

# تولید هیدروژل‌های تشکیل‌شونده در محل کامپوزیتی کتیرا/هیدروکسی‌آپاتیت بارگذاری شده با داکسی‌سایکلین برای رهایش دارو و بهبود زخم

سارا جانقربان لاریجه و مسلم توکل\*

ایران، یزد، دانشگاه یزد، گروه مهندسی شیمی و پلیمر

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۶

## چکیده

امروزه، هیدروژل‌های تشکیل‌شونده در محل، توجه فزاینده‌ای را در التیام زخم به خود جلب کرده‌اند. در مطالعه حاضر، هیدروژل‌های تشکیل‌شونده در محل کامپوزیتی جدیدی متشکل از کتیرا عامل‌دار شده با تیرامین، ذرات هیدروکسی‌آپاتیت و داکسی‌سایکلین، تولید شد. تشکیل هیدروژل با واکنش اتصال اکسیداتیو بین گروه‌های تیرامینی کتیرا، کاتالیز شده توسط هرس‌رادیسی پراکسیداز/هیدروژن پراکسید، انجام شد. برای محافظت از داکسی‌سایکلین در مقابل واکنش‌های جانبی احتمالی حین فرآیند تشکیل ژل و برای دستیابی به رهایش تأخیری داکسی‌سایکلین از هیدروژل، ابتدا داکسی‌سایکلین در ذرات هیدروکسی‌آپاتیت بارگذاری گردید و سپس ذرات حاوی داکسی‌سایکلین در هیدروژل کپسوله شدند. میزان و بازدهی بارگذاری دارو در ذرات هیدروکسی‌آپاتیت و همچنین زمان ژل شدن، ریخت‌شناسی، تخریب آنزیمی، درجه تورم، سرعت رهایش دارو، سمیت سلولی و خواص ضد میکروبی هیدروژل‌ها بررسی شد. با افزایش غلظت داکسی‌سایکلین در محلول جذب، بازده بارگذاری دارو کاهش و میزان بارگذاری دارو در ذرات افزایش یافت. افزودن ذرات، منجر به افزایش زمان ژل شدن و کاهش اندازه منافذ هیدروژل‌ها شد. در هیدروژل‌های کامپوزیتی حاوی داکسی‌سایکلین، رهایش انفجاری دارو مشاهده نشد و رهایش داکسی‌سایکلین از این هیدروژل‌ها نسبت به رهایش از ذرات کپسوله نشده، کندتر بود. هیدروژل‌های کامپوزیتی حاوی داکسی‌سایکلین، فعالیت ضد میکروبی مناسبی علیه باکتری‌های *اشرشیا کولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند. نتایج آزمون سمیت سلولی، نشان دهنده زیست‌سازگاری مناسب هیدروژل‌ها بود. با توجه به نتایج، به نظر می‌رسد هیدروژل‌های کامپوزیتی تولید شده دارای پتانسیل بالایی برای استفاده در التیام زخم هستند و می‌توانند در آنالیزهای درون‌تنی مورد ارزیابی بیشتر قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: کتیرا، هیدروکسی‌آپاتیت، داکسی‌سایکلین، هیدروژل تشکیل‌شونده در محل، بهبود زخم.

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: m.tavakol@yazd.ac.ir

## مقدمه

مانند ورقه‌های هیدروژلی، فوم‌ها و نانوالیاف برای التیام زخم استفاده شده‌اند (۳، ۱۹، ۳۳). پانسمان‌های نوین دارای شکل پیش ساخته، با وجود داشتن کارایی مناسب‌تر نسبت به نوع سنتی، توانایی پر کردن تمام گودی و بلندی‌های زخم را ندارند (۲). این مسئله موجب افزایش امکان آلودگی میکروبی و تجمع ترشحات عفونی و نبود هم‌افزایی مناسب بین پانسمان و سطح و لبه‌های زخم

روزانه انسان‌های زیادی بدلیل حوادث فیزیکی، سوختگی و بیماری‌های خاص دچار زخم یا آسیب‌های پوستی می‌شوند. هر چند زخم‌های جزئی، بدون کمک عوامل درمانی توسط بدن ترمیم می‌شوند، زخم‌های خاص و بزرگ‌تر برای کاهش زمان بهبود و کاهش عوارض جانبی، نیاز به کمک‌های درمانی دارند. از گذشته تاکنون، پانسمان‌های سنتی مانند گاز و باند پنبه‌ای و انواع نوین‌تر

دارو در میکرو/نانوذرات و کپسوله کردن ذرات حاوی دارو در هیدروژل می‌تواند با ایجاد یک سد مقاومتی جدید در برابر انتقال جرم، موجب محافظت از دارو در زمان تشکیل ژل و کاهش سرعت رهایش آن شود. پیش‌تر توکل و همکاران (۲۹، ۳۰) با پیوندزنی تیرامین (Tyramine) به کتیرا، هیدروژل‌های تشکیل‌شونده در محل شبکه‌ای شده آنزیمی ساختند و آن‌ها را در مهندسی بافت و رهایش دارو ارزیابی کردند (۹، ۲۹، ۳۰). این هیدروژل‌ها، نرم و کشسان بودند و رشد، تکثیر و تمایز سلول‌های مزانشیمی انسانی کپسول شده در آن‌ها به خوبی انجام شد.

در پژوهش حاضر، برای اولین بار هیدروژل تشکیل‌شونده در محل کامپوزیتی متشکل از کتیرا-تیرامین و ذرات هیدروکسی‌آپاتیت (Hydroxyapatite) بارگذاری شده با داکسی‌سایکلین ساخته و با هدف ارزیابی قابلیت آن برای تولید زخم‌پوش، خصوصیت‌سنجی شد. برای جلوگیری از شرکت دارو در واکنش‌های جانبی در فرآیند ژل شدن و ایجاد شرایط رهایش آهسته دارو، ابتدا داکسی‌سایکلین با روش غوطه‌وری در ذرات هیدروکسی‌آپاتیت بارگذاری شد. سپس، ذرات به محلول کتیرا-تیرامین اضافه و آمیزه حاصل برای ساخت هیدروژل با کمک هرس رادیش پراکسیداز، استفاده شد. در ادامه خصوصیات سامانه‌های تولید شده مانند بازده و میزان بارگذاری دارو، رهایش دارو، زمان ژل شدن، درجه تورم، تخریب زیستی، ریخت-شناسی، خواص ضد میکروبی و زیست‌سازگاری آن‌ها بررسی شد.

### مواد و روشها

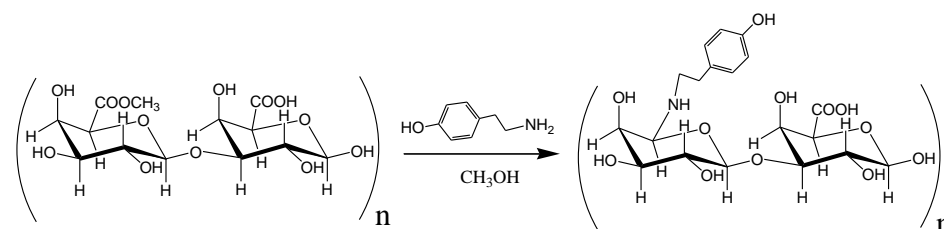
**مواد:** کتیرا تراویده از گون گونه اصفهان (*Astragalus gossypinus*) از بازار ایران خریداری و قبل از استفاده، ناخالصی‌های قابل مشاهده آن جدا و مابقی آلودگی‌ها توسط شستشو با اتانول حذف شد. سپس، کتیرا آسیاب و ذرات با اندازه کوچک‌تر از ۲۰۰ میکرون توسط الک با مش ۷۰ جداسازی و برای آزمون‌ها استفاده شد.

می‌شود. در نتیجه، امکان استفاده از زخم‌پوش بعنوان داربست برای رشد و تکثیر سلول‌های پوستی فراهم نمی‌گردد. بنابراین، راه‌کارهای نوین‌تری مانند پاشش داربست بهمراه سلول به کمک فناوری الکتروریسی، چسب‌های زیستی و هیدروژل‌های تشکیل‌شونده در محل برای کمک به التیام زخم پیشنهاد شده‌اند (۳۱، ۳۶).

هیدروژل‌های تشکیل‌شونده در محل (*In situ forming hydrogels*)، بصورت محلول به محل عارضه تزریق و در آن‌جا بدلیل تغییر در شرایط محیطی مانند دما، pH، قدرت یونی، افزودن مواد شبکه‌ساز یا تابش به هیدروژل تبدیل می‌شوند. از مزیت‌های زخم‌پوش‌های هیدروژلی تشکیل‌شونده در محل، می‌توان به پرکردن حفره‌ها و پستی و بلندی‌های زخم و شکل گرفتن به فرم محیط تزریق، ارتباط موثر با سطح و لبه‌های زخم، ایفای نقش داربست موقت برای همراهی رشد و تکثیر یاخته‌های پوستی و تشکیل بافت و امکان رسانش مواد فعال زیستی و یا سلول‌ها به محل عارضه اشاره کرد (۷، ۲۰). واکنش‌های آنزیمی یکی از راه‌های تشکیل ژل در محل است که در شرایط متعارف بدن و با سرعت زیاد رخ می‌دهد و بدلیل عملکرد اختصاصی آنزیم‌ها، شامل واکنش‌های جانبی کم‌تری است (۷، ۱۸). تاکنون مطالعات زیادی برای تولید این هیدروژل‌ها و ارزیابی آن‌ها در زیست‌پزشکی انجام شده (۱۵) و اخیراً کاربرد آن‌ها برای کمک به التیام زخم مورد توجه قرار گرفته است (۳۳، ۳۶). در بین روش‌های آنزیمی، استفاده از هرس رادیش پراکسیداز (*Horseradish peroxidase*) و هیدروژن پراکسید با قابلیت شبکه‌ای کردن پلیمرهای دارای گروه فنولی، بیشترین سهم پژوهش‌ها را به خود اختصاص داده است (۱۵، ۱۶). با وجود خواص مطلوب هیدروژل‌های شکل‌گیرنده در محل برای التیام زخم، رهایش انفجاری و سریع داروهای کوچک مولکول از هیدروژل‌ها بدلیل تورم بالای آن‌ها و درگیر شدن داروها در واکنش‌های استفاده شده برای تشکیل هیدروژل، یک چالش پیش روی استفاده از هیدروژل‌ها است. بارگذاری

در این روش، واکنش آمینولیزیز (Ammonolysis) با تماس غیر همگن کتیرا با محلول تیرامین در متانول به مدت ۹۶ ساعت انجام شد. پس از این زمان، برای حذف تیرامین واکنش نداده، محصول واکنش با متانول و محلول ۰/۱ مولار اسید کلریدریک در اتانول ۵۰ درجه شسته شد. در ادامه رسوب چندین مرتبه با اتانول مطلق شسته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس خشک شد. شمای کلی واکنش عامل‌داری سازی کتیرا با تیرامین در شکل ۱ نشان داده شده است.

داکسی‌سایکلین هایکلایت (Doxycycline hyclate) و آنزیم هرس‌رادیش‌پراکسیداز از شرکت سیگما آلدریج (آمریکا)، هیدروژن پراکسید از صنایع شیمیایی دکتر مجللی (ایران) و ذرات هیدروکسی‌آپاتیت از شرکت پردیس پژوهش‌فناوران (ایران) خریداری شد. پیوندزنی تیرامین از جایگاه آمینی بر روی گروه‌های متیل استری مونوساکاریدهای موجود در ساختار کتیرا با روش پیشنهادی توکل و همکاران (۳۰) انجام شد. شمای کلی این واکنش در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- شمای کلی واکنش آمینولیزیز ناهمگن برای عامل‌داری سازی کتیرا با تیرامین

اندازه‌گیری زمان ژل شدن با استفاده از آزمون وارونه کردن لوله آزمایش مطابق روش پیشنهادی در مراجع (۳۰) انجام شد.

**بارگذاری دارو در ذرات هیدروکسی‌آپاتیت:** بارگذاری دارو در ذرات هیدروکسی‌آپاتیت با روش غوطه‌وری انجام شد. برای این کار، مقدار معین دارو در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس ۰/۱ گرم از هیدروکسی‌آپاتیت به محلول یاد شده اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق به وسیله شیکر به آرامی هم زده شد. سپس، ذرات با سانتریفیوژ جدا و در آون با دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۴ ساعت خشک شدند. میزان بارگذاری دارو (Drug content) از تقسیم وزن داروی بارگذاری شده بر وزن ذرات بدست آمد (رابطه ۱). هم‌چنین، بازدهی بارگذاری دارو (Drug loading efficiency)، از تقسیم وزن داروی بارگذاری شده بر وزن داروی اولیه حل شده در محلول

**تولید هیدروژل:** ابتدا، برای ساخت محلول کتیرا-تیرامین، مقدار معین کتیرای عامل‌دار به محلول بافر فسفات (pH=۷/۴) اضافه و اجازه داده شد برای آب‌پوشی کامل یک شب هم بخورد. در ادامه برای ساخت هیدروژل، از سرنگ دوتایی مجهز به میکسر (Double Syringe Equipped with a Mixing Chamber (MEDMIX, Switzerland) استفاده شد به این صورت که در یکی از سرنگ‌ها ۷۰۰ میکرولیتر محلول کتیرای عامل‌دار (۳ درصد وزنی-حجمی) و در سرنگ دیگر ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنزیم (۳۰ و ۵۰ کیلو واحد بر لیتر) و ۲۰۰ میکرولیتر محلول هیدروژن پراکسید (۱۵ میلی‌مولار) اضافه شد. با تزریق محلول‌های داخل سرنگ‌ها به داخل ویال و گرماگذاری مخلوط در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، هیدروژل تولید شد. برای تولید هیدروژل حاوی دارو، میکروذرات بارگذاری شده با دارو به محلول کتیرای عامل‌دار اضافه و مابقی مراحل مانند قبل انجام شد.

فرم خطی مدل فروندلیچ بصورت رابطه ۵ بیان شده است:

$$\ln(q_e) = \ln(k_f) + \frac{1}{n} \ln(C_e) \quad \text{رابطه ۵}$$

که در آن  $q_e$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) مقدار جذب شونده بر واحد جرم جاذب و  $C_e$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) غلظت تعادلی ماده جذب شونده است.

### بررسی ویژگی‌های هیدروژل

رفتار تورمی و تخریب هیدروژل: رفتار تورم/تخریب شیمیایی هیدروژل در محلول بافر فسفات ( $\text{pH}=7.4$ ) بررسی شد. هم‌چنین بررسی تورم/تخریب آنزیمی، در محلول آنزیم پکتیناز با غلظت ۱۰۰ کیلو واحد بر لیتر انجام شد. یک میلی‌لیتر از هیدروژل، پس از وزن کردن ( $W_{w0}$ )، به محلول بافر منتقل و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. در بازه‌های زمانی معین، محلول خارج شده و پس از خشک کردن آب سطحی توسط کاغذ صافی، هیدروژل وزن شد ( $W_{wt}$ ). نسبت تغییر وزن در زمان  $t$  با استفاده از رابطه ۶ محاسبه شد (۳۰).

$$SW(t) = \frac{W_{w0}}{W_{wt}} \quad \text{رابطه ۶}$$

مورفولوژی و میزان تخلخل: ریخت‌شناسی و میزان تخلخل هیدروژل‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. ابتدا هیدروژل‌ها با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک و سپس سطح هیدروژل با لایه نازکی از طلا پوشانده شد (۳۴). سطح یاد شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد.

رهايش دارو: برای بررسی رهايش داروی داکسی‌سایکلین، نمونه هیدروژل (یک میلی‌لیتر) در ۴۰ میلی‌لیتر محیط بافر فسفات با  $\text{pH} = 7.4$  درون حمام آب با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد و با حرکت ملایم رفت و برگشتی (سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه) هم زده شد. در زمان‌های معین (۱، ۲، ۳، ۴، ۸، ۲۴ و ... ساعت)، از محیط

بارگذاری بدست آمد (رابطه ۲). برای اندازه‌گیری وزن داروی بارگذاری شده، میزان داروی باقیمانده در محلول با روش طیف‌سنجی نوری مرئی-فرابنفش (UV-Vis Spectrophotometry) (طیف مشخصه ۲۷۴ نانومتر) محاسبه و از میزان داروی اولیه حل شده در محلول بارگذاری کم شد.

$$\text{رابطه ۱} \quad \text{میزان بارگذاری دارو} = \frac{\text{وزن داروی بارگذاری شده}}{\text{وزن ذرات}}$$

$$\text{رابطه ۲} \quad \text{بازده بارگذاری دارو} = \frac{\text{وزن داروی بارگذاری شده}}{\text{وزن داروی اولیه}} \times 100$$

برای بررسی رفتار تعادلی و پیوند بین مولکول‌های دارو و جاذب، غلظت‌های معین داکسی‌سایکلین (۲/۵ - ۰/۱۲۵) گرم بر لیتر) در معرض ذرات هیدروکسی‌آپاتیت قرار گرفت. تمامی آزمون‌ها در دمای ثابت ۲۰ درجه سانتی‌گراد و  $\text{pH}$  محلول برابر ۷ انجام شد. غلظت داروی باقی‌مانده در محلول، مطابق با توضیحات بالا با روش اسپکتروفوتومتری تعیین شد. در نهایت، داده‌های جذب با ایزوترم‌های لانگمویر و فروندلیچ تطبیق داده شد. شکل خطی معادله لانگمویر بصورت زیر است:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{C_e}{q_m} + \frac{1}{k_L q_m} \quad \text{رابطه ۳}$$

در این رابطه،  $C_e$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) غلظت تعادلی ماده جذب شونده،  $q_e$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) مقدار جذب شونده بر واحد جرم جاذب،  $q_m$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) حداکثر ظرفیت جذب تک لایه و  $K_L$  ( $\text{L mg}^{-1}$ ) ثابت لانگمویر است. ویژگی اساسی ایزوترم لانگمویر بر اساس پارامتر تعادلی بدون بعد ( $R_L$ ) بیان شده است.

$$R_L = \frac{1}{1 + k_L C_0} \quad \text{رابطه ۴}$$

با توجه به مقدار  $R_L$  مشخص می‌شود که نوع ایزوترم مطلوب ( $0 < R_L < 1$ )، نامطلوب ( $R_L > 1$ )، خطی ( $R_L = 1$ ) یا غیر قابل برگشت ( $R_L = 0$ ) است.

بارگذاری شده با داکسی‌سایکلین بودند. نمونه‌های هیدروژل، با حجم یک میلی‌لیتر، در ۵ میلی‌لیتر محلول DMEM به مدت ۴۸ ساعت غوطه‌ور شدند و پس از خارج کردن هیدروژل، محلول برای سترون‌سازی از فیلتر با اندازه منافذ ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد. ابتدا سلول‌های فیروبلاست انسانی در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه کشت داده و اجازه داده شد تا سلول‌ها به کف پلیت چسبیده و به حالت پایدار خود در آیند. سپس محیط کشت با عصاره‌ی سترون بدست آمده از غوطه‌وری نمونه‌های هیدروژل در محلول محیط کشت (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) تعویض شد و پلیت‌ها به مدت ۲ روز در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از آن، نمونه‌ها ۲ بار با محلول بافر فسفات شسته شدند. سپس بر روی نمونه‌ها، محلول معرف MTT در محیط کشت اضافه شد. پس از گذشت ۲ ساعت از قرار دادن نمونه‌ها در انکوباتور، محلول دی‌متیل‌سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide (DMSO)) اضافه و پس از چند بار پیپتاژ، جذب نور محلول به دست آمده در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت و با نمونه شاهد مقایسه شد.

**آمار و طراحی آزمایش:** در این پژوهش، آزمایش‌ها با حداقل سه بار تکرار انجام و میانگین داده‌های بدست آمده گزارش شدند. برای مقایسه داده‌ها، از آنالیز واریانس استفاده شد و حد معنی‌داری  $P < 0.05$  مد نظر قرار گرفت. تحلیل آماری نتایج آزمایش‌ها با نرم‌افزار مینی‌تیب ۲۱ (Minitab 21.1) انجام شد.

## نتایج و بحث

آنزیم هرس‌رادیش‌پراکسیداز در حضور هیدروژن پراکسید، با برداشتن اتم هیدروژن هیدروکسیل فنولی در کتیرا-تیرامین، باعث می‌شود جایگاه واکنش‌پذیر رادیکال آزاد بر روی گروه‌های تیرامینی ایجاد شود. در ادامه با تشکیل پیوند غیر اشباع دوگانه بین اتم اکسیژن رادیکال آزاد و

رهاش ۲ میلی‌لیتر محلول برداشته و هم‌زمان ۲ میلی‌لیتر محیط بافری تازه جایگزین شد. غلظت دارو در هر زمان با اندازه‌گیری میزان جذب به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از منحنی کالیبراسیون بدست آمد. در نهایت درصد رهاش جمع‌ی در هر نمونه‌گیری از تقسیم وزن داروی رها شده تا آن زمان بر وزن داروی بارگذاری شده مطابق رابطه ۷ بدست می‌آید.

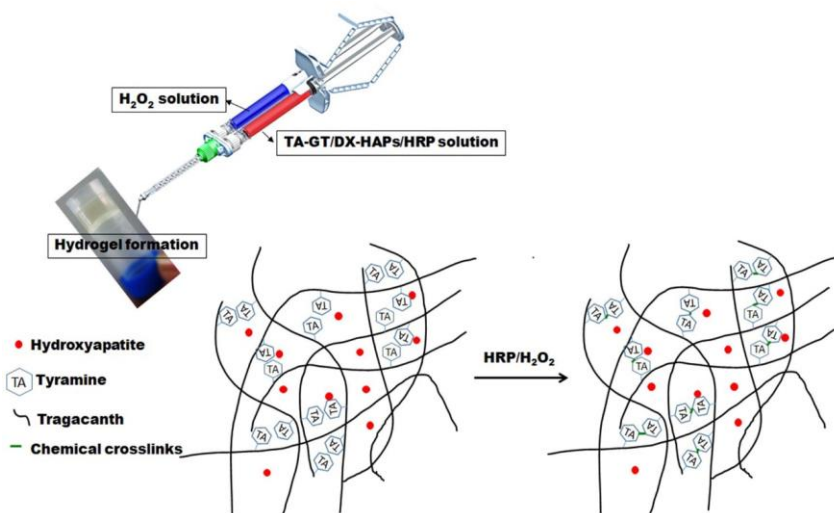
$$\text{رابطه ۷} \quad \text{درصد رهاش جمع‌ی} = \frac{M_t}{M_i} \times 100$$

در رابطه بالا  $M_i$  وزن داروی رها شده تا زمان  $t$  و  $M_t$  وزن داروی بارگذاری شده است.

**خواص ضد میکروبی:** برای بررسی فعالیت ضدباکتری هیدروژل‌ها در برابر باکتری گرم منفی *اشریشیاکولای* (*Escherichia coli (E. coli)*) و باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus (S. aureus)*)، آزمون هاله عدم رشد میکروبی مطابق روش پیشنهادی مراجع (۵، ۱۳) انجام شد. در این آزمون، نمونه کنترل مثبت دیسک آغشته به داروی تتراسایکلین در نظر گرفته شد. برای انجام آزمون، سوسپانسیون باکتری مورد نظر بر روی محیط کشت مولر هیتتون آگار با روش سطحی در پتری دیش کشت داده شد. سپس، در محیط کشت آگار حفره‌هایی با قطر معین ایجاد شد و با تزریق محلول‌های پیش‌ساز، هیدروژل تشکیل شونده در محل در حفره‌ها شکل گرفت. سپس، پتری‌دیش‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد میکروبی ایجاد شده اطراف دیسک، ارزیابی شد.

**سمیت و زیست‌سازگاری:** برای بررسی زنده‌مانی سلول‌ها در برابر هیدروژل‌های ساخته شده از آزمون ام‌تی‌تی (MTT) مطابق روش شرح داده شده در مراجع استفاده شد (۳۵). نمونه‌ها شامل هیدروژل بدون ذرات هیدروکسی آپاتیت و هیدروژل حاوی ذرات هیدروکسی آپاتیت

شدن میکروذرات هیدروکسی‌آپاتیت به محلول پلیمری، میکروذرات حین فرآیند تشکیل ژل، در شبکه پلیمری گیر افتاده و در آن کپسوله شدند. شمای فرآیند تشکیل شبکه هیدروژلی بارگذاری شده با میکروذرات در شکل ۲ آورده شده است.



شکل ۲- شمای کلی فرآیند تشکیل هیدروژل کامپوزیتی کتیرا-ذرات هیدروکسی‌آپاتیت

سوی دیگر، جذب سطحی هیدروژن پراکسید یا آنزیم در هیدروکسی‌آپاتیت و هم‌چنین برهم‌کنش‌های فیزیکی بین هیدروکسی‌آپاتیت و گروه تیرامینی، می‌تواند موجب کاهش سرعت واکنش و چگالی شبکه‌ای شدن شود. مطابق نتایج یک کار پژوهشی (۲۱)، افزودن ذرات کلسیم فسفات (متشکل از هیدروکسی‌آپاتیت و تری‌کلسیم‌فسفات) به محلول پلیمرهای کندروتین سولفات ( Chondroitin sulfate) و ژلاتین پیوند خورده با تیرامین، موجب افزایش زمان ژل شدن هیدروژل تولید شده با کمک هرس‌رادی‌پراکسیداز شده است. در مطالعه دیگری، با افزایش غلظت گالیک اسید بعنوان جاذب رادیکال آزاد، سرعت واکنش و چگالی شبکه‌ای شدن هیدروژل ژلاتین-پروپیونیک اسید (Propionic acid) شبکه‌ای شده با هرس‌رادی‌پراکسیداز کاهش یافته است (۳۱، ۳۷). زمان ژل شدن هیدروژل تشکیل شونده در محل تولید با روش

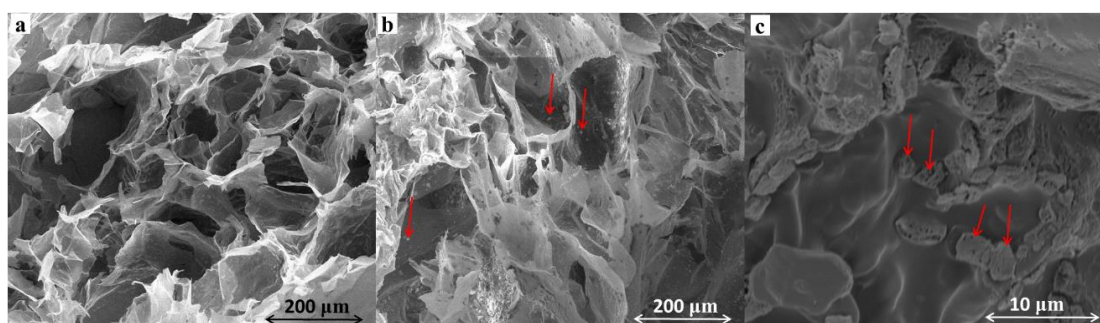
کربن کناری، رادیکال آزاد با یکی از دو اتم کربن دارای موقعیت اورتو ایزومر می‌شود. در نتیجه واکنش بین ساختارهای رادیکالی یاد شده، پیوند کوالانسی و در نتیجه شبکه هیدروژل تشکیل می‌شود (۱، ۸). بنابراین، اختلاط محلول کتیرا-تیرامین با محلول هرس‌رادی‌پراکسیداز و هیدروژن پراکسید منجر به تشکیل هیدروژل شد. با اضافه

زمان ژل شدن یکی از عوامل تأثیرگذار در کاربرد هیدروژل‌های تشکیل شونده در محل است. برای کاربرد بعنوان زخم‌پوش، این زمان باید به گونه‌ای تنظیم شود که پیش از ژل شدن، فرصت کافی برای پر شدن فضای خالی زخم توسط محلول وجود داشته باشد و از طرف دیگر ماده تزریق شده، پیش از پخش شدن در بافت‌های اطراف و از دست رفتن مواد بارگذاری شده ژل شده و به بافت اطراف بچسبد. زمان ژل شدن نمونه‌های هیدروژل تولید شده در این پژوهش، با توجه به غلظت آنزیم، غلظت محلول پلیمری و حضور یا عدم حضور ذرات هیدروکسی‌آپاتیت در محدوده ۱۰۰-۳۰۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. این زمان در حالت حضور ذرات هیدروکسی‌آپاتیت بیشتر از زمان نبود ذرات بود. این مسئله می‌تواند به جذب برخی رادیکال‌های آزاد تشکیل شده توسط ذرات هیدروکسی‌آپاتیت، بعنوان جاذب شناخته شده رادیکال‌های آزاد، نسبت داده شود. از

بنابراین اندازه تخلخل در جلوگیری از آلودگی و در همراهی با سلول‌ها در ترمیم بافت آسیب دیده اهمیت دارد (۴، ۱۰). تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ الکترونی از هیدروژل‌های خشک شده با روش انجمادی در شکل ۳ نشان داده شده است.

آنزیمی از آمیزه فیزیکی هیالورونیک اسید (Hyaluronic acid) -تیرامین و کولاژن-تیرامین بسته به غلظت آنزیم و هیدروژن پراکسید بترتیب در محدوده ۳۰-۶۰ و ۴۰-۳۰۰ و ۳۰ (۹، ۳۰).

**ریخت‌شناسی:** اندازه تخلخل هیدروژل‌ها در نرخ انتقال جرم اکسیژن، دارو و نفوذ میکروبی تأثیرگذار است.



شکل ۳- تصاویر هیدروژل بدون ذرات، a- هیدروژل بدون ذرات، b و c- هیدروژل حاوی ذرات هیدروکسی‌آپاتیت (برخی از ذرات با علامت نشان داده شده‌اند)

افزودن ذرات هیدروکسی‌آپاتیت با نتایج ارائه شده توسط دیگر پژوهشگران همخوانی دارد. مطابق نتایج مطالعه رن و همکاران (۲۳) افزودن میکروذرات هیدروکسی‌آپاتیت به داربست هیدروژلی ساخته شده از پلی‌وینیل‌الکل، موجب کاهش میزان تخلخل و اندازه منافذ هیدروژل شده است.

**رفتار تورمی:** از نقش‌های عمده هیدروژل‌ها در کمک به درمان زخم، می‌توان به تأمین رطوبت مورد نیاز زخم و جذب ترشحات اشاره کرد که به قدرت هیدروژل در جذب آب و بعبارتی رفتار تورمی هیدروژل بستگی دارد. نتایج اندازه‌گیری میزان جذب آب هیدروژل‌ها در بافر فسفات و در محلول پکتیناز در شکل ۴ نشان داده شده است.

با قرار گرفتن هیدروژل در محیط آبی، میزان جذب آب در هیدروژل ابتدا با سرعت زیادی افزایش یافت و سپس روند افزایشی با سرعت محدودی ادامه یافت.

در هیدروژل بدون حضور ذرات، اندازه منافذ در محدوده ۲۰۰-۴۰ و با اندازه متوسط ۷۶ میکرومتر بود. پس از افزودن ذرات هیدروکسی‌آپاتیت، اندازه منافذ به محدوده ۱۷-۱۴۵ با اندازه متوسط ۴۵ میکرومتر کاهش یافت. این مسئله می‌تواند به پر شدن فضاهای خالی توسط میکروذرات و هم‌چنین برهم‌کنش‌های فیزیکی بین میکروذرات و زنجیرهای پلیمری نسبت داده شود. کاهش اندازه منافذ، می‌تواند موجب کاهش نرخ انتقال اکسیژن، دفع مواد سمی و تبادل مواد غذایی شده و در عین حال از نفوذ میکروب‌ها به سطح زخم جلوگیری کند. از سوی دیگر مشخص است که ذرات هیدروکسی‌آپاتیت تقریباً بصورت یکنواخت در هیدروژل پخش شده‌اند، تعداد کمی از آن‌ها کلوخه‌ای شده‌اند و حضور آن‌ها موجب افزایش بهم‌پیوستگی هیدروژل شده است. اندازه و شکل ذرات هیدروکسی‌آپاتیت در هیدروژل، متفاوت بود و اندازه متوسط آن‌ها  $2/11 \pm 0/8$  میکرومتر اندازه‌گیری شد. کاهش اندازه منافذ و افزایش پیوستگی در هیدروژل پس از

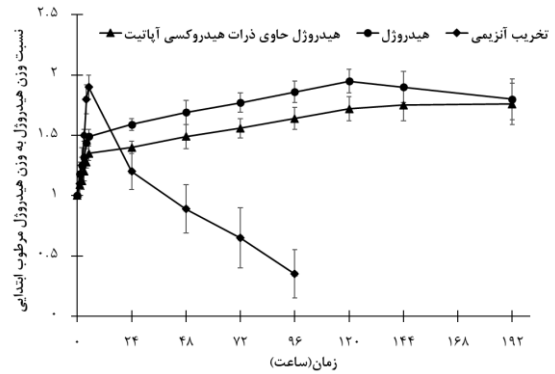
در حضور آنزیم پکتیناز، هیدروژل در ابتدا تورم سریع‌تری را نشان داد و در ادامه تخریب شبکه سرعت بیشتری را نسبت به محیط بدون آنزیم نشان داد. این مسئله می‌تواند نشانه‌ای از تخریب‌پذیری زیستی هیدروژل باشد.

### بارگذاری و رهایش برون‌تنی داکسی‌سایکلین

**بارگذاری داکسی‌سایکلین در میکروذرات هیدروکسی آپاتیت:** در زمان تشکیل هیدروژل، عوامل تشکیل‌دهنده ممکن است با دارو وارد واکنش شده و موجب تخریب یا کاهش اثرات درمانی دارو شوند. در این مطالعه، زمانی که دارو برای بارگذاری در هیدروژل بصورت مستقیم به محلول پلیمری اضافه شد، پس از اضافه کردن آنزیم و هیدروژن پراکسید، رنگ هیدروژل تیره شد. این مسئله نشان‌دهنده انجام نوعی برهمکنش فیزیکی یا واکنش شیمیایی (اکسیداسیون) بین دارو و عوامل تشکیل‌دهنده است. بررسی رفتار نوری داروی آزاد شده از هیدروژل، نیز نشان داد که طول موج مشخصه داروی آزاد شده از هیدروژل با طول موج مشخصه اصلی دارو متفاوت است. این مسئله می‌تواند به اکسیداسیون داکسی‌سایکلین در حضور هیدروژن پراکسید نسبت داده شود که در مراجع به آن اشاره شده است (۶، ۲۷).

از سوی دیگر، با توجه به ساختار آب‌دوست و تورم سریع هیدروژل‌ها، عموماً رهایش داروهای آب‌دوست از هیدروژل‌ها با سرعت بالایی انجام می‌شود. بنابراین، در مطالعه حاضر با هدف حفاظت از دارو در مقابل واکنش‌های شیمیایی جانبی و هم‌چنین کنترل سرعت رهایش دارو از هیدروژل، دارو ابتدا در میکروذرات هیدروکسی‌آپاتیت بارگذاری و سپس میکروذرات حاوی دارو در هیدروژل کپسوله شدند.

در فرآیند غوطه‌وری میکروذرات در محلول داکسی‌سایکلین، بدلیل وجود ریزساختار متخلخل در میکروذرات هیدروکسی‌آپاتیت، جذب دارو در میکروذرات انجام شد. جذب سطحی بر پایه پیوندهای واندروالس

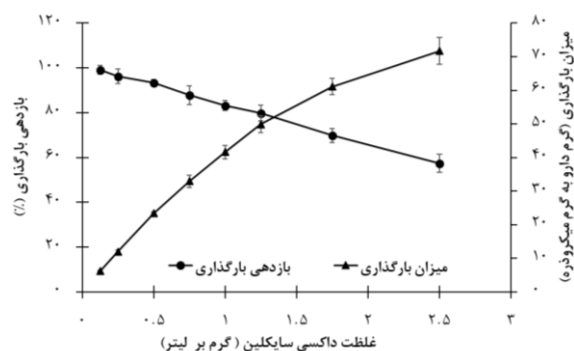


شکل ۴- جذب رطوبت هیدروژل در محلول بافر فسفات و محلول آنزیم پکتیناز

نفوذ آب به داخل هیدروژل و هم‌چنین انتقال جرم دیگر مولکول‌ها بدلیل اختلاف پتانسیل شیمیایی هیدروژل و محیط آبی است و نقاط اتصال عرضی موجود در ساختار هیدروژل، بعنوان عامل جلوگیری از واپاشی هیدروژل و حل شدن زنجیرهای پلیمری عمل می‌کنند (۱، ۱۲). سرعت تورم کمتر هیدروژل حاوی ذرات هیدروکسی‌آپاتیت در مقایسه با هیدروژل بدون ذرات، می‌تواند بدلیل برهمکنش‌های فیزیکی جدید شکل گرفته در شبکه بدلیل حضور گروه‌های هیدروکسیل و فسفات در ساختار هیدروکسی‌آپاتیت باشد. از سوی دیگر، میکروذرات هیدروکسی‌آپاتیت با پر کردن فضاهای خالی موجود در شبکه هیدروژل، موجب کاهش میزان جذب آب در شبکه می‌شوند و هم‌چنین سرعت آسایش زنجیرهای پلیمری را کاهش می‌دهند (۲۵). از سوی دیگر در حضور هیدروکسی‌آپاتیت، چگالی شبکه شیمیایی کاهش می‌یابد. کاهش میزان جذب آب در حضور هیدروکسی‌آپاتیت برآیند پدیده‌های یاد شده است. کاهش درجه تورم هیدروژل شبکه‌ای شده شیمیایی ساخته شده از پلی‌آکریلامید و هم‌چنین هیدروژل تشکیل‌شونده در محل تهیه شده از هیالورونیک اسید پس از بارگذاری میکروذرات هیدروکسی‌آپاتیت در آن‌ها، پیش‌تر در مراجع گزارش شده است (۲۵، ۲۸).

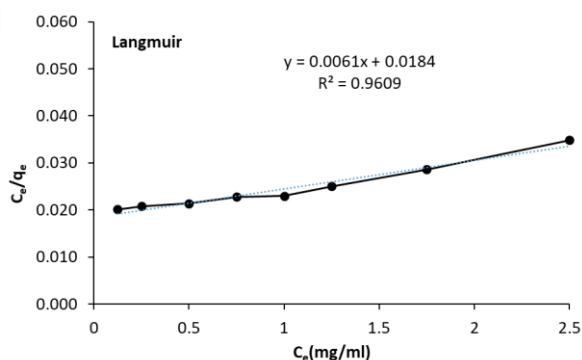
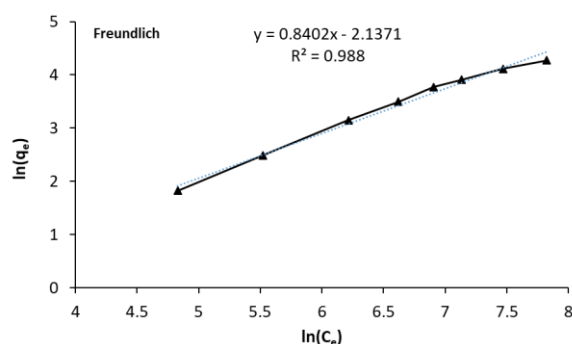
انجام شده و برهمکنش‌های فیزیکی بین گروه‌های هیدروکسیل، کلسیم و فسفات در ساختار میکروذرات با گروه‌های عاملی دارو می‌تواند به میزان جذب کمک نماید. میزان و بازدهی بارگذاری دارو در میکروذرات در شکل ۵ نشان داده شده است.

میزان بارگذاری (گرم دارو به گرم میکروذرات) با افزایش غلظت محلول اولیه از ۰/۱۲۵ تا ۲/۵ گرم بر لیتر، مقدار کمیته ۵ به مقدار بیشینه ۷۰ میلی‌گرم دارو بر گرم ذرات افزایش یافت. افزایش میزان بارگذاری دارو با افزایش غلظت، با روابط ترمودینامیکی تعادل جذب مانند مدل لانگمویر و فروندلیچ و نتایج مطالعات مشابه همخوانی دارد و با افزایش تعداد مولکول‌های داکسی‌سایکلین موجود برای جذب شدن در ذرات و همچنین افزایش نیرو محرکه انتقال جرم ارتباط مستقیم دارد. میزان بارگذاری دارو در مطالعه انجام شده توسط الحبشی و همکاران (۱۱)، ۵۰-۱۲۰ میلی‌گرم دارو بر گرم ذرات هیدروکسی‌آپاتیت گزارش شده است. باید توجه داشت که اندازه، ساختار و خصوصیات ذرات هیدروکسی‌آپاتیت تولیدی با روش‌های مختلف، بر سرعت و میزان داروی جذب شده مؤثر است.



شکل ۵- میزان و بازدهی بارگذاری داکسی‌سایکلین در میکروذرات هیدروکسی‌آپاتیت

در محدوده غلظت مطالعه شده، با افزایش غلظت دارو، میزان بارگذاری دارو افزایش ولی بازدهی بارگذاری دارو کاهش یافت. برای مثال، بازدهی بارگذاری داکسی‌سایکلین با تغییر غلظت محلول اولیه از ۰/۱۲۵ تا ۲/۵ گرم بر لیتر، از مقدار بیشینه ۹۸٪ به مقدار کمیته ۵۷٪ کاهش یافت. کاهش بازدهی بارگذاری دارو با افزایش غلظت آن در



شکل ۶- پرازش داده‌های میزان بارگذاری دارو با مدل لانگمویر و مدل فروندلیچ

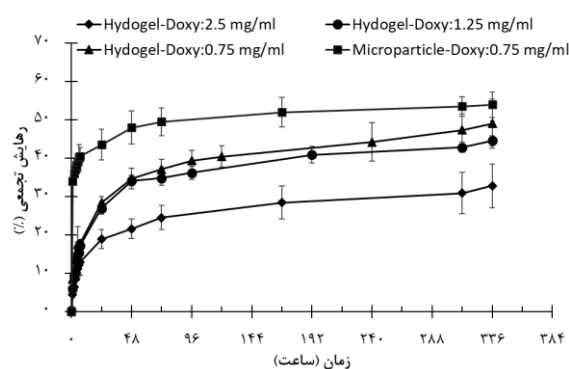
شیمیایی بین محلول داخل و خارج میکروذرات، به داخل محیط رهایش نفوذ می‌کند. در غلظت‌های مطالعه شده برای میکروذرات بارگذاری شده با دارو، بین ۳۰-۴۰٪ از کل داروی بارگذاری شده، در ۴-۸ ساعت اولیه رها و پس از آن سرعت رهایش به شدت کم شد بصورتی که پس از گذشت ۴۸ ساعت، تنها ۴۰-۵۰٪ از کل داروی بارگذاری شده آزاد شد و پس از آن تا ۱۴ روز میزان رهایش تغییر چندانی نکرد. مطابق نتایج مطالعه انجام شده توسط ساریانو سوزا و همکاران (۲۶)، تنها ۲۰٪ از داروی بارگذاری شده در میکروذرات هیدروکسی‌آپاتیت، در مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری در بافر فسفات آزاد شده و همچنین این عدد پس از ۹ روز آزمون رهایش در بافر فسفات به حدود ۴۰٪ رسیده است. این میزان داروی باقیمانده به تمایل بالای این دارو به هیدروکسی‌آپاتیت نسبت داده شده است. همچنین کالیدوس و همکاران (۱۴) میزان رهایش داکسی‌سایکلین بارگذاری شده در نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت پس از ۳ روز گرماگذاری در بافر فسفات را در حدود ۶۵٪ گزارش کرده‌اند.

مطابق شکل ۷، برای ذرات بارگذاری شده با غلظت ۷ g/L ۰/۷۵ داکسی‌سایکلین، در مدت زمان ۲ ساعت نزدیک به ۳۶٪، در مدت زمان ۷ ساعت حدود ۴۰٪، در مدت زمان ۴۸ ساعت حدود ۴۸٪ و در زمان ۷۲ ساعت حدود ۵۱٪ از داروی بارگذاری شده در میکروذرات آزاد شده است. این مسئله در حالی است که پس از بارگذاری این ذرات در هیدروژل، پس از ۲، ۷، ۴۸ و ۷۲ ساعت گرماگذاری بترتیب حدود ۱۰، ۱۷، ۳۴ و ۳۷٪ از دارو آزاد شده است. این داده‌ها بخوبی نقش بارگذاری ذرات در هیدروژل در کاهش رهایش انفجاری و همچنین کنترل سرعت رهایش دارو را نشان می‌دهد.

عموماً رهایش دارو از سامانه حامل دارو به سه عامل نفوذ، اندرکنش دارو با سامانه و سرعت تخریب و فرسایش سامانه بستگی دارد. در صورت پایدار بودن سامانه در

جذب دارو در ذرات هیدروکسی‌آپاتیت با مدل لانگمویر و فرندلیچ برازش شد. نتایج برازش در شکل ۶ نشان داده شده است. رابطه برازش با مدل لانگمویر با ضریب همبستگی ۰/۹۶۰۹ و همچنین رابطه برازش با مدل فرندلیچ با ضریب همبستگی ۰/۹۸۸۰ بدست آمد. مطابق مدل لانگمویر، ظرفیت بیشینه جذب دارو در این ذرات برابر ۱۶۳/۹۳ میلی‌گرم بر گرم و پارامتر تعادلی در محدوده ۱-۰ بود که نشان‌دهنده مطلوب بودن فرآیند جذب است. مدل لانگمویر معمولاً جذب تک لایه در لایه همگن دارای ظرفیت جذب محدود را نشان می‌دهد و مدل فرندلیچ به جذب چند لایه‌ای روی سطوح ناهمگن می‌پردازد. در پژوهش انجام شده توسط وانگ و همکاران (۳۲) گزارش شده که جذب داکسی‌سایکلین روی میکروذرات هیدروکسی‌آپاتیت از مدل فرندلیچ تبعیت می‌کند.

**رهایش برون‌تی دارو از ذرات هیدروکسی‌آپاتیت:**  
نمودار نحوه رهایش از دارو از ذرات و از هیدروژل حاوی میکروذرات بارگذاری شده با دارو، در شکل ۷ نشان داده شده است.

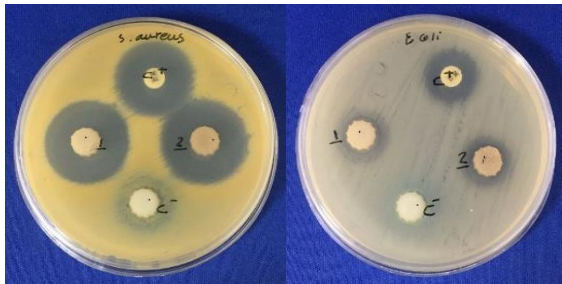


شکل ۷- نحوه رهایش دارو از میکروذرات هیدروکسی‌آپاتیت بارگذاری شده با دارو

با قرار گرفتن میکروذرات بارگذاری شده با دارو یا هیدروژل حاوی میکروذرات بارگذاری شده با دارو در تماس با محیط رهایش، دارو در حلالی که در میکروذرات نفوذ کرده است حل شده و بدلیل اختلاف پتانسیل

نیمی از دارو در ۲۰ ساعت اول رهایش آزاد شده و سپس، حدود ۱۰۰ ساعت طول کشیده است تا نهایتاً ۸۰ درصد از دارو آزاد شود.

**خواص ضد باکتری:** در شکل ۸ اثر ضد باکتریایی هیدروژل، هیدروژل حاوی میکروذرات هیدروکسی‌آپاتیت بارگذاری شده با دارو (غلظت ۰/۷۵ و ۲/۵ گرم بر لیتر) و دیسک حاوی داروی آنتی‌باکتریال بعنوان نمونه کنترل مثبت، بر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری گرم منفی *اشرشیا کولای* نشان داده شده است.



شکل ۸- فعالیت ضدباکتری هیدروژل‌ها: (۱) هیدروژل حاوی ذرات هیدروکسی‌آپاتیت بارگذاری شده با داکسی‌سایکلین با غلظت ۰/۷۵ گرم بر لیتر و (۲) با غلظت ۲/۵ گرم بر لیتر، (۳) هیدروژل و (۴) دیسک غوطه ور شده در تتراسایکلین

در اطراف چاهک مربوط به هیدروژل، که تحت عنوان نمونه کنترل منفی نام‌گذاری شده است، برای هر دو باکتری *اشرشیا کولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* هاله عدم رشد بسیار ضعیفی تشکیل شد. این فعالیت ضد باکتری بسیار ضعیف می‌تواند به رهایش مقدار اندک هیدروژن پراکسید باقی مانده در هیدروژل نسبت داده شود.

این مسئله در حالی است که میزان قطر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* برای نمونه با غلظت داروی ۰/۷۵ گرم بر لیتر برابر ۲۷ میلی‌متر و برای نمونه با غلظت ۲/۵ گرم بر لیتر برابر ۰/۲۸ متر اندازه‌گیری شد. در مقابل برای باکتری *اشرشیا کولای* میزان قطر هاله عدم رشد نمونه با غلظت داروی ۰/۷۵ گرم بر لیتر برابر ۰/۱۱ متر و برای نمونه با غلظت ۲/۵ گرم بر لیتر برابر ۰/۱۲ متر بود.

محیط برون‌تنی، نقش عامل تخریب هیدروژل کم‌تر می‌شود. بنابراین داروهای آب دوست با اندازه کوچک و وزن مولکولی کم می‌توانند از درون حفرات نفوذ کنند و در مدت زمان کم مقدار زیادی از دارو از شبکه خارج شود. در شرایط مطالعه حاضر، آزادسازی دارو از هیدروژل شامل رهایش دارو از ذرات هیدروکسی‌آپاتیت، نفوذ آن در هیدروژل و رهایش از سطح هیدروژل به محیط رهایش است. از سوی دیگر، حضور میکروذرات موجب کاهش درجه تورم هیدروژل و اشغال تخلخل آن می‌شود. این مسئله موجب کاهش سرعت رهایش در مقایسه با ذرات هیدروکسی‌آپاتیت تنها و یا هیدروژل بدون ذرات می‌شود و همچنین می‌تواند از رهایش انفجاری دارو جلوگیری کند. همچنین مشاهده می‌شود که هیدروژل تنها مقدار اندکی از دارو را در ساختار خود نگه داشته و از رهایش آن جلوگیری کرده است.

مقایسه پروفایل رهایش دارو، از هیدروژل‌های حاوی میکروذرات بارگذاری شده با مقادیر مختلف دارو (شکل ۷) نشان داد که در شرایط یکسان و سطح نفوذ ثابت برای رهایش، هرچه میزان داروی داکسی‌سایکلین بارگذاری شده بیشتر باشد، درصد کم‌تری از داروی بارگذاری شده در زمان مشخص آزاد می‌شود و به این ترتیب زمان رهایش طولانی‌تر و درصد داروی بجا مانده در هیدروژل بیشتر است. مقایسه داده‌ها نشان می‌دهد، برای هیدروژل حاوی ذرات هیدروکسی‌آپاتیت بارگذاری شده با غلظت ۰/۷۵ g/L داکسی‌سایکلین، بترتیب ۱۰، ۱۷، ۳۶ و ۴۴٪ از دارو پس از ۲، ۷، ۴۸ و ۲۴۰ ساعت گرماگذاری آزاد شده است. در شرایط مشابه رهایش، برای هیدروژل حاوی ذرات بارگذاری شده با غلظت ۲/۵ g/L داکسی‌سایکلین، پس از ۲، ۷، ۴۸ و ۲۴۰ ساعت از آغاز رهایش، بترتیب حدود ۶، ۱۳، ۲۱ و ۲۹ درصد از داروی بارگذاری شده آزاد شده است. نتایج پژوهش‌های لیانگ و همکاران (۱۷)، نشان داد که آزادسازی داکسی‌سایکلین بارگذاری شده در هیدروژل تشکیل شونده در محل نسبتاً سریع بوده و تقریباً

بیان شده است که حضور داکسی‌سایکلین تا حدی از غلظت بر روی رشد و تکثیر سلول‌ها اثر مثبت داشته و پس از آن موجب کاهش زنده‌مانی سلولی می‌شود. این حد از غلظت با تغییر نوع سلول، منشأ سلول (حیوانی یا انسانی) و طول دوره آزمون زنده‌مانی متفاوت است. در یک کار مطالعاتی، نشان داده شده است که میکروذرات کیتوزان بارگذاری شده با داکسی‌سایکلین بر روی سلول‌های فیبروبلاست انسانی اثر سمیت معنی‌دار ندارند (۲۴). از آنجایی که در مطالعه حاضر، آزمون سمیت با نمونه غوطه‌ور شده با غلظت ۲/۵ گرم بر لیتر انجام شده است، می‌توان نتیجه گرفت استفاده از غلظت‌های پایین‌تر از این دارو موجب ایجاد سمیت معنی‌دار برای سلول‌های فیبروبلاست انسانی نمی‌شود.

### نتیجه‌گیری

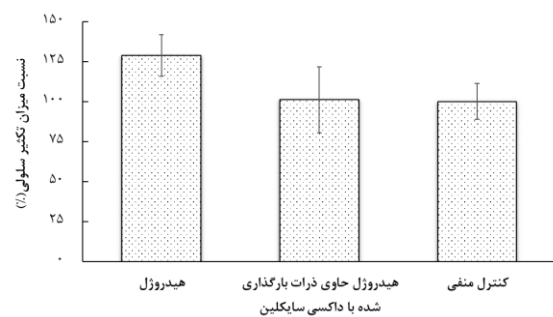
در این مطالعه، با هدف تولید یک هیدروژل درجا تشکیل شونده با خواص ضد باکتری با پتانسیل استفاده در رهایش دارو و التیام زخم، نوعی هیدروژل کامپوزیتی بر پایه کیترا و میکروذرات هیدروکسی‌آپاتیت حاوی داکسی‌سایکلین ساخته شد. کپسول کردن میکروذرات حاوی دارو در هیدروژل، موجب جلوگیری از رهایش انفجاری و کاهش سرعت رهایش دارو از هیدروژل‌ها شد. هیدروژل‌های کامپوزیتی حاوی داکسی‌سایکلین، علاوه بر داشتن زیست‌سازگاری مناسب، خواص ضد باکتری قابل توجهی علیه باکتری‌های *اشرشیا کولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند. با توجه به این نتایج، به نظر می‌رسد هیدروژل‌های کامپوزیتی تولید شده می‌تواند بعنوان یک گزینه دارای پتانسیل بالا برای استفاده در التیام زخم، مورد ارزیابی‌های حیوانی قرار گیرد.

### سپاسگزاری

نویسندگان از حمایت مالی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری از این پژوهش در قالب کد اعتباری ۰۰۴۱۷-۰۰۱-۰۰۳۲-۰۰ قدردانی می‌نمایند.

این مسئله به خوبی نشان دهنده فعالیت ضد باکتریایی هیدروژل‌های بارگذاری شده با دارو در برابر هر دو باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت است و همچنین نشان می‌دهد فعالیت ضد میکروبی هیدروژل یاد شده در مقابل باکتری‌های گرم مثبت بیشتر است.

**سمیت و زیست‌سازگاری:** برای بررسی زیست‌سازگاری هیدروژل‌ها، سلول‌های فیبروبلاست انسانی کشت داده شده در معرض عصاره استخراجی از نمونه‌ها قرار گرفتند. نتایج آزمون سمیت در شکل ۹ آورده شده است.



شکل ۹- زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست انسانی در برابر عصاره استخراجی از نمونه‌های مختلف

نسبت میزان تکثیر سلول‌ها در مقایسه با نمونه شاهد (زنده‌مانی سلولی)، برای نمونه‌های هیدروژل و هیدروژل حاوی ذرات هیدروکسی‌آپاتیت بارگذاری شده با داکسی‌سایکلین برترتیب ۱۲۶/۹ و ۱۰۱/۱ درصد اندازه‌گیری شد. با توجه به نتیجه تحلیل آماری، بین نسبت میزان تکثیر سلولی (زنده‌مانی سلول‌ها) در گروه کنترل و هیدروژل حاوی ذرات هیدروکسی‌آپاتیت بارگذاری شده با داکسی‌سایکلین، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ( $p \leq 0.05$ )، در حالی که این تفاوت بین نمونه هیدروژل و نمونه کنترل معنی‌دار بود. افزایش زیست‌سازگاری در نمونه‌های دارای هیدروژل، می‌تواند بدلیل حضور یا آزاد شدن برخی مونو یا الیگوساکاریدهای موجود در ساختار پلی‌ساکارید باشد که اثر مثبت بر رشد سلول‌ها دارند. در مورد اثر داکسی‌سایکلین بر رشد سلول‌های حیوانی، در برخی پژوهش‌ها

## منابع

- ۱- توکل م.، واشقانی-فراهانی ا.، سلیمانی م.، هاشمی-نجف آبادی س.، حجاری زاده آ. (۱۳۹۸)، تهیه هیدروژل درجا تشکیل شونده آنزیمی از کتیرای اصلاح شده شیمیایی برای مهندسی بافت غضروف. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۳۲: ۲۹۷-۳۱۰.
- ۲- جانقربان لاریچه س.، توکل م.، (۱۴۰۰) مروری بر سامانه‌های تشکیل‌شونده درجا برای التیام زخم. فصلنامه علمی بسپارش، ۱۲: ۳۰-۴۱.
- ۳- میراولیائی م.، چلنگر ر.، امین جعفری ا.، طالبی ا.، غیاث م. (۱۳۹۶) بررسی هیستوپاتولوژی ترمیم زخم‌های عمیق پوستی غیر عفونی با عصاره هیدروالکلی گیاهان مرزه کوهی، بادرنجبویه، سدر، گل ختمی و حنا. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۳۰: ۲۱۲-۲۲۲.
- ۴- نصیرنیا ح.، قلمبران م.، میمندی پور ا.، بیات م.، بررسی امکان رشد سلول‌های استخوانی (Saso-2) روی داربست‌های پوشش دار شده با نانوذرات کیتوزان-آلژینات. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۸: ۴۱۳-۴۱۹.
- 5- Bauer A, (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single diffusion method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45: 493-496.
- 6- Cárdenas Sierra RS, Zúñiga-Benítez H and Peñuela GA, (2022). Photo-assisted removal of doxycycline using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and simulated sunlight: Operational parameters optimization and ecotoxicity assessment. *J. Photochem. Photobiol. A*; 425: 113697.
- 7- Chen J, Zhai Z and Edgar KJ, (2022). Recent advances in polysaccharide-based in situ forming hydrogels. *Curr. Opin. Chem.*, 70: 102200.
- 8- Darr A and Calabro A, (2009). Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 20: 33-44.
- 9- Dehghan-Niri M, Tavakol M, Vasheghani-Farahani E and Ganji F, (2015). Drug release from enzyme-mediated in situ-forming hydrogel based on gum tragacanth-tyramine conjugate. *J. biomater. appl.*, 29: 1343-1350.
- 10- Dehghan-Niri M, Vasheghani-Farahani E, Eslaminejad MB, Tavakol M and Bagheri F, (2020). Physicomechanical, rheological and in vitro cytocompatibility properties of the electron beam irradiated blend hydrogels of tyramine conjugated gum tragacanth and poly (vinyl alcohol). *Mater. Sci. Eng. C*, 114: 111073.
- 11- El-Habashy S, Eltahir H, Gaballah A, Mehanna R and El-Kamel AH, (2021). Biomaterial-Based Nanocomposite for Osteogenic Repurposing of Doxycycline. *Int. J. Nanomed.*, 16: 1103-1126.
- 12- Ganji F, Vasheghani Farahani S and Vasheghani-Farahani E, (2010). Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iran. Polym. J.*, 19: 375-398.
- 13- Hafezi Moghaddam R, Dadfarnia S, Shabani AMH, Moghaddam ZH and Tavakol M, (2019). Electron beam irradiation synthesis of porous and non-porous pectin based hydrogels for a tetracycline drug delivery system. *Mater. Sci. Eng. C*, 102: 391-404.
- 14- Kalidoss M, TS SK, Y R and Doble M, (2017). Combinatorial delivery of antibiotic and anti-inflammatory drugs using calcium deficient hydroxyapatite nanocarriers for the management of bone infections. *Biomater. Tissue Technol.*, 1: 1-5.
- 15- Khanmohammadi M, Dastjerdi MB, Ai A, Ahmadi A, Godarzi A, Rahimi A and Ai J, (2018). Horseradish peroxidase-catalyzed hydrogelation for biomedical applications. *Biomater. Sci.*, 6: 1286-1298.
- 16- Lee F, Bae KH and Kurisawa M, (2016). Injectable hydrogel systems crosslinked by horseradish peroxidase. *Biomed. Mater.*, 11: 014101.
- 17- Liang Y, Zhao X, Hu T, Chen B, Yin Z, Ma PX and Guo B, (2019). Adhesive hemostatic conducting injectable composite hydrogels with sustained drug release and photothermal antibacterial activity to promote full-thickness skin regeneration during wound healing. *Small*, 15: 1900046.
- 18- Moreira Teixeira LS, Feijen J, van Blitterswijk CA, Dijkstra PJ and Karperien M, (2012). Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering. *Biomaterials*, 33: 1281-1290.
- 19- Naseri E and Ahmadi A, (2022). A review on wound dressings: Antimicrobial agents, biomaterials, fabrication techniques, and

- stimuli-responsive drug release. *European Polym. J.*, 173: 111293.
- 20- Nguyen QV, Huynh DP, Park JH and Lee DS, (2015). Injectable polymeric hydrogels for the delivery of therapeutic agents: A review. *Europ. Polym. J.*, 72: 602-619.
- 21- Nguyen TT, Dang LH, Nguyen P, Pham TL-B, Le HK, Nguyen M-T, Nhi TTY, Feng S, Chen J and Tran NQ, (2023). Dual composition chondroitin sulfate and gelatin biomimetic hydrogel based on tyramine crosslinking for tissue regenerative medicine. *Europ. Polym. J.*, 189: 111975.
- 22- Prokopowicz M, Szewczyk A, Skwira A, Sądej R and Walker G, (2020). Biphasic composite of calcium phosphate-based mesoporous silica as a novel bone drug delivery system. *Drug Deliv. Trans. Res.*, 10: 455-470
- 23- Ren B, Chen X, Du S, Ma Y, Chen H, Yuan G, Li J, Xiong D, Tan H, Ling Z, Chen Y, Hu X and Niu X, (2018). Injectable polysaccharide hydrogel embedded with hydroxyapatite and calcium carbonate for drug delivery and bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.*, 118: 1257-1266.
- 24- Seetharaman S, Natesan S, Adhirajan N, T Selvaraj R and Babu M, (2008). Preparation and characterization of chitosan microspheres for doxycycline delivery. *Carbohydr. Polym.*, 73: 201-211.
- 25- Sharika T and Mohanan A, (2021). Synthesis and swelling studies of poly (acrylamide-co-itaconic acid)/hydroxyapatite nanocomposite hydrogels. *Mater. Today: Proc.*, 41: 744-751.
- 26- Soriano-Souza C, Valiense H, Mavropoulos E, Martinez-Zelaya V, Costa AM, Alves AT, Longuinho M, Resende R, Mourão C, Granjeiro J, Rocha-Leao MH, Rossi A and Calasans-Maia M, (2020). Doxycycline containing hydroxyapatite ceramic microspheres as a bone-targeting drug delivery system. *J. Biomed. Mater. Res. B.*, 108: 1351-1362.
- 27- Sunaric SM, Mitic SS, Miletic GZ, Pavlovic AN and Naskovic-Djokic D, (2009). Determination of doxycycline in pharmaceuticals based on its degradation by Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagent in aqueous solution. *J. Anal. Chem.*, 64: 231-237.
- 28- Tan Y, Ma L, Chen X, Ran Y, Tong Q, Tang L and Li X, (2022). Injectable hyaluronic acid/hydroxyapatite composite hydrogels as cell carriers for bone repair. *Int. J. Biol. Macromol.*, 216: 547-557.
- 29- Tavakol M, Vasheghani-Farahani E, Soleimani M, Mohammadifar MA, Hashemi-Najafabadi S and Hafii M, (2014). Synthesis and characterization of an enzyme mediated in situ forming hydrogel based on gum tragacanth for biomedical applications. *Iran. J. Biotech.*, 12: 42-49.
- 30- Tavakol M, Vasheghani-Farahani E, Mohammadifar MA, Soleimani M and Hashemi-Najafabadi S, (2016). Synthesis and characterization of an in situ forming hydrogel using tyramine conjugated high methoxyl gum tragacanth. *J. Biomater. Appl.*, 30: 1016-1025.
- 31- Thi PL, Lee Y, Tran DL, Thi TTH, Kang JI, Park KM and Park KD, (2020). In situ forming and reactive oxygen species-scavenging gelatin hydrogels for enhancing wound healing efficacy. *Acta Biomater.*, 103: 142-152.
- 32- Wang S, Wang X, Xu H, Abe H, Tan Z, Zhao Y, Guo J, Naito M, Ichikawa H and Fukumori Y, (2010). Towards sustained delivery of small molecular drugs using hydroxyapatite microspheres as the vehicle. *Adv. Powder Technol.*, 21: 268-272.
- 33- Wang W, Ummartyotin S and Narain R, (2023). Advances and challenges on hydrogels for wound dressing. *Curr. Opin. Biomed. Eng.*, 26: 100443.
- 34- Xu K, Narayanan K, Lee F, Bae KH, Gao S and Kurisawa M, (2015). Enzyme-mediated hyaluronic acid-tyramine hydrogels for the propagation of human embryonic stem cells in 3D. *Acta Biomater.*, 24: 159-171.
- 35- Yang C, Xu L, Zhou Y, Zhang X, Huang X, Wang M, Han Y, Zhai M, Wei S and Li J, (2010). A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing. *Carbohydr. Polym.*, 82: 1297-1305.
- 36- Yang X, Wang B, Peng D, Nie X, Wang J, Yu C-Y and Wei H, (2022). Hyaluronic Acid-Based Injectable Hydrogels for Wound Dressing and Localized Tumor Therapy: A Review. *Adv. NanoBiomed Res.*, 2: 2200124.
- 37- Zhang D, Chang R, Ren Y, He Y, Guo S, Guan F and Yao M, (2022). Injectable and reactive oxygen species-scavenging gelatin hydrogel promotes neural repair in experimental traumatic brain injury. *Int. J. Biol. Macromol.*, 219: 844-863.

# Preparation of *in situ* forming tragacanth/doxycycline loaded hydroxyapatite composite hydrogels for drug delivery and wound healing

Janghorban-Lariche S. and Tavakol M.

Dept. of Chemical and Polymer Engineering, Yazd University, Yazd, I.R. of Iran

## Abstract

Nowdays, *in situ* forming hydrogels have attracted increasing attentions in wound healing. In the present study, new *in situ* forming composite hydrogels consisted of tyramine functionalized gum tragacanth (TA-GT), hydroxyapatite particles (HAPs) and doxycycline (DX) were prepared. Hydrogel formation was realized via oxidative coupling reaction between tyramine groups of TA-GT, catalyzed by horseradish peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. In order to protect DX from possible side reactions during the gel formation and to achieve sustained release of DX, the drug was first loaded into hydroxyapatite particles and then DX loaded hydroxyapatite particles (DX-HAPs) were encapsulated within the hydrogels. Drug content and drug loading efficiency of HAPs as well as gelation time, morphology, enzymatic degradation, swelling degree, drug release rate, cytotoxicity and antimicrobial properties of the hydrogels were evaluated. According to the results, drug content decreased and drug loading efficiency increased with increasing of DX concentration in adsorption media. The addition of HAPs led to an increase in gelation time and a decrease in the pore size of TA-GT hydrogels. No burst release of DX was observed from the composite hydrogels containing DX-HAPs. Also, drug release rate from these hydrogels was considerably slower than DX-HAPs. The composite hydrogels containing DX-HAPs showed proper antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The results of MTT assay, demonstrated excellent biocompatibility of the hydrogels. These results suggested that the prepared *in situ* forming composite hydrogels hold great potential for wound healing and might be further characterized by *in vivo* tests.

**Key words:** Tragacanth, Hydroxyapatite, Doxycycline, *In-situ* forming hydrogel, Wound healing.