

## طراحی و ساخت میکرو حامل‌های پلیمری قابل تزریق بارگذاری شده با داروی تیکوپلانتین

Comment [1F]: لطفاً از مؤلف سؤال شود که رفرنس شماره ۱۸ در کجای متن قرار می‌گیرد؟

عطا توکلی<sup>۱</sup>، شهره مشایخان<sup>۲\*</sup>، حسین بنی‌اسدی<sup>۳</sup> و ذبیح‌الله حسن‌زاده<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> ایران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده مهندسی شیمی

<sup>۲</sup> ایران، تهران، دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، گروه مهندسی پزشکی

<sup>۳</sup> ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده نفت و مهندسی شیمی

<sup>۴</sup> ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، مرکز تحقیقات تروما

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۵



## چکیده

هدف اصلی از این پروژه ساختن یک میکرو حامل زیست‌سازگار و زیست تخریب‌پذیر قابل تزریق برای استفاده در دارو رسانی به استخوان و غضروف است. میکرو حامل‌های مناسب متشکل از کیتوسان و ژلاتین با استفاده از چمپ سرنگ مجهز به سامانه ولتاژ بالا ساخته شدند. نمونه‌ها با استفاده از سدیم تری پلی فسفات (*TPP*) شبکه‌ای شدند و داروی تیکوپلانتین بر روی آنها بارگذاری شد. شبکه‌ای شدن نمونه‌ها با آزمون *FTIR* تأیید شد. همچنین مورفولوژی و ساختار آنها با استفاده از عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی (*SEM*) بررسی شد. نتایج نشان داد که میکرو حامل‌هایی با ساختار تقریباً کروی و اندازه مناسب برای تزریق در بدن (قطر  $350 \pm 50 \mu m$ ) با دبی  $300 \mu l/min$  و ولتاژ  $8/5 KV$  تولید شده‌اند. به منظور کند کردن آهنگ رهائش دارو، یک لایه نازک پلیمری از جنس کیتوسان روی میکرو حامل‌ها پوشانده شد و سپس رهائش دارو مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نرخ رهائش در نمونه‌های با پوشش پلیمری از ۴ روز به ۵ روز افزایش یافته است که برای کاربرد مورد نظر میکرو حامل‌ها مناسب‌تر است. نتایج تست ضد میکروبی نیز مشخص ساخت که خاصیت ضد میکروبی داروی تیکوپلانتین طی فرآیند ساخت حفظ شده است. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که میکرو حامل‌های ساخته شده پتانسیل استفاده در درمان عفونت‌های غضروفی را دارا هستند.

واژه‌های کلیدی: تیکوپلانتین، دارورسانی، ژلاتین، کیتوسان، میکرو حامل

\* نویسنده مسئول، تلفن: +۹۸(۲۱)۶۶۱۶۶۴۱۴، پست الکترونیکی: mashayekhan@sharif.edu

## مقدمه

سامانه‌های دارورسانی باید مقدار کافی دارو را به محل هدف برسانند، رهائش پیوسته در یک مدت زمان خاص داشته باشند و زیست تخریب‌پذیر باشند تا احتیاج به عمل جراحی برای خارج کردن آنها نباشد (۳ و ۲۴).

در این پژوهش، تمرکز اصلی روی عفونت‌های غضروف مفصل زانو که شمار زیادی از بیماران ارتوپدی درگیر آن می‌باشند، است. درمان نامناسب و یا با تأخیر این عفونت‌ها می‌تواند موجب افزایش درد، فقدان عملکرد و گاه منجر به مرگ و میر گردد (۴ و ۵). عفونت‌های غضروف مفصل اکثراً

تکنولوژی رهائش دارو پس از پیدایش در دهه ۷۰ میلادی، به سرعت گسترش پیدا کرد. حامل‌های دارو مانند لیپوزوم‌ها، مایسل‌ها، دندریمرها و اخیراً میکرو و نانو ذرات انقلابی را در سامانه‌های دارو رسانی کنترل شده به وجود آورده‌اند (۱). از آنجا که بسیاری از داروهای موجود نمی‌توانند هدف اثرگذاریشان را بیابند، بازدهی مناسب و مطلوبی برای درمان بیماری ندارند؛ در نتیجه میزان قابل توجهی از دارو در بین بافت‌های سالم بدن پخش می‌شود و اغلب عوارض جانبی شدیدی را ایجاد می‌کند (۲). به طور کلی می‌توان گفت

تخریب‌پذیر و تیکوپلانتین به عنوان آنتی‌بیوتیک انتخاب شده است. جهت ساخت نمونه‌ها نیز از روش ژل سازی یونی با استفاده از دستگاه ولتاژ بالا استفاده شده است. با توجه به تأیید زیست سازگاری و زیست تخریب‌پذیری ترکیب کیتوسان/ژلاتین در مطالعات قبلی (۱۰-۸)، در این تحقیق بیشتر بر روی بررسی رهایش دارو و نیز خواص ضد میکروبی میکرواحملها تمرکز شده است و سعی شده است تا پتانسیل کاربرد این میکرواحمل جهت استفاده در درمان عفونت‌های غضروف مفصلی تأیید شود.

### مواد و روشها

**مواد:** در این پژوهش کیتوسان با ویسکوزیته پایین و وزن ملکولی متوسط (۲۸۰ kD) و درجه استیل‌زدایی ۸۵-۷۵ درصد، ژلاتین گرید دارویی (نوع A)، محلول بافر فسفات نمکی (PBS) و سدیم تری پلی فسفات (TPP) ۸۵ درصد، همگی از شرکت سیگما-آلدریج خریداری و استفاده شدند. همچنین اسید استیک و سدیم هیدروکساید (مرک-آلمان) و داروی تیکوپلانتین با نام تجاری تارگوسید (سانوفی- سویس) مورد استفاده قرار گرفت.

**ساخت میکرواحملها:** برای ساختن میکرواحملها از محلولهای (w/v) ۸ درصد کیتوسان و ژلاتین استفاده شد. به منظور دستیابی به محلول (w/v) ۸ درصد کیتوسان، مقدار ۰/۸ گرم کیتوسان داخل ۱۰ میلی‌لیتر اسید استیک ۲ درصد ریخته و روی همزن مغناطیسی در دمای اتاق به مدت ۴۸ ساعت همزده شد تا پودر کیتوسان به خوبی حل و محلول همگن حاصل شود. برای تهیه محلول (w/v) ۸ درصد ژلاتین، مقدار ۰/۸ گرم پودر ژلاتین درون ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه ریخته شد و به مدت ۳ ساعت روی همزن مغناطیسی با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد حل شد. محلولهای کیتوسان و ژلاتین ساخته شده به نسبت ۱ به ۱ با یکدیگر مخلوط و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت روی همزن مغناطیسی همزده شد.

به دلیل حضور میکروارگانسیمهای گرم مثبت از جمله استافیلوکوک، استرپتوکوک و به‌ویژه استافیلوکوکوس ارتوس ایجاد می‌شوند (۶و۵). به علت کم بودن رگهای خونی در این مناطق، درمان این نوع عفونت‌ها کاری بسیار مشکل است و معمولاً شامل مصرف طولانی مدت آنتی‌بیوتیک و اغلب همراه با جراحی می‌باشد. امروزه سیمانهای ارتویدی عموماً از جنس پلی متیل متاکریلات (PMMA) که حاوی آنتی بیوتیک می‌باشند برای پیشگیری و درمان این نوع از عفونت‌ها به کار می‌روند. آهنگ رهایش کم، زیست سازگاری ضعیف و نیاز به عمل جراحی دوم برای خارج کردن آنها از معایب سیمانهای PMMA است (۵). به عنوان جایگزین برای PMMA، اخیراً مواد قابل جذب مانند پلی‌لاکتیک اسید (PLA) و سرامیکها پیشنهاد شده‌اند (۶). با این وجود تجهیزات ساخته شده از PLA معمولاً حاوی حلالهای آلی باقیمانده از فرآیند ساخت هستند و مواد سرامیکی نیز بسیار شکننده می‌باشند و بنابراین استفاده از آنها می‌تواند مشکل ساز باشد (۶).

هدف این مطالعه، طراحی و ساخت یک سیستم دارورسانی مناسب جهت درمان و پیشگیری عفونت‌های غضروف مفصلی است. تحقیقات بسیاری نشان می‌دهند کیتوسان و ژلاتین هر دو دارای خاصیت ضد میکروبی هستند؛ به طوری که ترکیب این دو پلیمر برای ساخت حامل دارو، منجر به خاصیت ضد میکروبی محصول حتی بیشتر از هر دو ماده به تنهایی شده است (۷). همچنین زیست سازگاری و زیست تخریب‌پذیری این ترکیب به تنهایی و نیز در کنار هم به خوبی اثبات شده است (۹و۸). از سوی دیگر مطالعات مشخص ساخته‌اند که داروی تیکوپلانتین که یک آنتی بیوتیک با طیف وسیعی از فعالیت می‌باشد، بسیاری از ارگانسیمهای هوازی و بی‌هوازی از جمله استافیلوکوکوس ارتوس مقاوم به متیسیلین که شایع‌ترین میکروارگانسیم برای عفونت‌های استخوان است را پوشش می‌دهد (۶). به همین منظور در تحقیق حاضر پلیمرهای ژلاتین و کیتوسان برای ساخت میکرو حامل زیست

جهت محاسبه میزان داروی بارگذاری شده درون میکروحااملها، مقدار مشخصی نمونه خشک بارگذاری شده با دارو درون محلول PBS غوطه‌ور و به مدت ۲۴ ساعت به شدت همزده شد تا میکروحااملها کاملاً تخریب و داروی بارگذاری شده در آنها کاملاً خارج شود. سپس با استفاده از روش جذب، میزان داروی بارگذاری شده محاسبه شد. راندمان بارگذاری دارو در نمونه‌ها که از تقسیم میزان داروی بارگذاری شده بر میزان کل داروی موجود در محلول به دست آمد، ۱/۶ درصد بود که بیانگر بارگذاری کم دارو توسط این روش است.

**پوشش‌دهی میکروحاامل‌های حاوی دارو:** برای رهایش مطلوب‌تر، لایه نازک پلیمری روی حامل‌های حاوی دارو پوشش داده شد. این لایه پلیمری نیز باید زیست‌سازگار بوده و همچنین نباید از قابلیت تزریق‌پذیر بودن نمونه‌ها جلوگیری کند. با توجه به این شرایط، محلول رقیق کیتوسان به عنوان لایه پوشش‌دهنده انتخاب شد. برای پوشش دادن میکروحاامل‌های حاوی دارو با کیتوسان، پس از بارگذاری دارو و خشک شدن، نمونه‌ها داخل محلول (w/v) ۰/۸ درصد کیتوسان خنثی شده با سود به مدت ۱۰ دقیقه با همزدن آرام غوطه‌ور شدند و سپس در دمای اتاق به مدت ۱۲ ساعت خشک شدند (۱۴، ۱۵، ۱۶).

**مطالعات ساختاری:** مطالعه روی مورفولوژی میکروحاامل‌های بهینه بدون دارو و حاوی دارو و دارای پوشش کیتوسان به وسیله عکس‌برداری SEM انجام شد. نمونه‌های ساخته شده پس از آماده سازی و پوشش‌دهی توسط طلا، تحت آزمون SEM قرار گرفتند. به منظور مطالعه پیوندهای برقرار شده بین کیتوسان و ژلاتین و همچنین برای بررسی صحت شبکه‌ای شدن نمونه‌ها، تست FTIR از کیتوسان خالص، ژلاتین خالص و میکروحاامل ساخته شده، گرفته شد.

**رهایش دارو در محیط برون تنی:** رهایش دارو از میکروحاامل کیتوسان-ژلاتین بارگذاری شده با دارو، در

در این تحقیق، برای ساخت میکروحااملها به شیوه ژل‌سازی یونی، ابتدا محلول پلیمری درون سرنگ به کمک پمپ سرنگی به درون محلول شبکه‌کننده (محلول TPP با غلظت ۵ w/v درصد) چکانده شد. میدان مغناطیسی ایجاد شده باعث می‌شود که قطره‌های تشکیل شده از نوک سوزن زودتر جدا شوند و کره‌های کوچک‌تری درون محیط شبکه‌کننده ریخته شود. تمام مراحل فوق در زیر هود و شرایط استریل انجام گرفت. میکروحاامل‌های حاصل ۳ بار با آب دیونیزه شستشو داده شد تا TPP سطحی روی میکروحااملها به‌طور کامل شسته شود. لازم به ذکر است که برای ساخت میکروحااملها شش حالت مختلف به لحاظ ولتاژ اعمالی و نیز دبی جریان در نظر گرفته شد. چون هدف ساخت میکروحاامل برای تزریق درون بدن می‌باشد، نمونه‌ای مطلوب است که قطر آن در محدوده مناسب (۱۵۰-۳۸۰ μm) برای تزریق درون بدن باشد (۱۰). با توجه به پیش‌آزمایش‌های انجام شده، دبی جریان و ولتاژ مناسب به ترتیب ۳۰۰ μl/min و ۸/۵ kV انتخاب شد.

**بارگذاری دارو:** به منظور بارگذاری بهتر دارو داخل میکروحااملها، نسبت سطح به حجم با متخلخل کردن نمونه‌ها افزایش داده شد. برای متخلخل کردن میکروحااملها از روش خشک کردن انجمادی (دمای ۴۰- درجه، خلا ۱ mbar، زمان ۲۴ ساعت) استفاده شد. پس از متخلخل کردن میکروحااملها، نمونه‌ها استریل شدند، به این ترتیب که ابتدا میکروحاامل‌های متخلخل شده به مدت ۴ ساعت درون اتانول (v/v) ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند؛ سپس سه مرتبه با آب دیونیزه شستشو داده شدند و در نهایت در زیر هود استریل به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند (۲۳ و ۲۴). نمونه‌های استریل شده درون محلول داروی تیکوپلانتین با غلظت ۸۰ mg/ml به مدت ۳ ساعت غوطه‌ور شدند تا دارو به مقدار کافی بارگذاری شود (۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۲۳). نمونه‌های حاوی دارو دو بار با آب مقطر شستشو داده شدند؛ سپس به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق و شرایط استریل خشک شدند.

حاوی باکتری ایجاد و  $200 \mu\text{l}$  از محلول حاصل از رهایش دارو (مربوط به پایان روزهای اول و آخر رهایش) درون چاهک ریخته شد. پلیتهای حاوی میکروب و دارو به مدت ۱۸ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه انکوبه شدند و سپس قطر هاله ایجاد شده دور نمونه‌ها به عنوان معیاری از فعالیت ضدباکتریایی دارو اندازه‌گیری شد. برای نمونه‌های کنترل از پودر دارو محلولهایی با غلظتهای به دست آمده از آزمایشها در روزهای مد نظر آزمایش (اول و پنجم)، تهیه شد. از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

**مطالعات آماری:** هر آزمایش به تعداد سه بار انجام شد و مقادیر میانگین گزارش شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS.18 تجزیه و تحلیل شدند و مقدار P-value کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### نتایج و بحث

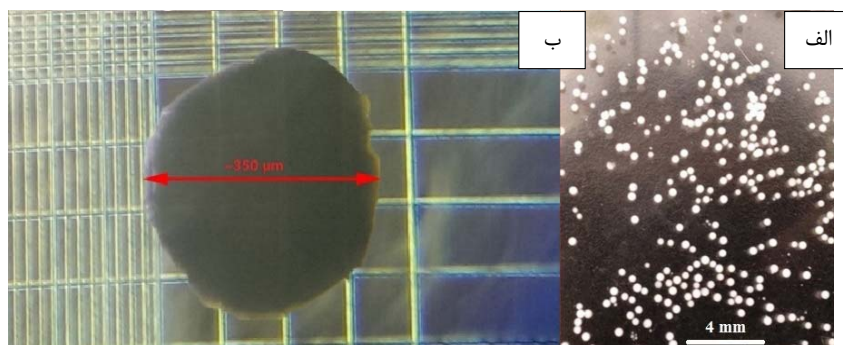
**مطالعه ساختاری و گروههای عاملی در میکرواحمالها:** همان طور که قبلاً نیز اشاره شد برای تولید میکرواحمالها شرایط مختلفی به لحاظ دبی جریان و نیز ولتاژ اعمالی در نظر گرفته شد که در نتیجه، میکرواحمالها با قطره‌های مختلف تولید شدند. قطر مناسب برای میکرواحمالها جهت تزریق در بدن در محدوده  $380-150 \mu\text{m}$  می‌باشد (۱۰). بنابراین، دبی پمپ سرنگ و ولتاژ اعمالی به ترتیب  $300 \mu\text{l}/\text{min}$  و  $8/5 \text{ Kv}$  انتخاب شد تا قطر نمونه‌های تولید شده در محدوده مناسب برای کاربرد مورد نظر باشند. همچنین، قابلیت تزریق حاملهای ساخته شده با شرایط بهینه تولید، توسط یک آنژیوکت شماره ۱۷ بررسی شد و مشاهده شد که آسیبی به میکرواحمالها وارد نشده است. با استفاده از میکروسکوپ نوری از میکرواحمالهای ساخته شده با شرایط بهینه عکس‌برداری شد تا قطر نمونه‌ها مشخص شود (شکل ۱). همان طور که مشاهده می‌شود قطر میکرواحمالهای بهینه حدود  $350 \pm 50 \mu\text{m}$  می‌باشد که نشان دهنده قابل تزریق بودن آنهاست.

محلول PBS مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور هر دو نوع میکرواحمال بدون پوشش کیتوسان و پوشش داده شده با کیتوسان، در محلول PBS غوطه‌ور شدند ( $8 \text{ ml}$  میلی گرم میکرواحمال در هر میلی لیتر PBS). سپس نمونه‌ها درون انکوباتور در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه قرار گرفتند. به منظور بررسی رهایش در زمانهای ۱، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت در روز اول و پس از آن هر ۲۴ ساعت به مدت ۷ روز،  $0/5 \text{ ml}$  میلی لیتر از محیط رهایش برداشته شد و همان مقدار PBS از پیش گرم شده جایگزین شد. سپس توسط اسپکتروفوتومتر UV-Vis در طول موج  $248 \text{ nm}$  اندازه‌گیری شد و با مقایسه با منحنی استاندارد، درصد تجمعی داروی رهایش پیدا کرده در هر زمان با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد:

$$\text{CDR \%} = \frac{C_n V_0 + V_s \sum_{i=1}^{n-1} C_i}{\text{Total loaded drug}} \times 100 \quad (1)$$

در رابطه فوق  $C_i$  غلظت نمونه برداشته شده از محلول رهایش در زمان  $i$ ،  $V_s$  حجم محلول خالص جایگزین شده ( $0/5 \text{ ml}$ )،  $V_0$  حجم اولیه محلول رهایش و  $C_n$  غلظت نهایی محلول رهایش بعد از اتمام آزمایش می‌باشد.

**آزمون ضد میکروبی:** برای اثبات فعالیت داروی رها شده از میکرواحمالها و حفظ خاصیت ضد میکروبی، آزمون ضد میکروبی با استفاده از دو نوع باکتری سودوموناس آئروژینوزا (گرم منفی) و استافیلوکوکوس آئروس (گرم مثبت) (۱۷) برای حاملهای پوشش داده شده با کیتوسان با استفاده از روش انتشار چاهک (۲۰۱۹) انجام شد. برای کشت دادن باکتریها از محیط مولر هیتون آگار استفاده شد؛ به این ترتیب که  $5/6 \text{ g}$  پودر آگار نوترینت درون  $200 \text{ ml}$  آب مقطر تحت دما حل شد. محلول به دست آمده درون اتوکلا استریل گردید. محلول استریل آگار درون پلیتهای پلی اتیلنی ریخته شد. سپس باکتریها به پلیتهای حاوی محیط آگار اضافه شد. پلیتهای حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند تا باکتری رشد کند و تمام سطح محیط را پوشش دهد. سپس چاهکهایی روی محیط آگار

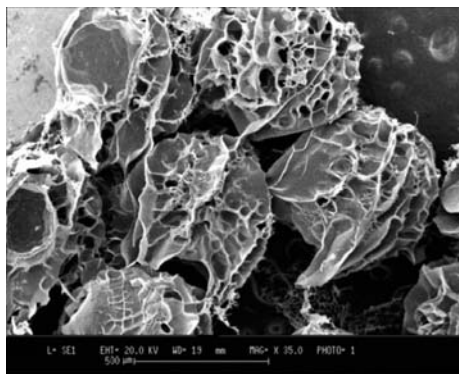


شکل ۱- تصویر میکروسکوپ نوری از حامل‌های ساخته شده با شرایط بهینه: الف) تجمع میکرو حامل‌ها و ب) یک میکرو حامل

از خشک کردن انجمادی در میکرو حامل‌ها به خوبی ایجاد شده است. بنابراین انتظار می‌رود که میزان جذب و رهایش داروی تیکوپلانتین از میکرو حامل‌های ساخته شده مقدار قابل توجهی باشد. نکته‌ای که باید به آن اشاره شود این است که ساختار تقریباً کروی شکل با قطر حدود  $350 \pm 50 \mu\text{m}$  از تصاویر SEM نیز قابل ملاحظه می‌باشد. به عبارت دیگر تصاویر SEM یافته‌های حاصل از تصویربرداری با میکروسکوپ نوری مبنی بر کروی بودن و قطر مناسب میکرو حامل‌های ساخته شده را تأیید می‌کند.

همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد برای رهایش مطلوب‌تر دارو و جلوگیری از رهایش ناگهانی آن، پوشش نازکی از کیتوسان پیرامون دارو کشیده شد. شکل ۳ الف تصویر SEM تهیه شده از میکرو حامل بارگذاری شده با دارو بعد از پوشش با کیتوسان را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود وجود پوشش بر روی میکرو حامل از روی مقایسه با تصاویر میکرو حامل‌های متخلخل بدون پوشش، قابل اثبات می‌باشد؛ همچنین خلل و فرج‌های موجود در نمونه به میزان قابل توجهی کاهش یافته است. بنابراین انتظار می‌رود که میزان رهایش دارو در نمونه با پوشش نسبت به نمونه بدون پوشش کیتوسان، کاهش نشان دهد (به این مورد در بخش آزمایش رهایش دارو پرداخته شده است). نکته دیگری که از تصویر SEM قابل دستیابی می‌باشد حفظ ساختار کروی و نیز اندازه میکرو حامل بعد از بارگذاری و پوشش آن با کیتوسان است. به منظور بررسی

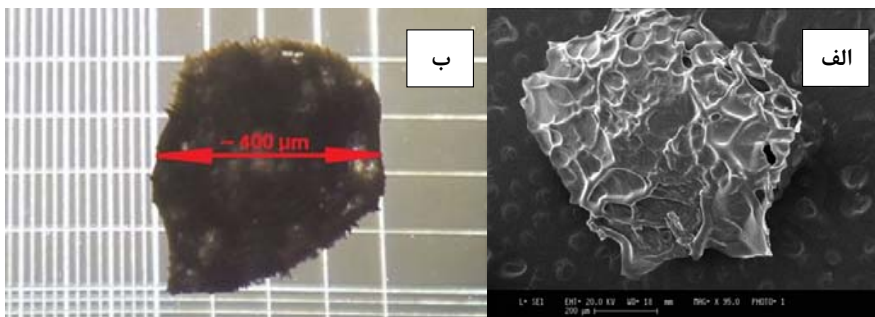
مواد متخلخل به دلیل ویژگی‌های مناسبی که دارند از جمله ساختار متخلخل یکنواخت و پایدار، سطح تماس بالا، اندازه حفرات موزون با توزیع باریک و خواص سطحی مناسب، برای رهایش کنترل شده دارو بیشتر مورد توجه قرار دارند (۱۹). میکرو حامل‌های متخلخل دارای نانوحفرات بسیار زیاد می‌باشند که قابلیت نگهداری دارو را افزایش می‌دهند. به عبارت دیگر میکرو حامل‌های متخلخل این توانایی را خواهند داشت که فرآیند جذب و رهایش دارو را به میزان بیشتر و قابل پیش‌بینی‌تری انجام دهند. بنابراین، به منظور بررسی تخلخل نمونه‌های تولید شده از میکرو حامل‌های متخلخل شده طی فرآیند خشک کردن انجمادی، تصویر SEM تهیه شد (شکل ۲).



شکل ۲- تصویر SEM از میکرو حامل‌های متخلخل شده توسط فرآیند خشک کردن انجمادی

همان‌طور که مشاهده می‌شود ساختار کاملاً متخلخل ناشی

باعث شده تا ساختار ظاهری آنها اندکی تغییر کند، اما کماکان حالت کروی حفظ شده است. علاوه بر این اندازه میکرو حامل تغییر چشمگیری پیدا نکرده است و همچنان در محدوده مناسب برای تزریق در بدن می باشد.

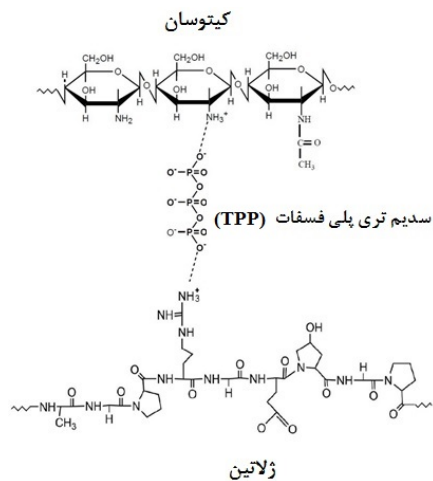


شکل ۳- تصاویر تهیه شده از میکرو حامل حاوی دارو و پوشش شده با کیتوسان: الف) SEM و ب) میکروسکوپ نوری

تأثیر بارگذاری دارو و نیز پوشش دهی بر روی ساختار کروی و اندازه میکرو حامل، از نمونه بارگذاری شده با دارو که دارای پوشش کیتوسانی است، تصویر میکروسکوپ نوری نیز تهیه شد (شکل ۳ب). همان طور که مشاهده می شود بارگذاری دارو و پوشش دهی میکرو حاملها با کیتوسان

به منظور بررسی گروههای عاملی در میکرو حاملهای اتصال عرضی شده از کیتوسان خالص، ژلاتین خالص و نمونه تولید شده با شرایط بهینه تست FTIR تهیه شد (شکل ۵). همان طور که مشاهده می شود تمامی نمونه ها یک پیک قوی در حدود  $3430 \text{ cm}^{-1}$  نشان می دهند که مربوط به گروههای آمینو ( $\text{-NH}_2$ ) و هیدروکسیل ( $\text{-OH}$ ) می باشد (۸، ۲۰ و ۲۱). در نمونه کیتوسان خالص یک پیک در محدوده  $3000\text{-}2840 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده می شود که مربوط به گروههای  $\text{-CH}_2$  و  $\text{-CH}_3$  موجود در کیتوسان است (۸). همچنین در طیفهای مربوط به کیتوسان خالص یک پیک در  $1641 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده می شود که مربوط به خمش پیوند N-H است (۸). در ژلاتین خالص نیز پیک  $1638 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه کربونیل ( $\text{C=O}$ ) می باشد. همچنین پیکهای ظاهر شده در محدوده  $1000 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروههای مختلف آمین است (۲۲). در طیف مربوط به میکرو حامل، ترکیبی از طیفهای کیتوسان و ژلاتین خالص با اندکی تفاوت قابل مشاهده می باشد. پیکهای مربوط به N-H کیتوسان و  $\text{C=O}$  در ژلاتین به  $1639 \text{ cm}^{-1}$  انتقال پیدا کرده است. این انتقال برای هر دو گروه آمین و کربونیل نشان دهنده ایجاد

ژلاتین در محیطهای اسیدی دارای بار مثبت است. کیتوسان نیز دارای بار مثبت می باشد. براساس مطالعات گذشته (۸) انتظار می رود که گروه  $\text{NH}_3^+$  در کیتوسان و ژلاتین با  $\text{O}^-$  در شبکه کننده TPP پیوند برقرار کنند. در شکل ۴ نمای کلی واکنش بین کیتوسان، ژلاتین و TPP نشان داده شده است.

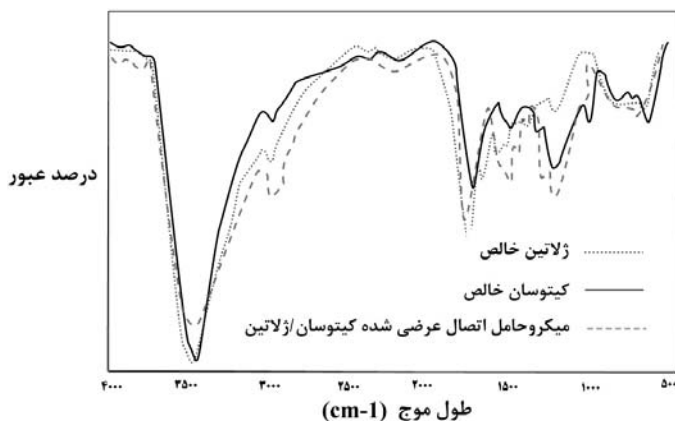


شکل ۴- نمای کلی واکنش بین زنجیره کیتوسان و ژلاتین در حضور شبکه کننده TPP

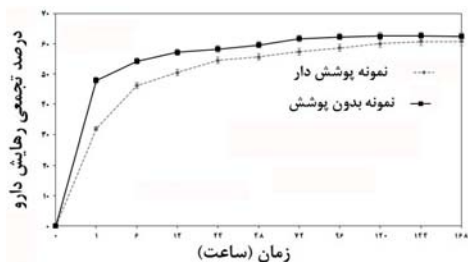
پژوهش، در مورد نمونه‌های کیتوسان-ژلاتین مشاهده شد که یک پیوند در  $1132 \text{ cm}^{-1}$  وجود دارد که مربوط به کشش پیوند  $\text{P=O}$  در یون فسفات می‌باشد. این امر حضور TPP در محصول نهایی و در نتیجه صحت شبکه‌ای شدن زنجیره‌های کیتوسان و ژلاتین را در حضور شبکه کننده TPP اثبات می‌کند (۲۵ و ۲۶).

ترکیبی با پیوند هیدروژنی بین کیتوسان و ژلاتین است (۲۱).

گولارت و همکاران (۲۵) در تحقیقی اثبات کردند نمونه‌های شبکه‌ای شده کیتوسان با TPP یک پیک جدید را در  $1150 \text{ cm}^{-1}$  نشان می‌دهند. این پیک به پیوند دوگانه O و P در طیفهای گرفته شده برای این



شکل ۵- نمودار FTIR از کیتوسان خالص، ژلاتین خالص و میکرو حامل اتصال عرضی شده با TPP



شکل ۶- نمودار رهائش تجمعی داروی تیکوپلانتین از میکرو حامل کیتوسان-ژلاتین

در پایان روز اول مقدار داروی تجمعی آزاد شده برای نمونه بدون پوشش برابر  $58/21$  درصد معادل  $\mu\text{g/ml}$   $148/033$  و برای نمونه پوشش داده شده با کیتوسان برابر  $54/52$  معادل  $\mu\text{g/ml}$   $138/650$  می‌باشد. در تحقیقی مشابه جیا و همکارانش (۲۷) ساخت و بررسی حاملهای سولفات کلسیم بارگذاری شده با داروی تیکوپلانتین را برای درمان عفونت‌های استخوانی در مورد نمونه حیوانی گزارش کردند. آنها نیز مشاهده کردند که رهائش دارو از حامل مذکور بعد

رهائش دارو: روند رهائش دارو از میکرو حامل حاوی دارو در محیط بافر فسفات و در دمای  $37$  درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفت. نمودار رهائش داروی تیکوپلانتین از میکرو حامل کیتوسان-ژلاتین با پوشش کیتوسان و بدون پوشش در زمانهای مختلف در شکل ۶ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود مقدار داروی رها شده از میکرو حامل بدون پوشش و با پوشش کیتوسانی پس از یک ساعت به ترتیب برابر  $47$  درصد و  $32$  درصد می‌باشد که گویای رهائش ناگهانی دارو در نمونه بدون پوشش و تأثیر مثبت پوشش نازک پلیمری در جلوگیری از رهائش ناگهانی دارو می‌باشد. در تحقیقی که توسط موفق و همکارانش (۱۲) بر روی رهائش دارو از میکرو حاملهای کیتوسانی انجام شد نیز نشان دهنده رهائش زیاد دارو از میکرو حامل در روز اول نسبت به روزهای دیگر بود.

رفتن روکش نازک کیتوسانی در ساعات اولیه رهایش در اثر رهایش زیاد دارو می‌باشد. به عبارت دیگر در پایان روز اول رهایش مقدار قابل توجهی از پوشش کیتوسان پیرامون میکروحاامل در اثر رهایش دارو از بین رفته است و رهایش هر دو نمونه با پوشش و بدون پوشش تقریباً با نرخ یکسانی ادامه یافته است.

با توجه به نتایج به دست آمده از تست رهایش دارو تیکوپلانتین از میکروحاامل‌های ساخته شده در کار تحقیقاتی حاضر و مقایسه آن با نتایج دیگر محققین می‌توان نتیجه گرفت میکروحااملها نتایج مناسبی برای رهایش دارو نشان می‌دهند.

**آزمون ضد میکروبی:** برای بررسی تأثیر فرآیند ساخت میکروحااملها بر روی ماهیت ضد میکروبی داروی تیکوپلانتین از آزمون ضد میکروبی با استفاده از دو نوع باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (گرم منفی) و *استافیلوکوکوس آرتوس* (گرم مثبت) استفاده شد. غلظت نمونه‌های کنترل به کار گرفته شده در این آزمون عبارت بودند از  $138 \mu\text{g/ml}$  و  $152 \mu\text{g/ml}$  که به ترتیب معادل غلظت داروی آزاد شده در پایان روزهای اول و پنجم رهایش برای نمونه‌های پوشش داده شده با کیتوسان است. از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

در پایان آزمون مشاهده گردید که هاله‌ای دور چاهکها به وجود آمده است. قطر هاله ایجاد شده در محیط *استافیلوکوکوس آرتوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* در شکل ۷ آورده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود قطر هاله در محیطهای *استافیلوکوکوس آرتوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* برای محلولهای حاصل از رهایش دارو در پایان روز اول به ترتیب  $0.12 \pm 0.31 \text{ cm}$  و  $0.14 \pm 0.35$  اندازه‌گیری شده است. بیندو و همکارانش (۷) بر روی خاصیت ضد میکروبی ترکیب کیتوسان/ژلاتین با استفاده از این دو نوع باکتری مطالعاتی انجام دادند. آنها نشان دادند که قطر هاله ایجاد شده در محیطهای

از گذشت یک روز  $49/08$  درصد می‌باشد. ژانگ و همکارانش (۲۸) نیز ساخت و بررسی حاملهای کیتوسانی بارگذاری شده با داروی تیکوپلانتین را برای درمان عفونت‌های استخوانی در نمونه حیوانی گزارش دادند. آنها نیز مشاهده کردند که بعد از گذشت یک روز میزان رهایش دارو  $47/46$  درصد می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد به طور کلی میزان رهایش از حاملهای کیتوسانی بارگذاری شده با داروی تیکوپلانتین در روز اول آزمایش زیاد است.

پس از پایان روز اول آهنگ رهایش دارو در هر دو نمونه با پوشش و بدون پوشش کاهش یافته است. در هر دو نمونه میزان رهایش از روز ششم به بعد ثابت باقی مانده است و تا روز سی‌ام تغییر قابل توجهی در رهایش دارو مشاهده نشده است. به عبارت دیگر مقدار نهایی رهایش دارو از نمونه‌های بدون پوشش و دارای پوشش به ترتیب بر روی اعداد  $62$  درصد ( $158/310 \mu\text{g/ml}$ ) و  $60$  درصد ( $152/77 \mu\text{g/ml}$ ) ثابت شده است. لازم به ذکر است که به دلیل عدم تغییر قابل توجه در میزان رهایش دارو از میکروحاامل‌های ساخته شده از روز هفتم به بعد، داده‌های رهایش برای روزهای هشتم تا سی‌ام در شکل ۶ نشان داده نشده است.

نتایج تحقیقات دیگر محققین (۱۳، ۲۶، ۲۷ و ۲۸) در این زمینه نیز نشان می‌دهد که رهایش داروی تیکوپلانتین از حامل آن حدود یک هفته به طول می‌انجامد و پس از آن رهایش قابل توجهی حتی پس از گذشت یک ماه از آزمایش، مشاهده نمی‌شود.

نکته دیگری که از شکل ۶ قابل مشاهده می‌باشد کاهش اختلاف در میزان رهایش دارو بین نمونه‌های با پوشش و بدون پوشش بعد از گذشت ۲۴ ساعت از رهایش می‌باشد؛ به طوری که ۱ ساعت بعد از رهایش این اختلاف حدود ۱۵ درصد بوده است در حالیکه بعد از پایان روز اول این اختلاف به حدود ۴ درصد و در پایان روز هفتم به حدود ۲ درصد رسیده است. این پدیده احتمالاً به دلیل از بین



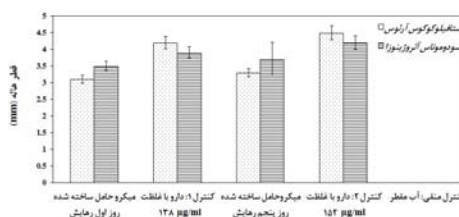
شده در آزمایشها نسبت به داروی خالص اثر خود را اندکی از دست داده است، اما همچنان تأثیر ضد میکروبی مناسبی را از خود نشان می‌دهد.

نتایج به دست آمده در این کار تحقیقاتی نشان داد که میکرو حاملهای متخلخل ساخته شده از ترکیب کیتوسان/ژلاتین که با ماده TPP اتصال عرضی شده‌اند توانایی جذب و رهایش کنترل شده داروی تیکوپلانتین که در درمان عفونتهای غضروفی کاربرد دارد را به خوبی دارا هستند. با این وجود در ساعات آغازین، رهایش دارو به صورت ناگهانی است و نیاز به بهینه سازیهای بیشتر در این زمینه احساس می‌شود؛ با این وجود کماکان خاصیت ضد باکتریایی داروی بارگذاری شده طی فرآیند تولید به میزان قابل قبولی حفظ شده است. بنابراین، می‌توان انتظار داشت که میکرو حاملهای مذکور پتانسیل تزریق درون بدن جهت درمان عفونتهای غضروفی را دارا باشند.

### نتیجه‌گیری

در این تحقیق میکرو حاملهای متخلخل کیتوسان/ژلاتین با قطری در حدود  $350 \pm 50 \mu m$  با استفاده از دستگاه پمپ تزریق مجهز به سیستم ولتاژ بالا تولید شدند. این حاملها قابلیت تزریق درون بدن را دارا می‌باشند. همچنین نتایج رهایش داروی تیکوپلانتین از این حاملها مشخص ساخت که نمونه‌های تولیدی می‌توانند طی مدت ۵ روز تا حدود ۶۰ درصد رهایش داشته باشند. همچنین خاصیت ضد میکروبی داروی تیکوپلانتین در حین فرآیند تولید حفظ شد. بنابراین می‌توان انتظار داشت که ترکیب اتصال عرضی شده کیتوسان/ژلاتین حامل مناسبی برای بارگذاری دارو تیکوپلانتین باشد و بتوان از این حاملها جهت درمان عفونتهای غضروفی و استخوانی درون بدن استفاده نمود.

استافیلوکوکوس آرتوس و سودوموناس آئروژینوزا یک روز بعد از آزمایش به ترتیب  $1/37 \pm 0/06 \text{ cm}$  و  $1/26 \pm 0/04 \text{ cm}$  می‌باشد. بنابراین، نتایج حاصل از تحقیق حاضر بیانگر تأثیر مثبت بارگذاری دارو بر روی خاصیت ضد میکروبی ترکیب کیتوسان/ژلاتین است. قطر هاله برای نمونه کنترل در پایان روز اول در محیطهای استافیلوکوکوس آرتوس و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب برابر  $4/19 \pm 0/19 \text{ cm}$  و  $3/9 \pm 0/17 \text{ cm}$  به دست آمد که نشان دهنده کاهش اندک فعالیت داروی بارگذاری شده نسبت به داروی خالص است. کاهش فعالیت داروی بارگذاری شده نسبت به داروی خالص در کارهای تحقیقاتی دیگران نیز مشاهده شده است (۲۸ و ۲۹).



شکل ۷- قطر هاله‌های ایجاد شده دور نمونه‌ها

همان‌طور که مشاهده می‌شود قطر هاله تشکیل شده در هر دو محیط استافیلوکوکوس آرتوس و سودوموناس آئروژینوزا برای محلولهای حاصل از رهایش در پایان روز پنجم نسبت به نمونه‌های مشابه در روز اول رهایش افزایش یافته است که نشان دهنده افزایش خاصیت ضد میکروبی آنها می‌باشد. با این وجود همانند روز اول رهایش، در این حالت نیز فعالیت ضد میکروبی نمونه‌های کنترل (داروی خالص با غلظت مشابه) نسبت به میکرو حاملها بیشتر بوده است. نتایج حاصل بیانگر این مطلب است که داروی آزاد شده از میکرو حاملها در پایان این دو روز به خوبی توانسته است از رشد هر دو نوع باکتری استافیلوکوکوس آرتوس و سودوموناس آئروژینوزا جلوگیری کند. به عبارت دیگر با وجودی که داروی آزاد

## منابع

- 1- Aalami Harandi B, 1382, Textbook of orthopedics and Fractures, 1st edition, Tehran University of Medical Science Publications.
- 2- Adibkia K, Barzegar-Jalali M, Javadzadeh Y, Bayrami R, Mohammadi G, 2012, A review on the porous adsorbents in drug delivery systems, *Pharm Sci.*, 18, 2, 103-118.
- 3- Ahuja G, Pathak K, 2009, Porous Carriers for Controlled/Modulated Drug Delivery, *Indian J Pharm Sci.*, 71, 6, 599-607.
- 4- Anal AK, Stevens WF, 2005, Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin, *Int. J. Pharm.*, 290, 1, 45-54.
- 5- Baniasadi H, Ramazani A, Mashayekhan S, 2015, Fabrication and characterization of conductive chitosan/gelatin-based scaffolds for nerve tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.*, 74, 360-366.
- 6- Bindu TVLH., Vidyavathi M, Kavitha K, Sastry TP, 2011, Preparation and evaluation of gentamicin loaded chitosan-gelatin composite films for wound healing activity, *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.*, 2, 453-463.
- 7- Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR, 2011, Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects, *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 9, 7, 857-879.
- 8- Darley ESR, McGowan AP, 2004, Antibiotic treatment of gram-positive bone and joint infections, *J. Antimicrob. Chemo.*, 53.6, 928-935.
- 9- Ding H, Zhao CJ, Cui X, Gu YF, Jia WT, Rahaman MN, Wang Y, Huang WH, Zhang CQ, 2014, A Novel Injectable Borate Bioactive Glass Cement as an Antibiotic Delivery Vehicle for Treating Osteomyelitis, *PLoS one*, 9.1, 85472.
- 10- Hajiabbas M, Mashayekhan S, Nazari-pouya A, Naji M, Hunkeler D, Rajabi Zeleti S, Sharifiaghdas F, 2014, Chitosan-gelatin sheets as scaffolds for muscle tissue engineering, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 43, 124.
- 11- Jia WT, Luo SH, Zhang CQ, Wang JQ, 2010, In vitro and in vivo efficacies of teicoplanin-loaded calcium sulfate for treatment of chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis, *Antimicrob. Agents Chemo.*, 54.1, 170-176.
- 12- Jia WT, Zhang X, Luo SH, Liu X, Huang WH, Rahaman MN, Day DE, Zhang CO, Xie ZP, Wang JO, 2010, Novel borate glass/chitosan composite as a delivery vehicle for teicoplanin in the treatment of chronic osteomyelitis, *Acta biomaterialia*, 6.3, 812-819.
- 13- Karimian M, Mashayekhan S, Baniasadi H, 2016, Fabrication of porous gelatin-chitosan microcarriers and modeling of process parameters via the RSM method, *Int J Biol Macromol*, 88, 288-95.
- 14- Magdalena GD, Czubenko JO, 2010, The effect of ionic crosslinking on thermal properties of hydrogel chitosan membranes, *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, Polish Chitin Society Lodz, 25-32.
- 15- Malinowska Panczyk E, Staroszczyk H, Gottfried K, Kolodziejska I, Wojtasz-Paj A, 2015, Antimicrobial properties of chitosan solutions, chitosan films and gelatin-chitosan films, *Polimery*, 60, 11, 735-741.
- 16- Mansor BA, Lim JJ, Shameli K, Ibrahim NA, Tay MY, 2011, Synthesis of silver nanoparticles in chitosan, gelatin and chitosan/gelatin bionanocomposites by a chemical reducing agent and their characterization, *Molecules*, 16, 9, 7237-7248.
- 17- Movaffagh J, Ghodsi A, Fazly Bazzaz BBS, Sajadi Tabassi SA, Ghodrati Azadi H, 2013, The Use of Natural Biopolymer of Chitosan as Biodegradable Beads for Local Antibiotic Delivery: Release Studies, *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.*, 8.1, 27.
- 18- Nagarajan M, Benjakul S, Prodpran T, Songtipya P, Kishimura H, 2012, Characteristics and functional properties of gelatin from splendid squid (*Loligo formosana*) skin as affected by extraction temperatures, *Food Hydrocolloids*, 29, 2, 389-397.
- 19- Park JH, Saravanakumar G, Kim K, Kwon IC, 2010, Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 62, 1, 28-41.
- 20- Pasparakis G, Bouropoulos N, 2006, Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads, *Int. J. Pharm.*, 323, 1, 34-42.

- 21- Pierog M, Druzynska MG, Czubenko JO, 2009, Effect of ionic crosslinking agents on swelling behavior of chitosan hydrogel membranes, *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives*, 14, 75-82.
- 22- Ribeiro AJ, Neufeld R J, Arnaud P, Chaumeil JC, 1999, Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres, *Int. J. Pharm.*, 187, 1, 115-123.
- 23- Sriamornsak P, Nunthanid J, Cheewatanakornkool K, Manchun S, 2010, Effect of Drug Loading Method on Drug Content and Drug Release from Calcium Pectinate Gel Beads, *AAPS Pharm Sci Tech*, 11, 3, 1315-1319.
- 24- Suna L, Chen Y, Zhou Y, Guo D, Fana Y, Guo F, Zheng Y, Chen W, Preparation of 5-fluorouracil-loaded chitosan nanoparticles and study of the sustained release in vitro and in vivo, 2017, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12, 5, 418-423.
- 25- Ueng SWN, Lin SS, Wang IC, Yang CY, Cheng RC, Liu SJ, Chan EC, Lai CF, Yuan LJ, Chan SC, 1999, In vitro elution of vancomycin from biodegradable beads, *J. Biomed. Mater. Res.*, 48, 5, 613-620.
- 26- Vasconcellos FC, Goulart GAS, Beppu MM, 2011, Production and characterization of chitosan microparticles containing papain for controlled release applications, *Powder Technol.*, 205, 1, 65-70.
- 27- Wichelhaus TA, Dingeldein E, Rauschmann M, Kluge S, Dieterich R, Schafer V, Brade V, 2001, Elution characteristics of vancomycin, teicoplanin, gentamicin and clindamycin from calcium sulphate beads, *J. Antimicrob. Chemo.*, 48, 1, 117-119.
- 28- Yenice I, Cali S, Kas H, Ozalp M, Ekizoglu M, Hincal A, 2002, Biodegradable implantable teicoplanin beads for the treatment of bone infections, *Int. J. Pharm.*, (242.1, 271-275.
- 29- Zhang X, Jia W, Gu Y, Xiao W, Liu X, Wang D, Zhang C, Huang W, Rahaman, MN, Day DE, Zhou N, 2010, Teicoplanin-loaded borate bioactive glass implants for treating chronic bone infection in a rabbit tibia osteomyelitis model, *Biomaterials*, 31.22, 5865-5874.

## Design and fabrication of injectable teicoplanin-loaded polymeric microcarriers

Tavakoli A.,<sup>1</sup> Mashayekhan S.,<sup>2</sup> Baniasadi H.<sup>3</sup> and Hasanzadeh Z.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Chemical Engineering, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> Dept. of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology Tehran, I.R. of Iran.

<sup>3</sup> Faculty of Petroleum and Chemical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.

<sup>4</sup> Trauma Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. of Iran.

### Abstract

The main goal of this research work is to design and fabricate an injectable biocompatible and biodegradable microcarrier (MC) for drug delivery into cartilages and bones. Suitable MCs composed of chitosan and gelatin were fabricated with syringe pump equipped with high voltage system. The MCs were crosslinked with sodium triphosphate (TPP) and the teicoplanin was loaded onto the samples. The crosslinking of the samples was confirmed using FTIR spectra and their morphology was investigated with SEM images. The results confirmed that the MCs were successfully crosslinked with TPP and spherical shaped samples with desired diameter for injection ( $350\pm 50\ \mu\text{m}$ ) were achieved with flow rate and voltage of  $300\ \mu\text{l}/\text{min}$  and  $8.5\ \text{kV}$ , respectively. A thin layer of chitosan was covered onto the fabricated MCs in order to reduce the drug release rate. The result of release test showed that it was increased from 4 to 5 days for covered samples which is more suitable for the claimed application of fabricated MCs. The antimicrobial test was done on the fabricated teicoplanin-loaded MCs and the obtained results confirmed that the antimicrobial properties of drug were remained even after fabrication process. Overall, the obtained results support that the fabricated MCs have potential for using as drug release devices for treatment of cartilage infections.

**Key words:** Chitosan, Drug delivery, Gelatin, Microcarrier, Teicoplanin