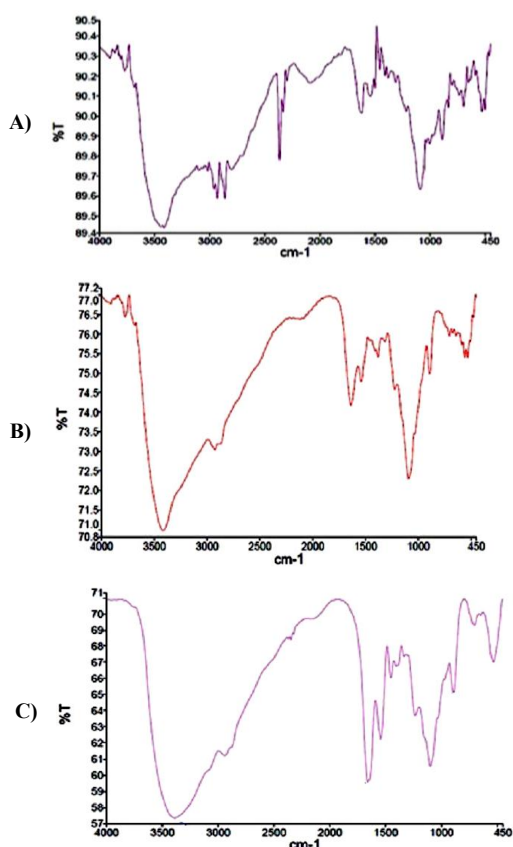
نتایج حاصل از اندازه‌گیری مساحت، محیط، میزان کرویت و قطر گویچه‌ها قبل و بعد از فرآیند لیوفیلیزه در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در نمودارها نشان داده شده است لیوفیلیزه کردن گویچه‌ها در بیش‌تر موارد سبب کاهش مساحت، محیط و کرویت گویچه‌ها شده است.



نمودار شماره ۱: مقایسه میانگین مساحت (Area)، محیط (Circularity) و کرویت (Primeter) بین گویچه‌ها قبل (Dry) و بعد (Wet) از لیوفیلیزه شدن (سطح معنی داری (**), $P < 0.05$)

بیش‌ترین تغییرات در محیط برای گویچه‌ای CS/VCM و CS/G/HA/VCM مشاهده شد ($P < 0.05$).

هم چنین ارتعاشات کششی نامتقارن مربوط به گروه‌های کربونیل (O-C-O) ناشی از پیوندهای گلیکوزیدی ساختار پلی ساکاریدی کیتوزان در نواحی 1148 cm^{-1} و 1110 cm^{-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} به ترتیب 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 cm^{-1} ۱۲۶۰ و cm^{-1} ۱۰۶۴ قابل مشاهده هستند که نسبت به ساختارهای خالص تغییر ناحیه داشته و تایید کننده حضور کیتوران و وانکومایسین در ساختار می‌باشند. هم چنین ارتعاشات کششی گروه هیدروکسیل O-H (COOH) در ناحیه cm^{-1} ۳۲۹۲ قابل مشاهده می‌باشد.



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

طیف سنجی مادون قرمز فوریه (FTIR)

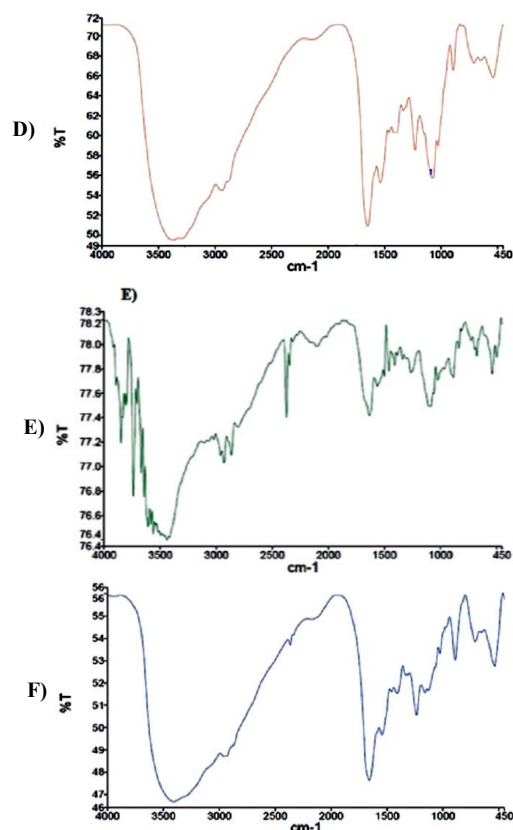
نتایج حاصل از طیف سنجی مادون قرمز در نمودار شماره ۲A-F ارائه شده است. براساس طیف ارائه شده در نمودار شماره ۲A ارتعاشات کششی N-H در محدوده‌های 1526 cm^{-1} و 1634 cm^{-1} به ترتیب نشان دهنده گروه‌های کربونیل (C=O) متصل به آمین نوع دوم (NH₂) و آمین نوع اول (C=O-NH) در ساختار کیتوزان می‌باشند.

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 تایید کننده 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. هم چنین 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 به جای ناحیه 1030 cm^{-1} در نقطه 1070 cm^{-1} قابل مشاهده می‌باشد. هم چنین 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 کیتوزان، وانکومایسین، ژلاتین و HA در محدوده نواحی $3000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ قابل مشاهده بود در ساختار ترکیبی حاصل نیز در همین ناحیه دیده می‌شود.

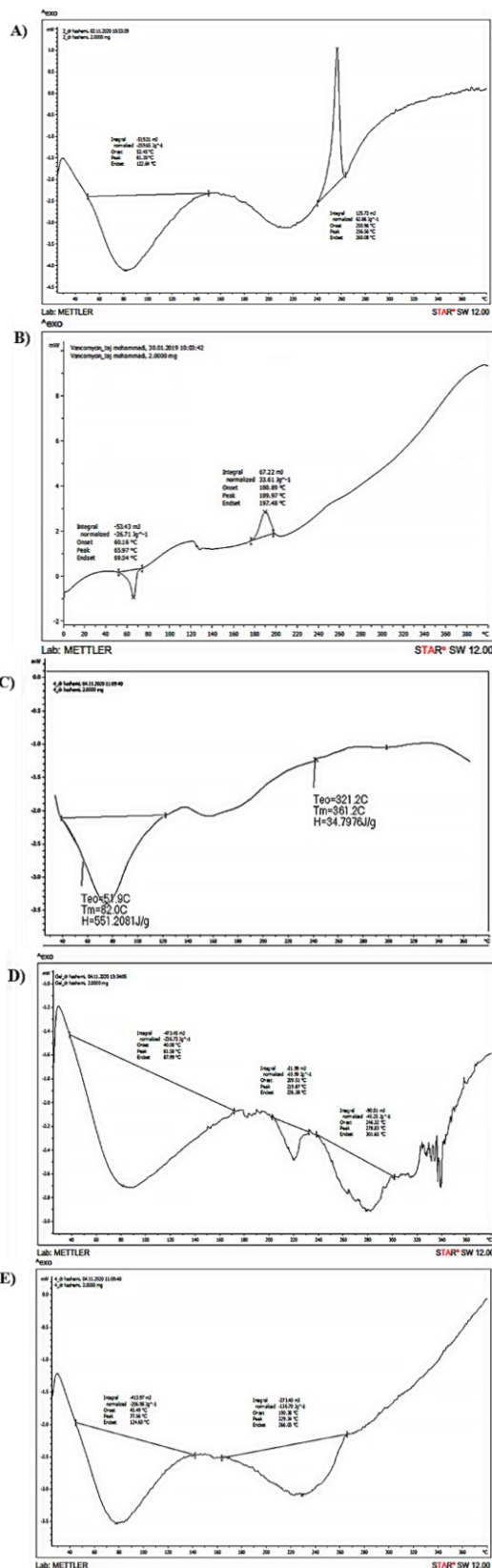
بررسی رفتار گرمائی گویچه‌ها به روش DSC

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



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

بر اساس تصاویر FTIR به دست آمده (تصویر شماره ۲C-D)، ژلاتین و کیتوزان گروه‌های عاملی مشابهی دارند. در طیف FTIR به دست آمده پیک گسترده و پهن در ناحیه 3407 cm^{-1} و پیک ضعیف در ناحیه 2932 cm^{-1} نشان‌دهنده گروه‌های هیدروکسیل (OH) و ارتعاشات کششی پیوند CH_2 در ساختار ژلاتین می‌باشد. در ساختار ترکیبی CS/G/VCM پیک گسترده مربوط به ارتعاشات کششی گروه هیدروکسیل به راحتی قابل تشخیص است که با پیک مربوط به گروه NH و آمین نوع دوم همپوشانی دارد. به دلیل 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 ساختار ژلاتین 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



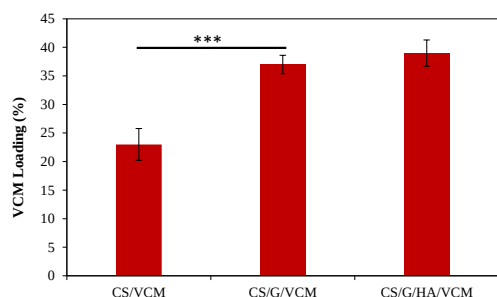
نمودار شماره ۳: تصاویر رفتار گرمایی گویچه‌ها با آنالیز DSC: HA(F), CS/G/VCM(E), G(D), CS/VCM(C), VCM(B), CS(A) و CS/G/HA/VCM (G)

گوییچه کیتوزان می‌باشد که دارای پیک اگرئومتريک در حدود 207°C است. براساس نمودار شماره ۵B، پیک‌های اندومتريک (به علت حذف آب و دهیدراسيون) و پیک‌های اگرئومتريک به ترتيب در دماهای $189/97^{\circ}\text{C}$ و $65/97^{\circ}\text{C}$ اتفاق افتاده است. هم‌چنين پیک اندومتريک مربوط به گوییچه کیتوزان حاوی وانکومایسین در دمای 82°C که مربوط به حذف آب می‌باشد و پیک پهن اگرئومتريک در دمای $361/2^{\circ}\text{C}$ مربوط به تجزیه همین نمونه می‌باشد و به دليل هم‌پوشانی وانکومایسین و کیتوزان اين پیک به‌صورت شکل عريض تر مشاهده شده است (نمودار شماره ۳).

در مورد ژلاتين براساس منحنی ارائه شده در تصویر 5D، سه نقطه اندومتريک در دماهای $321/20^{\circ}\text{C}$ ، $361/20^{\circ}\text{C}$ و $219/87^{\circ}\text{C}$ و پیک اگرئومتريک در دمای حدود 330°C مشاهده شد. پیک اندومتريک اولیه ممکن است مربوط به حالت ساختار هلیکس به کویل باشد که با دمای انتقال شیشه هم‌پوشانی داشته است.

گوییچه‌های CS/G/VCM دارای دو پیک اندومتريک در دماهای $77/56^{\circ}\text{C}$ و $229/34^{\circ}\text{C}$ می‌باشند. پیک اگرئومتريک آن بعد از 300°C است که تقریباً ماده تخریب شده و می‌توان گفت وجود ژلاتين در گوییچه CS/VCM باعث شيفت پیک‌ها شده است (نمودار شماره ۳E). هیدروکسی آپاتيت یک پیک اندومتريک در ناحیه 81°C دارد (نمودار شماره ۵F).

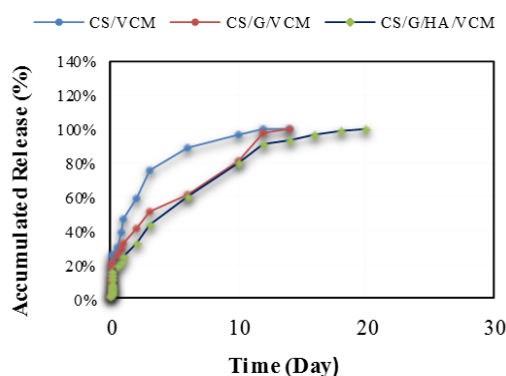
هم‌چنين در نمودار شماره ۵G مشاهده می‌شود که گوییچه‌های CS/G/HA/VCM دو پیک اندومتريک در دماهای $85/35^{\circ}\text{C}$ و $234/35^{\circ}\text{C}$ و یک پیک اندومتريک در 329°C دارند که در اين دما تخریب پليمر نیز اتفاق افتاده است. هم‌چنين نمودارهای حاصل شده تايبید می‌کنند که وجود هیدروکسی آپاتيت در گوییچه CS/G/HA/VCM باعث شيفت پیک‌ها شده است.



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

بررسی میزان آزادسازی دارو در گویچه‌ها

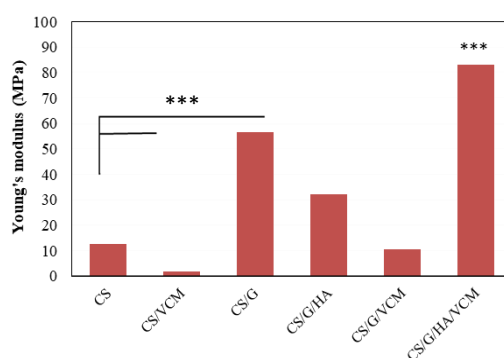
میزان آزادسازی دارو در بین گویچه‌های حاوی دارو بعد از لیوفیلیزه شدن طی ۲۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج آن در نمودار شماره ۶ ارائه شده است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که میزان آزادسازی تجمعی داروی وانکومایسین در روز دوم در گویچه‌های CS/VCM، CS/G/VCM و CS/G/HA/VCM به ترتیب درصد ۳۷، ۳۸ و درصد ۲۰ است که تفاوت معنی‌داری با رهش در دو گروه دیگر را نشان می‌دهد ($P < 0.005$). هم‌چنین در روز چهاردهم مطالعه میزان رهاسازی دارو در ساختارهای CS/VCM، CS/G/VCM و CS/G/HA/VCM به ترتیب ۸۵، ۸۹ و ۵۸ درصد به دست 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 ($P < 0.001$).



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

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 ($P < 0.05$). در مقابل افزودن وانکومایسین حالت عکس را نشان داده و خواص مکانیکی در نمونه‌های CS/VCM و CS/G/VCM به صورت معنی‌داری نسبت به نمونه‌های فاقد VCM کاهش داشته است ($P < 0.05$). 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 ($P = 0.09$). هم‌چنین براساس نتایج به دست آمده تفاوت معنی‌داری در میزان مدول یانگ در گروه گویچه‌های CS/G/HA/VCM با بقیه گویچه‌ها مشاهده شد ($P < 0.05$).

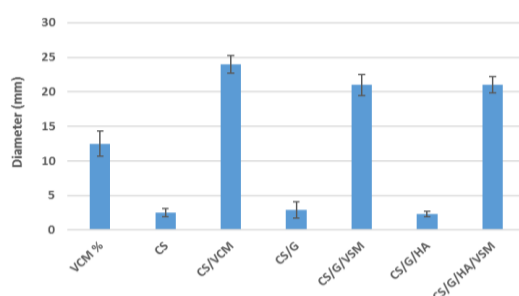


نمودار شماره ۴: مقایسه خواص مکانیکی (مدول یانگ) در گویچه‌های CS، CS/G، CS/G/HA، CS/VCM، CS/G/VCM و CS/G/HA/VCM

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 ($P < 0.001$) اما تفاوت معنی‌داری در بارگذاری دارو بین گویچه‌های CS با CS/G/HA/VCM مشاهده نشد.

شد که گویچه‌های کیتوزان حاوی دارو (CS/VCM)، به شکل معنی داری نسبت به کنترل مثبت (وانکومايسين ۵ درصد) افزایش در مساحت هاله عدم رشد در باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس داشتند ($P < 0/001$). این تفاوت در بین گروه‌های ذکر شده تفاوت معنی داری نداشت ($P > 0/05$).



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

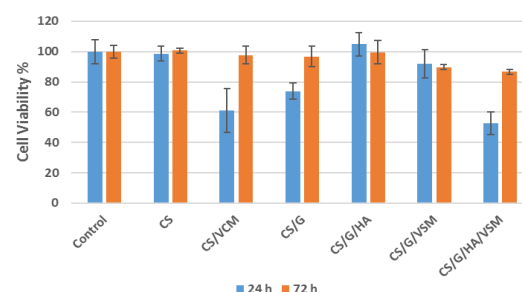
بحث

وانکومايسين 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 ساختار گویچه 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 به طور طبیعی در زنجیره جانبی شان دارای گروه‌های عاملی هیدروکسیل، آمین، آمید، اتر، کربوکسیلات و سولفونات می‌باشند، می‌توان استفاده کرد (۲۳، ۲۴). در مطالعات مختلفی برای حمل وانکومايسين از گویچه‌های متفاوتی

در بررسی درصد تجمع آزادسازی دارو در بین گویچه‌های مختلف، گویچه‌های گروه کیتوزان حاوی وانکومايسين 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 معنی داری با گروه قبل نداشتند ($P > 0/01$). 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 هیچ کدام از بازه‌های زمانی مطالعه، سمیتی مشاهده نشده است و تفاوت معنی داری بین نتایج به دست آمده بین گویچه‌های تولید شده با نمونه کنترل وجود ندارد.



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

بررسی میزان فعالیت ضدباکتریایی گویچه‌ها

میزان فعالیت بیولوژیک وانکومايسين 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

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

محققان نشان داده‌اند در گویچه‌های کیتوزانی با ساختار داخلی یکنواخت، محلول سدیم تری پلی فسفات (TPP) که یک پلیمر آنیونی است، با کیتوزان با خاصیت پلی کاتیونیکی واکنش داده و فیلم پیچیده پلی الکترولیتی را بر روی سطح محلول تشکیل می‌دهد. این فیلم پیچیده پلی الکترولیتی قادر است که مقادیر بیش تری از دارو را بعد از کراس لینک شدن در ساختار شبکه‌ای خود حمل کرده و دارو را برای مدت زمان طولانی تری رها کند (۲۶).

در مطالعه‌ای Cui و همکاران نشان دادند که افزودن کلاژن به کیتوزان با نسبت‌های ۱:۲، 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 بیش تر 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 فیزیکی شیمیائی آن بهبود داده شده است. در مطالعه حاضر ابتدا ژلاتین با نسبت‌های مختلفی به گویچه کیتوزان 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 بیش تر 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 بیش ترین 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 در گویچه CS/G/HA/VCM کم‌تر مشاهده شد. در راستای مطالعات انجام شده توسط محققین، دلیل آن نیز می‌تواند کمپلکس یکنواخت‌تر و محکم‌تر این ساختار باشد که دارو را بهتر در خود نگه دارد (۳۴-۳۶). بر اساس آنالیز FTIR انجام شده هیچ گونه گروه عاملی یا واکنش ناخواسته در ساختارهای تولید شده مشاهده نمی‌شود. هم‌چنین نتایج DSC تایید کننده ساختار بلورین در گویچه‌های تولیدی می‌باشند که به دلیل 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).

افزودن ژلاتین به شکل معنی داری درصد بارگیری دارو را نسبت به گویچه های CS افزایش داد و تفاوت در میزان بارگیری را می توان به ساختار بیدها و میزان تخلخل آن نسبت داد (۳۸).

در راستای نتایج به دست آمده توسط Toshihiro و همکاران، افزودن ژلاتین به ساختار گویچه ها، باعث افزایش زمان آزادسازی دارو تا ۱۶ روز شده است و گویچه CS/G/HA/VCM رهش آهسته تری از وانکومايسين را نشان می دهد (۳۹). در مطالعه انجام گرفته توسط Bishop و همکاران، مشخص شد افزودن وانکومايسين موجب کاهش خواص مکانیکی ساختارها می شود (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 می گیرد. پودرهای HAP که برای درمان نقایص استخوانی استفاده می شوند، این مشکل را دارند که به راحتی از محل های کاشته شده مهاجرت می کنند. بنابراین، کامپوزیت های جدید HAP و پلیمرهای آلی و طبیعی که می توانند خواص مکانیکی ضعیف HAP را جبران کنند، مورد توجه قرار گرفته اند (۴۱، ۴۲). هر چند که مشاهده شده است درصد این ترکیب در کنار پلیمرهای طبیعی می تواند در خصوصیات فیزیکوشیمیائی محصول نهائی تاثیر بگذارد. Qiaoling و همکاران ثابت کردند که هر چه محتوای هیدروکسی آپاتیت در کامپوزیت بیش تر باشد، کامپوزیت شکننده تر 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 پیش رو نیز، نشان داد که اضافه شدن هیدروکسی آپاتیت به گویچه های کیتوزان حاوی ژلاتین استحکام مکانیکی را نسبت به گویچه های کیتوزان حاوی ژلاتین به تنهایی کم کرده است، اما این کاهش تفاوت معنی داری را ایجاد نکرده است.

در مقادیر بالاتر و پائین تر هیدروکسی آپاتیت گویچه ها، از نظر ظاهری و استحکام مناسب نبودند. هم چنین افزودن وانکومايسين خواص مکانیکی در نمونه های CS/VCM و CS/G/VCM را به صورت معناداری نسبت به ساختارهای فاقد VCM کاهش داده است ($P < 0.05$). هر چند که این روند در CS/G/HA/VCM مشاهد نشد و افزودن وانکومايسين به این ساختار سبب افزایش مقاوت مکانیکی آن شد که علت آن نیز شاید به دلیل واکنش های وانکومايسين با اجزا موجود در ساختار گویچه باشد که سبب افزایش یا کاهش مقاومت آن می شود. نشان داده شده است که برخی از آنتی بیوتیک ها می توانند جهت گیری و اتصال عرضی زنجیره های پلیمری در ساختار بید را تحت تاثیر قرار دهند که منجر به تغییر در ویسکوزیته پس از اختلاط، زمان پلیمریزاسیون، غلظت آنتی بیوتیک های ترکیب شده، و استحکام و سفتی مکانیکی پلیمر مرشوند (۴۴). براساس نتایج به دست آمده از تست سمیت ساختارها با سلول های NIH 3T3، مشخص شد که گویچه ها پس از لیوفیلیزه شدن خاصیت سمی نداشته اند که دلیل آن می تواند غیر سمی بودن و زیست تجزیه پذیر بودن اجزا مورد استفاده در فرمولاسیون باشد. کیتوزان به عنوان پلیمری با خاصیت ضد میکروبی وسیع شناخته شده است (۴۵). وانکومايسين هنوز آنتی بیوتیک انتخابی در درمان بیماری های استافیلوکوکوس اورئوس می باشد. نتایج حاصل از بررسی فعالیت یولوژیک وانکومايسين آزاد شده از گویچه ها پس از لیوفیلیزه شدن بر روی میکروارگانيسم های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC6538) و گرم منفی اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) نشان داد که گویچه های کیتوزان حاوی دارو (CS/VCM، CS/G/VCM و CS/G/HA/VCM) به شکل معناداری نسبت به کنترل مثبت (وانکومايسين ۵ درصد) افزایش در مساحت هاله عدم رشد در باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس داشتند و این تفاوت در بین سایر گروه ها تفاوت معنی داری نداشت.

تضاد منافع: هیچ تضاد منافی وجود ندارد.

سپاسگزاری

از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد برای تامین هزینه این مطالعه سپاسگزاری می شود. مقاله حاضر قسمتی از رساله دکترای حرفه‌ای خانم فائزه ابهری در رشته داروسازی می باشد (شماره گرنت 971923). هم چنین تمام آزمایشات تحت تایید کمیته اخلاق (کد اخلاق: IR.MUMS.PHARMACY.REC.1398.31) معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد.

هدف از این مطالعه، تهیه و بررسی خصوصیات گویچه‌های کیتوزان حاوی وانکومایسین موثر در درمان استئومیلیت می باشد که توسط ژلاتین و هیدروکسی آپاتیت خواص فیزیکی شیمیایی آن بهبود داده شده است. گویچه‌های تولید شده از نظر خواص ساختاری، مکانیکی و بیولوژیکی گویچه‌های مورد ارزیابی قرار گرفتند. براساس نتایج به دست آمده گویچه‌های CS/G/HA/VCM به عنوان کاندیدای مناسبی برای کاهش و درمان عفونت‌های استئومیلت معرفی می گردند.

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, Foroghini 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, Leeansaksiri W, Apinun J, Honsawek S. A

- novel gelatin/chitoooligosaccharide/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-Kalhari 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 gelspheres. *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. Rahnema 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. Şanlı 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.

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-Kalhor 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-Kalhor 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.

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.