مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۲۴، آبان ۱۴۰۴، ۷۰۸-۶۸۹

طراحی و ارزیابی هیدروژل تزریق‌پذیر ژلاتین/آلژینات حاوی سیپروفلوکساسین برای درمان عفونت‌های واژینال: یک مطالعه آزمایشگاهی

مصطفی بشیری برازنده[۱]، علی گل‌کار[۱]، هادی تابش[۲]، فرح فرزانه[۳]

دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۲/۰۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۴/۰۶/۰۳ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۴/۰۷/۱۴ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۰۷/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: عفونت‌های واژینال از مشکلات شایع در میان زنان هستند که اغلب توسط باکتری‌هایی مانند Escherichia coli و Staphylococcus aureus ایجاد می‌شوند. درمان‌های موضعی رایج محدودیت‌هایی از جمله زمان ماندگاری کوتاه دارو، نیاز به مصرف مکرر و تحریکات موضعی دارند. لذا مطالعه حاضر با هدف طراحی و ارزیابی هیدروژل تزریق‌پذیر ژلاتین/آلژینات حاوی سیپروفلوکساسین برای بهبود درمان این عفونت‌ها انجام شد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه آزمایشگاهی حاضر، هیدروژل‌هایی با غلظت‌های مختلف ژلاتین و آلژینات، همراه با بارگذاری سیپروفلوکساسین تهیه شدند و ویژگی‌های فیزیکی آن‌ها شامل مورفولوژی، درصد تورم و رفتار رئولوژیکی بررسی شد. پروفایل رهایش دارو تحلیل و و فعالیت ضدباکتریایی هیدروژل بهینه در برابر E.coli و S.aureus با تعیین حداقل غلظت مهاری و حداقل دُز کشندگی ارزیابی گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های Shapiro–Wilk، Brown–Forsythe و تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده شد.

یافته‌ها: تحلیل‌های مقایسه‌ای نشان داد که هیدروژل تزریق‌پذیر آلژینات/ژلاتین با نسبت وزنی/حجمی ۶:۶ دارای ساختاری یکنواخت و رهایش کنترل‌شده دارو است و زیست‌سازگاری بالاتری نسبت به سایر فرمولاسیون‌های دارد. آزمون‌های ضدباکتریایی نشان دادند که هیدروژل حاوی سیپروفلوکساسین قادر به مهار رشد هر دو باکتری مورد آزمایش بوده و عملکردی مشابه سیپروفلوکساسین آزاد دارد، در حالی که سمیت آن به‌طور قابل‌توجهی کمتر است (p=۰/۰۱۱۱).

نتیجه‌گیری: فرمولاسیون هیدروژل تزریق‌پذیر ژلاتین/آلژینات می‌تواند یک سامانه دارورسانی مؤثر برای درمان موضعی عفونت‌های واژینال باشد. این سیستم با افزایش زمان ماندگاری دارو در محل، اثربخشی درمان را بهبود می‌بخشد و احتمالاً می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های درمانی رایج باشد.

واژه‌های کلیدی: دارورسانی، سیپروفلوکساسین، هیدروژل تزریق‌پذیر، ژلاتین، آلژینات، عفونت واژینال

ارجاع: بشیری برازنده م، گل‌کار ع، تابش ه، فرزانه ف. طراحی و ارزیابی هیدروژل تزریق‌پذیر ژلاتین/آلژینات حاوی سیپروفلوکساسین برای درمان عفونت‌های واژینال: یک مطالعه آزمایشگاهی. *مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان*، سال ۱۴۰۴، دوره ۲۴، شماره ۸، صفحات: ۷۰۸-۶۴۹.

۱- کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی علوم زیستی، دانشکدگان علوم و فناوری‌های میان رشته‌ای، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲- دانشیار، دانشکده مهندسی علوم زیستی، دانشکدگان علوم و فناوری‌های میان رشته‌ای، دانشگاه تهران، تهران، ایران
(نویسنده مسئول) تلفن: ۰۹۰۲۲۴۰۲۲۵۰، پست الکترونیکی: hadi.tabesh@ut.ac.ir
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات پیشگیری از بیماری‌های زنان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

مقدمه

عفونت‌های واژینال یکی از مشکلات شایع بهداشتی در بین زنان در سراسر جهان هستند که ممکن است منجر به ناراحتی، ترشح، سوزش و در صورت عدم درمان، عوارض جدی‌تری در سلامت باروری شوند. این عفونت‌ها می‌توانند منشأ باکتریایی، قارچی یا انگلی داشته باشند که در این میان، عوامل باکتریایی از شایع‌ترین علل به شمار می‌روند (۲، ۱). درمان‌های رایج برای عفونت‌های باکتریایی واژینال معمولاً شامل تجویز موضعی آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت کرم، شیاف یا ژل هستند (۶-۳). اگرچه این روش‌ها می‌توانند مؤثر باشند، اما با محدودیت‌هایی از جمله زمان نگه‌داری کوتاه در محل، نیاز به مصرف مکرر و چسبندگی ضعیف به مخاط واژن مواجه هستند. علاوه بر این، درمان‌های موضعی متداول ممکن است منجر به عوارضی مانند تحریک، سوزش و بر هم خوردن تعادل فلور طبیعی واژن شوند که احتمال بازگشت عفونت را افزایش می‌دهد (۷). سیپروفلوکساسین یک آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف از گروه فلوروکینولون‌ها است که اثربخشی بالایی در برابر بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارد. این دارو با مهار آنزیم‌های DNA gyrase و topoisomerase IV که برای همانندسازی DNA باکتری ضروری هستند، عمل می‌کند (۱۰-۸)، در حالی‌که سیپروفلوکساسین به‌طور گسترده‌ای در درمان سیستمیک استفاده می‌شود، کاربرد موضعی آن در عفونت‌های واژینال کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. رساندن هدف‌مند این دارو به محل عفونت می‌تواند اثربخشی آن را افزایش داده، عوارض جانبی سیستمیک را کاهش داده و پذیرش درمان توسط بیمار را بهبود بخشد (۱۴-۱۱). برای غلبه بر مشکلات درمان‌های مرسوم، استفاده از هیدروژل‌های موکوچسبنده، به ویژه آن‌هایی که از پلیمرهای طبیعی مانند ژلاتین و آلژینات تهیه شده‌اند، مورد توجه قرار گرفته است (۱۵، ۱۶). این هیدروژل‌ها به دلیل زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و خاصیت چسبندگی به مخاط، گزینه‌ای مناسب برای افزایش زمان ماندگاری سیپروفلوکساسین در محل عفونت محسوب می‌شوند. ژلاتین محیط مناسبی برای بارگذاری و آزادسازی دارو فراهم می‌کند و آلژینات که یک پلی‌ساکارید استخراج شده از جلبک دریایی است، در حضور یون‌های کلسیم قابلیت ژل‌شدن مطلوبی دارد و پایداری ساختاری و چسبندگی به مخاط واژن را افزایش می‌دهد. در این مطالعه از دو نوع باکتری اشریشیا کلی (E.coli) و استافیلوکوکوس اورئوس (S.aureus) استفاده شده است که از عوامل شایع در عفونت‌های واژینال به شمار می‌روند. E.coli یک باکتری گرم منفی است که به دلیل توانایی چسبندگی به سلول‌های اپیتلیال، نقش مهمی در عفونت‌های مجاری ادراری و واژن دارد (۱۸، ۱۷). S.aureus یک باکتری گرم مثبت است که به علت ویژگی‌های بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، می‌تواند منجر به عفونت‌های موضعی و سیستمیک متنوعی شود (۲۰، ۱۹).

هدف این مطالعه تعیین اثر سیپروفلوکساسین بارگذاری شده در هیدروژل تزریق‌پذیر موکوچسبنده ژلاتین/آلژینات برای درمان عفونت‌های واژینال می‌باشد. با افزایش زمان ماندگاری دارو و بهبود تماس آن با بافت مخاطی، این فرمولاسیون می‌تواند به عنوان یک گزینه درمانی مؤثر و قابل قبول برای بیماران مورد استفاده قرار گیرد.

CCBY-NC.4.0 DEED

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع آزمایشگاهی بوده و در بازه زمانی بهمن‌ماه ۱۴۰۲ تا اسفندماه ۱۴۰۳، در دانشکدگان علوم و فناوری‌های میان‌رشته‌ای دانشگاه تهران و مرکز تحقیقات پیشگیری از بیماری‌های زنان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است این مطالعه دارای کد اخلاق از دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به شماره ثبت IR.SBMU.RETECH.REC.1402.704 می‌باشد.

ژلاتین، آلژینات، کلسیم گلوکونات، سیپروفلوکساسین، بافر سالین فسفات (Phosphate-Buffered Saline, PBS)، کیت آزمون (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)، محیط کشت (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)، سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum, FBS)، تریپسین و محیط کشت مولر-هینتون (Mueller-Hinton, MH) از شرکت سیگما-آلدریچ تهیه شدند. تمام مواد شیمیایی بدون تصفیه بیشتر استفاده شدند. برای تمام آزمایش‌ها از آب با گرید Milli-Q استفاده شد.

محلول نمک کلسیم گلوکانات و پلیمرهای ژلاتین و آلژینات به نسبت (۱:۱) حاوی سیپروفلوکساسین بر اساس مقادیر مشخص شده مطابق جدول ۱ تهیه شد. جهت انجام فرآیند ژلی‌شدن، مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول حاوی ژلاتین، آلژینات و سیپروفلوکساسین به داخل میکروتیوب منتقل شده و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول نمک کلسیم گلوکانات به آن افزوده شد. بلافاصله پس از این مرحله، میکروتیوب روی ورتکس قرار گرفت و به مدت ۲ دقیقه مخلوط گردید تا فرآیند شبکه‌ای شدن و تشکیل هیدروژل به طور یکنواخت انجام شود. با اندکی تغییرات در درصد پلیمرها، پروتکل تهیه هیدروژل مطابق با روش گزارش‌شده توسط Distler و همکاران اجرا شد (۲۱).

جدول ۱- درصدهای ساخته شده از هیدروژل و دارو (۲۱)

نام نمونه	درصد آلژینات (وزنی/حجمی)	درصد ژلاتین (وزنی/حجمی)	درصد کلسیم گلوکانات (وزنی/حجمی)	سیپروفلوکساسین (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)
H-1	۴	۴	۱/۵	۰/۵
H-2	۶	۶	۱/۵	۰/۵
H-3	۸	۸	۱/۵	۰/۵

برای ارزیابی خواص مکانیکی و رفتار رئولوژیکی هیدروژل‌های H-1، H-2 و H-3 جهت بررسی تزریق‌پذیری، آزمون نرخ جریان (Flow Rate Sweep) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه رئومتر با مشخصات دستگاه (MCR 300، Anton Paar، استرالیا) انجام گرفت. آزمون نرخ جریان به‌منظور بررسی تغییرات ویسکوزیته نسبت به نرخ برشی، در بازه‌ای از ۰/۰۱ تا ۱۰۰ در واحد (s^{-1}) انجام گرفت (۲۲).

به‌منظور بررسی مورفولوژی سطحی و ساختار ریز داخلی هیدروژل‌های H-1، H-2 و H-3 از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) با مشخصات دستگاه (MIRA3، TESCAN، جمهوری چک) استفاده شد. این تکنیک

CCBY-NC.4.0 DEED

تصویربرداری با وضوح بالا، مشاهده دقیق ساختار متخلخل، و ویژگی‌های سطحی نمونه‌ها را امکان می‌سازد. تصویربرداری در ولتاژ شتاب‌دهنده ۲۰ کیلوولت انجام شد که این ولتاژ برای بهبود کنتراست و وضوح تصویر در نمونه‌های پلیمری بسیار مناسب است (۲۳).

برای بررسی ساختار شیمیایی نمونه‌ها، آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) با مشخصات دستگاه (Perkin Elmer، Thermo Scientific، آمریکا) انجام شد. نمونه‌های جامد شامل آلژینات، ژلاتین، سیپروفلوکساسین و هیدروژل بهینه ابتدا به‌طور کامل در دمای محیط خشک شدند. سپس مقدار مناسبی از هر نمونه با پتاسیم برمید خشک (KBr) آسیاب شده و قرص KBr به روش فشاری تهیه گردید. طیف‌های FT-IR در محدوده عدد موج ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ با دقت تفکیک عدد موج ۱ سانتی‌متر معکوس ثبت شدند (۲۴).

برای ارزیابی میزان جذب آب و رفتار تورمی هیدروژل‌های H-1، H-2 و H-3، آزمایش تورم در شرایط کنترل شده انجام شد. در این راستا، نمونه‌ها ابتدا با استفاده از دستگاه خشکایش انجمادی یا فریز درایر با مشخصات دستگاه (Alpha 1-2 LDplus، Martin Christ، آلمان) خشک شده و به‌صورت متوالی سه بار توزین شدند تا میانگین وزن خشک آن‌ها به‌دست آید. سپس، نمونه‌های خشک شده در چاهک‌های ۱۲ خانه‌ای حاوی محلول بافر فسفات سالین، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در بازه‌های زمانی ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۳، ۶ و ۲۴ ساعت غوطه‌ور شدند. پس از پایان هر بازه زمانی، نمونه‌ها به‌آرامی از محلول خارج شده و سطح آن‌ها با کاغذ صافی (Whatman, Grade 1) به‌نرمی خشک گردید و وزن مرطوب (Mw) آن‌ها اندازه‌گیری شد. در نهایت مطابق با معادله ۱ میزان تورم هیدروژل‌ها بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید (۲۵).

معادله ۱) $$\text{درصد تورم} = \frac{\text{وزن خشک} - \text{وزن خیس}}{\text{وزن خشک}} * ۱۰۰$$

سیپروفلوکساسین یک داروی آب‌دوست است که این ویژگی، فرایند تهیه منحنی کالیبراسیون آن را تسهیل می‌کند. برای این منظور، منحنی کالیبراسیون با استفاده از بافر فسفات سالین (PBS) به‌عنوان حلال تهیه شد. ابتدا، محلول استوک سیپروفلوکساسین با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آماده گردید. سپس، با رقیق‌سازی محلول استوک، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف شامل ۱، ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. میزان جذب نوری این محلول‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش-مرئی در طول موج جذب مشخصه سیپروفلوکساسین یعنی ۲۷۱ نانومتر اندازه‌گیری شد. داده‌های به‌دست آمده برای ترسیم منحنی کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفتند که به‌عنوان مرجعی برای تعیین کمیت سیپروفلوکساسین در مطالعات رهایش دارو در مراحل بعدی به کار گرفته شد (۲۶).

برای بررسی رهایش سیپروفلوکساسین، هیدروژل‌های H-1، H-2 و H-3 حاوی ۷۰۰ میکروگرم دارو در ۳ میلی‌لیتر ژل تهیه شدند. این ژل‌ها در کیسه‌های دیالیز قرار داده و محکم بسته شدند، سپس در ۲۵ میلی‌لیتر بافر PBS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در زمان‌های مشخص ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۳، ۶ و ۲۴ ساعت، ۱ میلی‌لیتر از محلول رهایش برداشته شد و با حجم مساوی از محلول بافر فسفات سالین تازه جایگزین شد تا حجم ثابت در سیستم رهاسازی حفظ شود و جذب آن‌ها در طول موج ۲۷۱ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر فرابنفش مرئی اندازه‌گیری شد. غلظت دارو با استفاده از منحنی کالیبراسیون

CCBY-NC.4.0 DEED

تعیین شد و درصد رهایش با استفاده از معادله ۲ محاسبه گردید (۲۷).

معادله ۲) $$\text{درصد رهایش دارو} = \frac{\text{مقدار دارو آزاد شده}}{\text{مقدار اولیه دارو هیدروژل}} * ۱۰۰$$

برای ارزیابی فعالیت آنتی‌باکتریال سیپروفلوکساسین و هیدروژل بارگذاری‌شده با سیپروفلوکساسین (H-2)، از روش رقت سریال به همراه تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) بر علیه سویه‌های باکتری‌های Escherichia coli و Staphylococcus aureus استفاده شد. در ابتدا، سوسپانسیون باکتری‌های E.coli و S.aureus با غلظت نهایی ۱×۱۰^{۵} عداد کلنی در میلی‌لیتر (CFU/Ml) در محیط کشت مولر-هینتون براث (MHB) تهیه گردید. سیپروفلوکساسین در غلظت پایه تهیه و سپس به‌صورت رقت‌های سریالی با غلظت‌های ۱۸/۷۵، ۹/۳۷، ۴/۶۸، ۲/۳۴، ۱/۱۷، ۰/۵۸، ۰/۲۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر آماده شد. برای بررسی هیدروژل بارگذاری‌شده با سیپروفلوکساسین (H-2)، مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از هیدروژل حاوی ۱۰۰ میکروگرم سیپروفلوکساسین با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در یک ترنس‌ول حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط مولر–هینتون قرار داده شد. این سیستم به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور شیکر (BST-100، بهسان تجهیز، ایران) انکوبه گردید تا فرآیند رهایش دارو انجام شود. پس از استخراج، غلظت سیپروفلوکساسین در محیط به ۸۳/۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید. سپس این محلول استخراج شده به‌صورت رقت‌های سریالی به غلظت‌های ۱۸/۷۵، ۹/۳۷، ۴/۶۸، ۲/۳۴، ۱/۱۷، ۰/۵۸، ۰/۲۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. هر یک از این غلظت‌ها برای سیپروفلوکساسین خالص و عصاره هیدروژل همراه با سوسپانسیون باکتریایی در دو تکرار به چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه استریل اضافه شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، رشد باکتری به صورت چشمی مشخص گردید، حداقل غلظت مهاری (MIC) پایین‌ترین غلظتی است که در آن رشد باکتری قابل مشاهده نیست. برای تعیین حداقل دُز کشنده باکتری‌ها (MBC)، از چاهک‌هایی که رشد مشاهده نشد، ۱۰ میکرولیتر روی محیط آگار مولر-هینتون کشت داده شد و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. MBC به‌عنوان پایین‌ترین غلظتی در نظر گرفته شد که در آن هیچ رشد کلنی مشاهده نشد (۲۸).

در این مطالعه، رده سلولی HDF (فیبروبلاست پوستی انسانی) برای ارزیابی زیست‌سازگاری و اثرات زنده ماندنی سلولی برای سیپروفلوکساسین و هیدروژل‌های بارگذاری شده با سیپروفلوکساسین در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت. این رده سلولی برگرفته از فیبروبلاست‌های پوست انسان و متعلق به بافت اپیدرمی از مؤسسه تحقیقات ژن ایران تهیه شد. سلول‌های HDF در فلاسک‌های کشت سلولی حاوی محیط RPMI-1640 با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد پنی سیلین-استرپتومایسین کشت داده شدند. کشت سلولی تحت شرایط استریل در یک انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن (CO_2) و ۹۵ درصد رطوبت نسبی نگه‌داری شد تا شرایط بهینه برای رشد و تکثیر سلول فراهم شود (۲۹).

در این مطالعه از سلول‌های فیبروبلاست پوستی انسان (HDF) در پاساژ سوم استفاده شد. پس از تریپسینه‌کردن و سانتریفیوژ با دستگاه (MF 20-R، Awel، فرانسه)، سلول‌ها در محیط کشت کامل بازسوسپانسیون شدند تا یک سوسپانسیون سلولی همگن به

CCBY-NC.4.0 DEED

دست آید. غلظت سلولی از طریق رقیق‌سازی سریال و شمارش دستی با استفاده از هموسیتومتر تعیین گردید. برای ارزیابی سمیت سلولی سیپروفلوکساسین در حالت محلول، حدود ۶۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای در حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت کشت داده شدند. برای بررسی سیپروفلوکساسین بارگذاری‌شده در هیدروژل، حدود ۱۵۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه‌ای در حجم ۱ میلی‌لیتر محیط کشت داده شدند. در هر دو نوع آزمایش، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر مرطوب حاوی ۵ درصد کربن دی اکسید (CO_2) انکوبه شدند تا سلول‌ها به کف چاهک متصل شده و پیش از شروع آزمون، مورفولوژی مناسبی ایجاد شود. تمامی سلول‌ها در فاز رشد لگاریتمی قرار داشتند که با تکثیر فعال و فعالیت متابولیکی بالا همراه است و شرایط ایده‌آلی برای آزمون‌های سمیت سلولی فراهم می‌آورد، زیرا پاسخ سلول‌ها به شرایط آزمایشی دقیق‌تر و قابل اعتمادتر خواهد بود (۳۰).

برای بررسی سمیت سلولی و زیست‌سازگاری سیپروفلوکساسین و هیدروژل‌های بارگذاری شده با سیپروفلوکساسین شامل فرمولاسیون‌های H-1، H-2 و H-3، از آزمون رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. این آزمون بر پایه سنجش فعالیت متابولیکی سلول‌ها به‌عنوان شاخصی از زنده‌مانی، تکثیر و سمیت سلولی انجام می‌شود. در این روش، نمک رنگ زرد MTT توسط آنزیم‌های میتوکندریایی سلول‌های زنده احیاء شده و به کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تبدیل می‌شود. سلول‌های فیبروبلاست پوستی انسانی در پلیت‌های کشت سلولی، کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند تا شرایط لازم برای اتصال و سازگاری سلول‌ها فراهم گردد. در ادامه محیط کشت قدیمی هر چاهک حذف شد و با ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سیپروفلوکساسین با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعویض شدند و در ادامه غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، و ۰/۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیپروفلوکساسین تحت رقت‌سازی سریالی تهیه شدند و سلول‌ها تحت این غلظت‌ها تیمار شدند. همچنین برای بررسی اثرات سیتوتوکسیک هیدروژل‌های H-1، H-2 و H-3، محیط کشت قدیمی چاهک‌ها کشیده شدند و یک میلی‌لیتر محیط کشت جدید به هر چاهک اضافه شده و در ادامه به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر ژل حاوی ۲۳/۳۳ میکروگرم سیپروفلوکساسین اضافه شد. سلول‌های بدون تیمار به‌عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شدند. تیمار سلول‌ها به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت و در شرایط استاندارد انکوباسیون انجام شد. پس از پایان دوره تیمار، به هر چاهک از پلیت حاوی سیپروفلوکساسین ۱۵ میکرولیتر و برای هر چاهک از پلیت ژل حاوی سیپروفلوکساسین، ۳۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه شدند تا از تجزیه نوری رنگ جلوگیری شود. پس از انکوباسیون، محیط کشت به‌آرامی حذف گردید و دی‌متیل‌سولفوکسید برای انحلال کامل کریستال‌های فورمازان به هر خانه اضافه شد. برای اطمینان از انحلال کامل، پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر پلیت با مشخصات (HLB501، Behsan، ایران) قرار گرفتند. در نهایت، جذب نوری هر خانه در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانشگر الایزا (ELx800، BioTek Instruments، آمریکا) اندازه‌گیری شد. درصد زنده‌مانی سلولی بر اساس مقادیر جذب نوری و با استفاده از معادله ۳ محاسبه گردید. این آزمایش به‌منظور اطمینان از دقت و قابلیت تکرار، سه بار تکرار شد (۳۱).

CCBY-NC.4.0 DEED

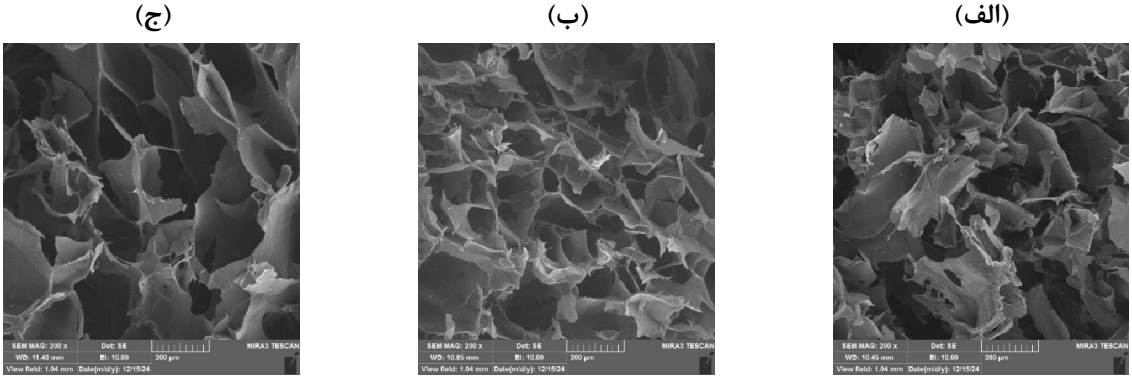
معادله ۳) $\text{درصد زندمانی سلول} = \frac{\text{جذب گروه‌های تیمار شده}}{\text{جذب گروه کنترل}} * ۱۰۰$

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۱، ۴، ۱۰ انجام شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro–Wilk و همگنی واریانس گروه‌ها با آزمون Brown–Forsythe بررسی گردید. نتایج هر دو آزمون در تمامی گروه‌ها مقدار P>۰/۰۵ را نشان دادند که بیانگر توزیع نرمال داده‌ها و همگنی واریانس‌ها است. برای مقایسه میانگین گروه‌ها، از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد و سطح معنی‌دار در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

مطابق شکل ۱، تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی-گسیل میدانی (FE-SEM) از هیدروژل‌های H-1، H-2 و H-3 شبکه متخلخل و به‌هم‌پیوسته را نشان می‌دهند که برای کاربردهای زیستی مانند جذب مایعات، تبادل مواد مغذی و دارورسانی بسیار مطلوب است. مورفولوژی منافذ تحت تأثیر نسبت آلژینات به ژلاتین قرار داشته و ارتباط مستقیم بین ترکیب فرمولاسیون و ساختار نهایی هیدروژل را نشان می‌دهد. هیدروژل H-1 به دلیل سطح پایین‌تر اتصال عرضی، ساختاری نامنظم‌تر و شکننده‌تر داشت و توزیع منافذ در آن یکنواخت نبود. در مقابل، H-2 و H-3 ساختارهای منظم‌تر و پایدارتر از خود نشان دادند. به‌ویژه H-2 دارای منافذ یکنواخت و متصل به هم بود که بیانگر یکپارچگی ساختاری و پایداری مکانیکی بالاتر آن است. در مجموع، هیدروژل H-2 به‌عنوان فرمول بهینه معرفی می‌شود، چرا که ترکیب متعادل و ساختار منافذ مناسب‌تری را نسبت به سایر نمونه‌ها ارائه داد. اگرچه H-3 نیز ساختاری نسبتاً منظم داشت، اما از نظر یکنواختی و کیفیت سطحی، عملکرد H-2 برتر بود.

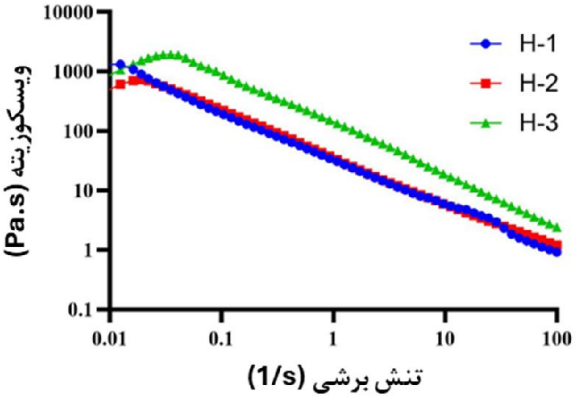


شکل ۱- تصاویر FE-SEM از هیدوژل‌های الف) H-1 ب) H-2 ج) H-3

مطابق نمودار ۱، آزمون نرخ جریان (Flow rate) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور ارزیابی رفتار رئولوژیکی و قابلیت تزریق‌پذیری هیدروژل‌ها در شرایط نزدیک به دمای اتاق انجام شد. این آزمایش به‌ویژه برای کاربردهای تزریقی که نیاز به ویسکوزیته کنترل‌شده دارند، اهمیت دارد. بر اساس نتایج نمودار، ویسکوزیته هیدروژل‌ها با افزایش تنش برشی کاهش می‌یابد؛ این رفتار مشخصه سیستم‌های روان شوندگی برشی (Shear-thinning) است که در آن ماده در حالت سکون، ویسکوز باقی می‌ماند، اما در

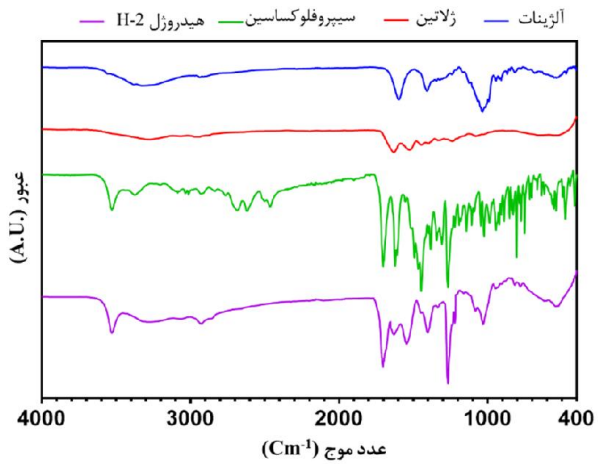
CCBY-NC.4.0 DEED

هنگام اعمال نیرو مثل فشار تزریق روان‌تر می‌شود. چنین ویژگی‌ای برای فرمولاسیون‌های تزریقی ایده‌آل بوده و تضمین می‌کند که هیدروژل با سهولت از طریق سرنگ یا سوزن عبور می‌کند، در عین حال پس از تزریق، شکل و پایداری خود را حفظ کند. علاوه بر این، مقایسه رفتار سه فرمولاسیون نشان داد که هیدروژل‌های H-1 و H-2 الگوی رئولوژیکی مشابهی دارند و از ویسکوزیته پایین‌تر و پایدارتر برخوردارند که می‌تواند ناشی از تعادل بهتر در نسبت آلژینات به ژلاتین و سطح اتصال عرضی مناسب باشد. در مقابل، هیدروژل H-3 به دلیل افزایش غلظت هر دو پلیمر، ویسکوزیته بالاتری از خود نشان داد. این افزایش ویسکوزیته می‌تواند فرآیند تزریق را دشوارتر کند و نشان‌دهنده محدودیت‌های استفاده از غلظت‌های بالاتر مواد در طراحی فرمولاسیون‌های تزریقی است.



نمودار ۱- آزمون تزریق پذیری از هیدروژل‌های H-1، H-2 و H-3

مطابق نمودار ۲.Error! Reference source not found، طیف‌های FT-IR مربوط به آلژینات، ژلاتین، سیپروفلوکساسین و هیدروژل H-2 نمایش داده شده‌اند. در طیف سیپروفلوکساسین، باندهای مشخصی در عدد موج‌های ۳۵۲۷، ۱۷۰۲، ۱۲۶۹ و ۱۰۲۹ مشاهده می‌شود که به ترتیب نشان‌دهنده ارتعاش کششی گروه هیدروکسیل، گروه کربونیل موجود در کربوکسیلیک اسید، ارتعاش خمشی گروه هیدروکسیل و پیوند کربن-فلوئور است (۳۲). حضور این باندها در طیف هیدروژل H-2 تأییدکننده قرارگیری موفقیت‌آمیز دارو در ساختار هیدروژل می‌باشد. در طیف آلژینات، باندهایی در حدود عدد موج ۱۶۰۰ و ۱۴۱۵ مشاهده می‌شود که به ترتیب مربوط به ارتعاش کششی نامتقارن و متقارن گروه‌های کربوکسیلات هستند. هم‌چنین، طیف ژلاتین دارای باندهای مشخصی در حوالی ۱۶۵۰ و ۱۵۴۰ است که به ترتیب مربوط به ارتعاش کششی پیوند کربن-اکسیژن و ارتعاش خمشی گروه آمین می‌باشند (۳۳). مشاهده این باندها در طیف هیدروژل H-2 نشان‌دهنده مشارکت مؤثر آلژینات و ژلاتین در تشکیل ساختار سه‌جزئی هیدروژل و برهم‌کنش میان‌مولکولی میان اجزای آن است.

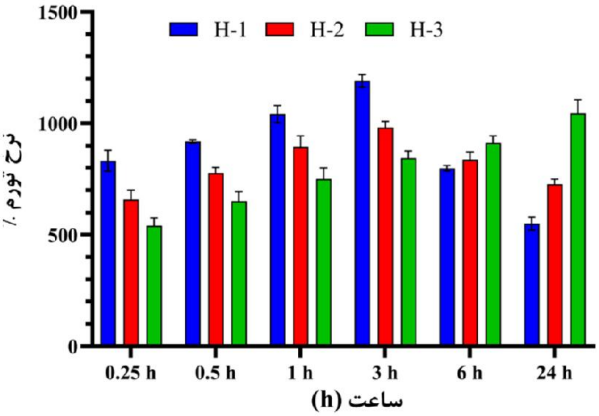


نمودار ۲- طیف FT-IR مربوط به آلژینات، ژلاتین، سیپروفلوکساسین و هیدروژل H-2 جهت بررسی گروه‌های عاملی

پروفایل تورم هیدروژل‌های H-1، H-2 و H-3 که به ترتیب با غلظت‌های افزایشی از پلیمر آلژینات:ژلاتین (به نسبت وزنی ۱:۱) برابر با ۴ درصد، ۶ درصد و ۸ درصد تهیه شده‌اند، طی یک دوره ۲۴ ساعته بررسی شدند. مطابق شکل ۲، تمامی نمونه‌ها با ۱ درصد

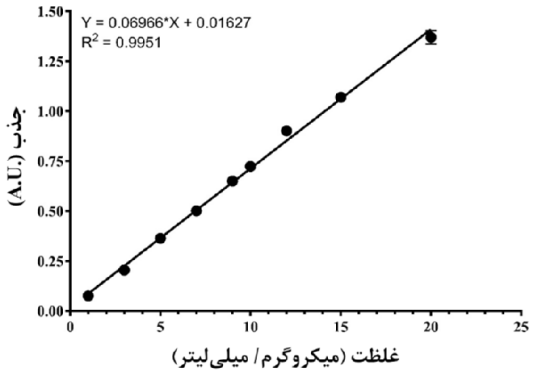
CCBY-NC.4.0 DEED

کلسیم گلوکونات به‌عنوان عامل اتصال عرضی، به‌صورت یکنواخت کراس‌لینک شدند. هیدروژل H-1 در سه ساعت ابتدایی بیشترین میزان تورم را از خود نشان داد که این موضوع می‌تواند به غلظت پایین‌تر پلیمر و ساختار شبکه‌ای بازتر آن نسبت داده شود که امکان جذب سریع آب را فراهم می‌کند. با این حال، این ساختار ضعیف باعث کاهش پایداری مکانیکی و کاهش قابل‌توجه تورم در زمان‌های بعدی شد. در مقابل، هیدروژل H-3 به دلیل ماتریس پلیمری متراکم‌تر، کمترین تورم اولیه را نشان داد اما به تدریج میزان تورم آن افزایش یافت و در ۲۴ ساعت به حداکثر خود رسید. هیدروژل H-2 رفتار تورمی متعادل و پایدار از خود نشان داد، به‌گونه‌ای که تورم اولیه متوسط و ظرفیت نگه‌داری آب پایدار در طول زمان را ارائه داد. این موضوع نشان می‌دهد که غلظت میانی پلیمر در هیدروژل H-2، چگالی شبکه‌ای بهینه‌ای فراهم نموده که هم جذب سریع آب و هم پایداری ساختاری را تضمین می‌کند. بنابراین، H-2 دارای مطلوب‌ترین ویژگی‌های تورمی برای کاربردهای پزشکی است که در آن‌ها نیاز به جذب سریع و نگه‌داری بلندمدت آب وجود دارد. هم‌چنین، این نتایج با تحلیل‌های رئولوژی و میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM) نیز سازگار بوده و این تطابق بین داده‌های ساختاری و عملکردی، اعتبار یافته‌های مربوط به H-2 را تقویت می‌کند.



شکل ۲- پروفایل تورم هیدروژل‌های H-1، H-2 و H-3

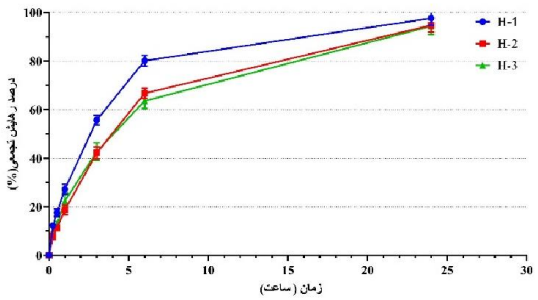
مطابق نمودار ۳، منحنی کالیبراسیون سیپروفلوکساسین با ترسیم جذب نوری در برابر غلظت و تحلیل رگرسیون خطی تهیه شد که منجر به معادله Y = ۰/۰۶۹۶۶ × X + ۰/۰۱۶۲۷ با ضریب همبستگی R^2=۰/۹۹۵۱ گردید. این نتایج نشان‌دهنده خطی بودن، صحت و تکرارپذیری بالای روش هستند. معادله به‌دست آمده برای محاسبه درصد رهایش دارو از هیدروژل آلژینات-ژلاتین در طول زمان استفاده شد و اطلاعات دقیقی از رفتار آزادسازی کنترل شده سیپروفلوکساسین ارائه داد که کارایی و قابلیت استفاده این سامانه در دارورسانی هدف‌مند را تأیید کرد.



نمودار ۳- منحنی کالیبراسیون سیپروفلوکساسین در بافر فسفات سالین

CCBY-NC.4.0 DEED

مطابق نمودار ۴.Error! Reference source not found، رهایش برون‌تنی سیپروفلوکساسین از هیدروژل‌های H-1، H-2 و H-3 طی مدت ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. همه فرمول‌ها در ساعات اولیه، الگوی رهایش انفجاری (Burst release) را نشان دادند، به‌طوری که بیش از ۶۰ درصد دارو طی ۶ ساعت اول آزاد شد. این مرحله سریع، احتمالاً ناشی از آزاد شدن داروی جذب‌شده سطحی یا به‌صورت سطحی آمیخته شده در ماتریس هیدروژل است. پس از این مرحله، روند رهایش به شکلی تدریجی‌تر و پایدارتر ادامه یافت و یک پروفایل کنترل‌شده تا پایان ۲۴ ساعت حفظ شد. در نهایت، تقریباً تمامی سیپروفلوکساسین بارگذاری‌شده، به میزان نزدیک به ۱۰۰ درصد از هیدروژل‌ها آزاد گردید که نشان‌دهنده کارایی مناسب این سیستم‌ها در تحویل دارو است. مقایسه بین فرمول‌ها نشان داد که هیدروژل H-1 دارای رهایش سریع‌تری است که به میزان کمتر اتصال عرضی نسبت داده می‌شود. این اتصال عرضی کمتر، باعث نفوذپذیری بیشتر ژل و در نتیجه، رهایش دارو را تسریع می‌کند. در مقابل، هیدروژل‌های H-2 و H-3 الگوی رهایشی مشابهی داشتند و تفاوت معنی‌داری در میزان رهایش نهایی یا سرعت آن نشان ندادند که نشان‌دهنده دست‌یابی به سطح بهینه‌ای از اتصال عرضی در فرمولاسیون H-2 است. افزودن بیشتر آلژینات در هیدروژل H-3 تغییری در سینتیک رهایش ایجاد نکرد که نشان می‌دهد افزایش اتصال عرضی در این مرحله تأثیر چشم‌گیری بر پروفایل رهایش ندارد. در مجموع، هیدروژل H-2 به عنوان گزینه بهینه شناخته شد، زیرا توانست بین رهایش اولیه سریع و آزادسازی کنترل شده در بلندمدت، تعادل مطلوبی برقرار کند. این نتایج اهمیت تنظیم ترکیب و میزان اتصال عرضی در طراحی سیستم‌های هیدروژل برای دارورسانی مؤثر را برجسته می‌کند.



نمودار ۴- رهایش سیپروفلوکساسین از هیدروژل‌های H-1، H-2 و H-3

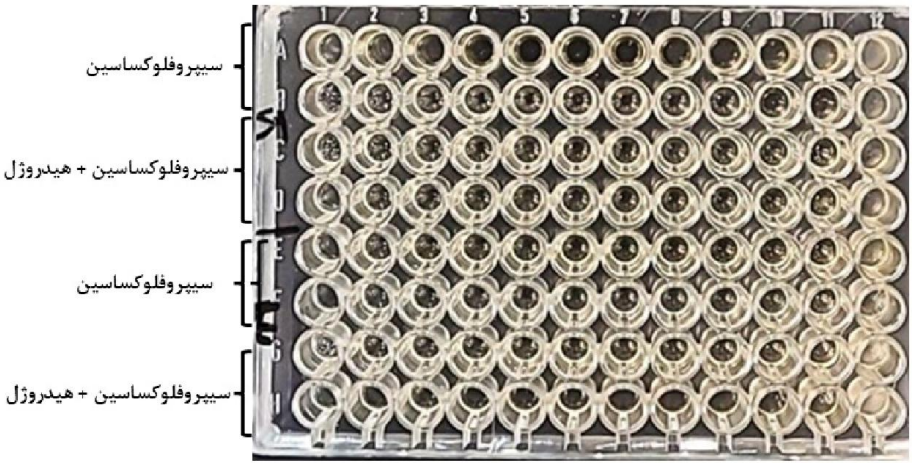
مطابق جدول ۲ و شکل ۳ نتایج حاصل از بررسی‌های آنتی‌باکتریال نشان داد که برای سیپروفلوکساسین خالص، حداقل غلظت مهارکننده رشد باکتری (MIC) برای باکتری E.coli کمتر از ۰/۲۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری S.aureus کمتر از ۲/۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. این نتایج نشان دهنده قدرت بالای مهارکنندگی سیپروفلوکساسین در برابر هر دو سویه باکتریایی مورد مطالعه است. در مورد هیدروژل بارگذاری شده با سیپروفلوکساسین H-2، پس از استخراج دارو و انجام رقت سریالی، MIC برای E.coli همچنان کمتر از ۰/۲۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر باقی ماند. این مسئله حاکی از آن است که بارگذاری دارو در سیستم هیدروژلی نه تنها اثربخشی آن را در برابر این سویه کاهش نداده، بلکه توانسته رهایش کنترل‌شده‌ای را فراهم آورد که همچنان موجب مهار کامل رشد باکتری شود. این موضوع بیانگر پتانسیل بالای این سیستم برای کاربردهای درمانی در برابر باکتری‌های گرم منفی مانند E.coli می‌باشد که در واقع شکل ۴ نشان دهنده‌ی حداقل دز کشندگی می‌باشد تأیید کننده این موضوع است. از سوی دیگر، MIC به‌دست‌آمده برای S.aureus در نمونه‌ی حاوی هیدروژل بارگذاری شده برابر با ۴/۶۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که در مقایسه با داروی خالص افزایش داشته است.

CCBY-NC.4.0 DEED

این کاهش اثربخشی احتمالاً ناشی از فرآیند رهایش تدریجی دارو از داخل ماتریکس هیدروژل، برهم‌کنش‌های فیزیکوشیمیایی بین دارو و اجزای شبکه هیدروژلی، و یا نفوذپذیری پایین‌تر دارو در محیط کشت می‌باشد. با این حال، همین مقدار نیز توانسته به طور قابل توجهی رشد باکتری گرم مثبت S.aureus را مهار نماید که نشان‌دهنده اثرگذاری قابل قبول سیستم دارورسانی است. به طور کلی، این نتایج نشان می‌دهند که ترکیب هیدروژل و سیپروفلوکساسین می‌تواند به عنوان یک سیستم دارورسانی مؤثر با ویژگی رهایش کنترل شده، برای کاربردهای درمانی در برابر طیف وسیعی از باکتری‌ها مورد استفاده قرار گیرد. هیدروژل به عنوان یک بستر نگه‌دارنده، امکان آزادسازی تدریجی دارو را فراهم می‌کند که می‌تواند در درمان‌های بلندمدت و کاهش دفعات مصرف دارو مفید واقع شود. هم‌چنین، این سیستم می‌تواند به کاهش سمیت سیستمیک، افزایش پایداری دارو، و بهبود هدف‌مندی در محل عفونت کمک نماید. در نتیجه، استفاده از هیدروژل بارگذاری‌شده با سیپروفلوکساسین به عنوان یک سامانه نوین دارورسانی می‌تواند رویکردی مؤثر در کنترل و درمان عفونت‌های باکتریایی واژینال، به ویژه در شرایطی که نیاز به رهایش تدریجی دارو و حفظ غلظت مؤثر در طول زمان وجود دارد، فراهم آورد.

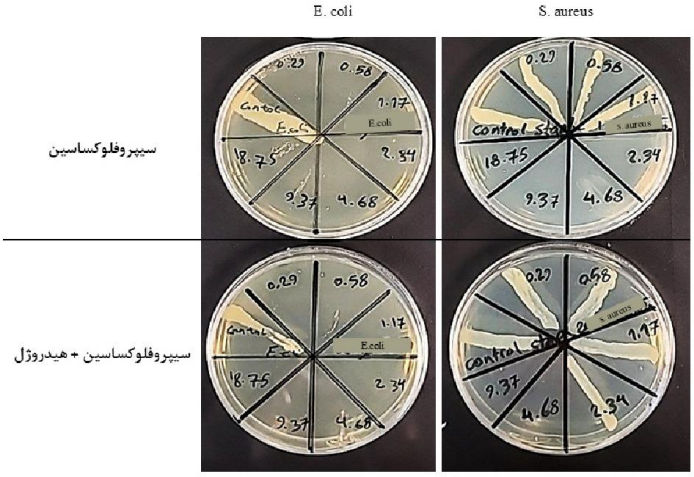
جدول ۲- نتایج تست حداقل دز کشنده باکتری‌ها MBC از سیپروفلوکساسین و هیدروژل H-2

نام نمونه	Escherichia coli	S.aureus
سیپروفلوکساسین	کمتر از ۰,۲۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۲,۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر
سیپروفلوکساسین + هیدروژل	کمتر از ۰,۲۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۴,۶۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر



شکل ۳- تصاویر تست حداقل غلظت مهاری باکتری‌ها MIC از سیپروفلاکسسین و هیدروژل H-2

CCBY-NC.4.0 DEED

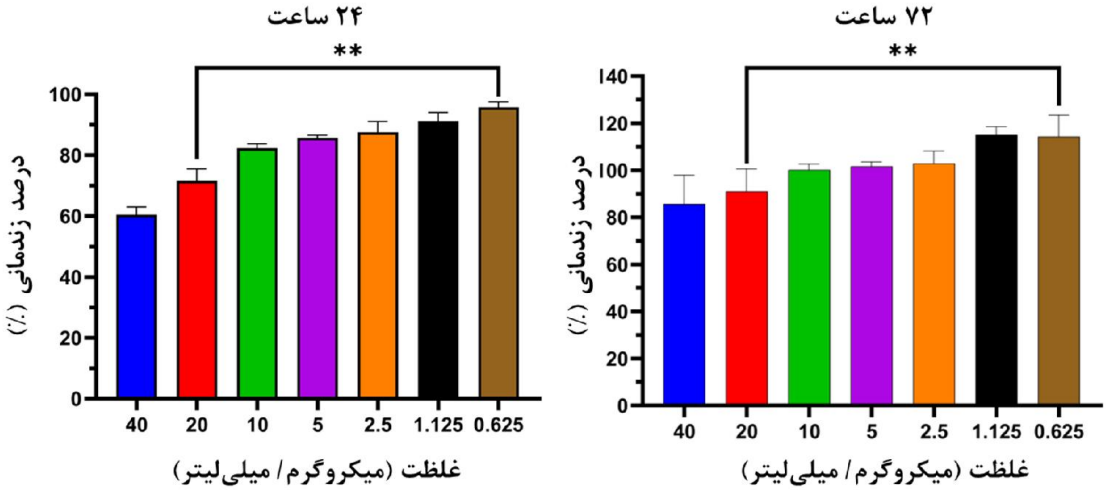


شکل ۴- تصاویر تست حداقل دز کشنده باکتری‌ها MBC/از سیپروفلوکساسین و هیدروژل H-2

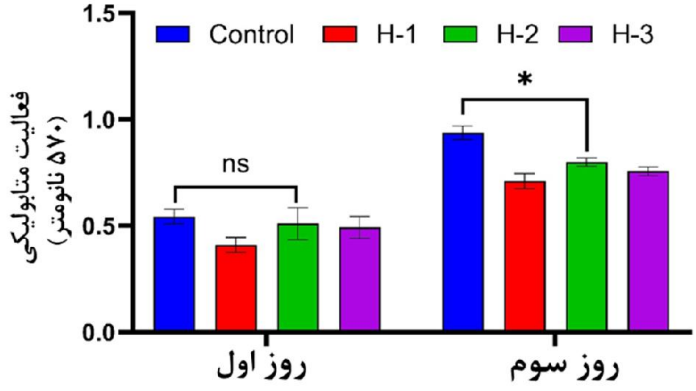
برای ارزیابی سمیت سلولی سیپروفلوکساسین بر سلول‌های فیبروبلاست پوستی انسانی (HDF)، آزمون MTT در بازه‌ای از غلظت‌ها، از ۴۰ تا ۰/۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، با استفاده از رقیق‌سازی سریالی در دو بازه زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت انجام شد. همان‌طور که در نمودار ۵ نشان داده شده است، میزان زنده‌مانی سلول‌ها وابسته به غلظت دارو کاهش یافت. در ۲۴ ساعت اول در بالاترین غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، زنده‌مانی سلولی به حدود ۶۰ درصد کاهش یافت که نشان‌دهنده اثر سمی دارو بر سلول‌ها بود. با این حال، در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر که برابر با مقدار تقریبی سیپروفلوکساسین در فرمولاسیون‌های هیدروژلی H-1، H-2 و H-3 است، درصد زنده‌مانی سلولی در ۲۴ ساعت اول به حدود ۷۱ درصد افزایش یافت. با کاهش بیشتر غلظت دارو به کمتر از ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، زنده‌مانی سلولی به تدریج افزایش یافت و در غلظت ۰/۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بیش از ۹۰ درصد رسید. تحلیل آماری نیز افزایش معنی‌دار زنده‌مانی سلولی با کاهش غلظت را نشان داد و این موضوع کاهش سمیت دارو در دوزهای پایین‌تر را تأیید می‌کند. هم‌چنین، آزمون MTT در ۷۲ ساعت نشان داد پس از گذشت زمان در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر زندمانی سلولی از ۷۱ درصد به ۹۰ درصد افزایش پیدا کرد. با توجه به این‌که غلظت سیپروفلوکساسین در فرمولاسیون‌های H-1، H-2 و H-3 در حدود ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است، این نتایج نشان می‌دهند که این فرمولاسیون‌ها در محدوده قابل قبول برای سلول‌های انسانی قرار دارند و از نظر زیست‌سازگاری مناسب هستند. هم‌چنین، مطابق نمودار ۶ برای بررسی بیشتر فعالیت سلولی، فعالیت متابولیکی سلول‌ها در تماس با هیدروژل‌های مختلف در روز اول و روز سوم مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی با استفاده از اندازه‌گیری چگالی نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر انجام شد. در روز اول، تمام گروه‌های هیدروژل فعالیت متابولیکی پایین‌تری نسبت به گروه کنترل نشان دادند. این کاهش احتمالاً به دلیل آزادسازی سریع اولیه سیپروفلوکساسین از هیدروژل‌ها و بروز سمیت گذرا بوده است. با این وجود، لازم به ذکر است که در روز اول، تمام گروه‌های هیدروژل فعالیت متابولیکی پایین‌تری نسبت به گروه کنترل نشان دادند. این کاهش احتمالاً به دلیل آزادسازی سریع اولیه

CCBY-NC.4.0 DEED

سیپروفلوکساسین از هیدروژل‌ها و بروز سمیت گذرا بوده است. در میان فرمولاسیون‌ها، هیدروژل H-1 دارای کمترین مقدار چگالی نوری بود که می‌تواند به دلیل ویژگی‌های ساختاری و رفتار تورمی این فرمولاسیون و در نتیجه آزادسازی سریع‌تر دارو باشد. در روز سوم، فعالیت متابولیکی در تمامی گروه‌های تیمار شده با هیدروژل نسبت به روز اول افزایش یافت که نشان‌دهنده رشد و تکثیر سلولی در طول زمان و جبران اثرات اولیه سمی می‌باشد. در میان آن‌ها، هیدروژل H-2 بیشترین افزایش را در میزان فعالیت متابولیکی نشان داد و مقدار چگالی نوری آن به مقدار گروه کنترل بسیار نزدیک شد. این بازیابی قابل توجه نشان می‌دهد که هیدروژل H-2 تعاملات سلولی مناسبی را پس از فاز آزادسازی اولیه دارو فراهم می‌کند. به طور کلی، یافته‌ها نشان می‌دهند که تمامی هیدروژل‌های بارگذاری‌شده با سیپروفلوکساسین از نظر زیستی ایمن و سازگار هستند و برای کاربردهای زیست‌پزشکی مناسب می‌باشند. با این حال، هیدروژل H-2 به دلیل تعادل مطلوب میان آزادسازی مؤثر دارو و سمیت سلولی کمتر، به عنوان گزینه‌ای بسیار امیدوارکننده برای کاربرد در سامانه‌های دارورسانی مخاطی، مانند درمان عفونت‌های باکتریایی واژینال، مطرح است؛ جایی که آزادسازی پایدار و زیست‌سازگاری نقش کلیدی دارند.



نمودار ۵- مقایسه درصد زنده‌مانی سلول‌های HDF در معرض سیپروفلوکساسین: نتایج ۲۴ و ۷۲ ساعته



نمودار ۶- ارزیابی سازگاری زیستی و فعالیت متابولیکی داربست‌های هیدروژلی بارگذاری‌شده با سیپروفلوکساسین

CCBY-NC.4.0 DEED

بحث

در این مطالعه، یک سامانه دارورسانی موضعی بر پایه هیدروژل تزریق پذیر موکوچسبنده ژلاتین/آلژینات طراحی و برای بارگذاری و رهایش کنترل‌شده آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین با هدف درمان عفونت‌های باکتریایی واژینال مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی ویژگی‌های فیزیکی و ساختاری هیدروژل‌ها نشان داد که فرمولاسیون H-2 دارای ساختار متخلخل یکنواخت‌تری نسبت به سایر فرمولاسیون‌ها بوده که این ویژگی نقش کلیدی در جذب مایعات و آزادسازی تدریجی دارو دارد.

نتایج رئولوژیکی حاکی از ویسکوزیته مناسب H-2 برای کاربرد موضعی و تزریقی است که امکان استفاده آسان و پخش یکنواخت در محل واژینال را فراهم می‌کند. آزمون تورم نیز رفتار تورمی متعادلی را برای این فرمولاسیون نشان داد که از تخریب زودهنگام ساختار هیدروژل و آزادسازی سریع دارو جلوگیری می‌کند و در نتیجه باعث بهبود کنترل بر فرآیند رهایش دارو می‌شود. در بررسی رهایش برون‌تنی دارو، فرمولاسیون H-2 توانست دارو را به‌صورت تدریجی و کنترل‌شده آزاد نماید؛ این موضوع در درمان عفونت‌های واژینال حائز اهمیت است، زیرا می‌تواند اثربخشی درمان را افزایش داده و از بروز مقاومت باکتریایی ناشی از دوزهای بالای اولیه جلوگیری نماید.

هم‌چنین، نتایج تست‌های آنتی‌باکتریال نشان دادند که سیپروفلوکساسین بارگذاری شده در این هیدروژل به‌طور مؤثری قادر به مهار رشد باکتری‌های E.coli و S.aureus است که به‌طور معمول با عفونت‌های واژینال مرتبط هستند. آزمون MTT نیز زیست‌سازگاری بالای هیدروژل‌های طراحی‌شده را تأیید کرد. هرچند کاهش موقتی در فعالیت متابولیکی سلول‌های فیبروبلاست در روز اول مشاهده شد، این اثر به آزادسازی اولیه دارو نسبت داده شده و در روز سوم فعالیت سلولی افزایش یافت که بیانگر عدم بروز سمیت پایدار و قابلیت بازسازی سلولی در حضور هیدروژل می‌باشد. این نتایج نشان‌دهنده تعادل مناسب بین اثربخشی دارویی و ایمنی زیستی فرمولاسیون H-2 هستند که برای کاربردهای بالینی در محیط حساس واژینال اهمیت زیادی دارد.

در سال ۲۰۲۱، Alinavaz و همکارانش هیدروژل‌های پلی‌وینیل الکل بر پایه‌ی کاپا-کاراگینان، بارگذاری‌شده با سیپروفلوکساسین را برای سیستم دارورسانی توسعه دادند. در حالی‌که هیدروژل‌های خالی فعالیت آنتی‌باکتریالی نداشتند، نمونه‌های حاوی دارو نواحی مهار رشد واضحی علیه S.aureus و E.coli نشان دادند که رهایش مؤثر سیپروفلوکساسین را تأیید می‌کرد (۳۴). در سال ۲۰۱۹، Hanna و همکارانش هیدروژل پلی‌الکترولیتی کیتوزان و صمغ کربوکسی متیل سدیم را برای رهایش کنترل‌شده‌ی سیپروفلوکساسین طراحی کردند. هیدروژل حاوی دارو فعالیت آنتی‌باکتریالی قوی علیه S.aureus و E.coli نشان داد و قطر ناحیه مهار رشد آن حتی بیشتر از آنتی‌بیوتیک مرجع جنتامایسین بود، در حالی‌که هیدروژل خالی هیچ اثر آنتی‌باکتریالی نداشت (۳۵). در سال ۲۰۲۵، Huang و همکارانش هیدروژل‌های مبتنی بر گام صمغ زانتان و آلژینیک اسید برای رهایش کنترل‌شده سیپروفلوکساسین طراحی کردند که فعالیت آنتی‌باکتریالی قوی علیه S.aureus و E.coli نشان دادند. افزایش غلظت هیدروژل‌ها منجر به کشندگی کامل کلنی‌های باکتریایی شد (۳۶).

CCBY-NC.4.0 DEED

محدودیت‌های اصلی این پروژه شامل انجام آزمایش‌ها در محیط آزمایشگاهی و عدم بررسی شرایط واقعی بالینی، محدودیت طیف باکتری‌های مورد بررسی، و نبود ارزیابی اثرات بلندمدت هیدروژل بر بافت و رهایش دارو است. همچنین، امکان بهینه‌سازی بیشتر فرمولاسیون و بررسی پایداری طولانی‌مدت هیدروژل وجود نداشت.

نتیجه‌گیری

فرمولاسیون H-2 از هیدروژل‌های ژلاتین/آلژینات با داروی سیپروفلوکساسین، با برخورداری از ویژگی‌های ساختاری، رئولوژیکی و رهایش دارویی مطلوب، هم‌چنین اثربخشی آنتی‌باکتریال بالا و زیست‌سازگاری قابل قبول، به‌عنوان یک سامانه دارورسانی نویدبخش برای درمان موضعی عفونت‌های باکتریایی واژینال مطرح است. استفاده از این سامانه می‌تواند منجر به بهبود اثربخشی درمان، کاهش دوز مصرفی سیستمیک، کاهش عوارض جانبی و افزایش پذیرش بیمار شود.

تشکر و قدردانی

محققین این پژوهش مراتب تشکر و قدردانی خود را از حمایت‌های مادی و معنوی مرکز تحقیقات پیشگیری از بیماری‌های زنان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و دانشکدگان علوم و فناوری‌های میان رشته‌ای دانشگاه تهران اعلام می‌دارند. این مقاله در راستای پروژه تحقیقاتی با عنوان "بررسی اثر نانوکورکومین و پکلی‌تکسل بارگذاری‌شده در حامل پلیمری حساس به pH، بر زنده‌مانی سلول‌های اپیتالیالی سرطان تخمدان در محیط برون‌تنی" مصوب مرکز تحقیقات پیشگیری از بیماری‌های زنان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، نگارش شده است.

تعارض در منافع: این پژوهش تعارض منافع ندارد.

حامی مالی: این تحقیق با حمایت مالی مرکز تحقیقات پیشگیری از بیماری‌های زنان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی طی قرارداد شماره ۴۳۰۰۷۹۹۱-۰۲ به انجام رسیده است.

ملاحضات اخلاقی(کد اخلاق): پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تأیید شده است (کد اخلاق IR.SBMU.RETECH.REC.1402.704).

مشارکت نویسندگان

- **طراحی ایده:** هادی تابش
- **روش کار:** مصطفی بشیری برازنده، علی گل‌کار
- **جمع‌آوری داده‌ها:** مصطفی بشیری برازنده، علی گل‌کار
- **تجزیه و تحلیل داده‌ها:** مصطفی بشیری برازنده، علی گل‌کار
- **نظارت:** هادی تابش، فرح فرزانه
- **مدیریت پروژه:** هادی تابش، مصطفی بشیری برازنده
- **نگارش – پیش‌نویس اصلی:** مصطفی بشیری برازنده، علی گل‌کار
- **نگارش – بررسی و ویرایش:** مصطفی بشیری برازنده، علی گل‌کار

CCBY-NC.4.0 DEED

References

1. Czajkowski K, Broś-Konopielko M, Teliga-Czajkowska J. Urinary tract infection in women. *Menopause Review/Przegląd Menopauzalny* 2021; 20(1): 40-7.
2. Ojha S, Vishwakarma PK, Mishra S, Tripathi SM. Impact of urinary tract and vaginal infections on the physical and emotional well-being of women. *Infectious Disorders-Drug Targets* 2025; 25(1): E310524230589.
3. Liu P, Lu Y, Li R, Chen X. Use of probiotic lactobacilli in the treatment of vaginal infections: In vitro and in vivo investigations. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2023; 13: 1153894.
4. Muzny CA, Schwebke JR. Biofilms: an underappreciated mechanism of treatment failure and recurrence in vaginal infections. *Clinical Infectious Diseases* 2015; 61(4): 601-6.
5. Palmeira-de-Oliveira R, Palmeira-de-Oliveira A, Martinez-de-Oliveira J. New strategies for local treatment of vaginal infections. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2015; 92: 105-22.
6. Sobel R, Sobel JD. Metronidazole for the treatment of vaginal infections. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2015; 16(7): 1109-15.
7. Chandrashekhar P, Minooei F, Arreguin W, Masigol M, Steinbach-Rankins JM. Perspectives on existing and novel alternative intravaginal probiotic delivery methods in the context of bacterial vaginosis infection. *The AAPS journal* 2021; 23(3): 66.
8. Cipolla D, Blanchard J, Gonda I. Development of liposomal ciprofloxacin to treat lung infections. *Pharmaceutics* 2016; 8(1): 6.
9. Follath F, Bindschedler M, Wenk M, Frei R, Stalder H, Reber H. Use of ciprofloxacin in the treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. Ciprofloxacin: *Microbiology-Pharmacokinetics-Clinical Experience* 1986: 107-11.
10. Scully B, Parry M, Neu H, Mandell W. Oral ciprofloxacin therapy of infections due to Pseudomonas aeruginosa. *The Lancet* 1986; 327(8485): 819-22.

CCBY-NC.4.0 DEED

11. Almurshedi AS, Aljunaidel HA, Alquadeib B, Aldosari BN, Alfagih IM, Almarshidy SS, et al. Development of inhalable nanostructured lipid carriers for ciprofloxacin for noncystic fibrosis bronchiectasis treatment. *International Journal of Nanomedicine* 2021: 2405-17.

12. Jabbari P, Mahdavinia GR, Rezaei PF, Heragh BK, Labib P, Jafari H, et al. pH-responsive magnetic biocompatible chitosan-based nanocomposite carrier for ciprofloxacin release. *International Journal of Biological Macromolecules* 2023; 250: 126228.

13. Jariya SI, Babu AA, Narayanan TS, Vellaichamy E, Ravichandran K. Development of a novel smart carrier for drug delivery: Ciprofloxacin loaded vaterite/reduced graphene oxide/PCL composite coating on TiO2 nanotube coated titanium. *Ceramics International* 2022; 48(7): 9579-94.

14. Parsa F, Setoodehkhah M, Atyabi SM. Loading and release study of ciprofloxacin from silica-coated magnetite modified by iron-based metal-organic framework (MOF) as a nonocarrier in targeted drug delivery system. *Inorganic Chemistry Communications* 2023; 155: 111056.

15. Ahmad K, Meng Y, Fan C, Din ASU, Jia Q, Ashraf A, et al. Collagen/gelatin and polysaccharide complexes enhance gastric retention and mucoadhesive properties. *International Journal of Biological Macromolecules* 2024: 131034.

16. Szekalska M, Wróblewska M, Czajkowska-Kośnik A, Sosnowska K, Misiak P, Wilczewska AZ, et al. The spray-dried alginate/gelatin microparticles with luliconazole as mucoadhesive drug delivery system. *Materials* 2023; 16(1): 403.

17. Adegoke AA, Okoh AI. Prevalence of Escherichia coli in vagina of female patients with symptoms of urinary tract infection. *Inter J Obst Gynecol* 2021; 9(1): 001-5.

18. Choi Y-s, Kim Y, Hong S-y, Cho HJ, Sung J-H, Choi S-J, et al. Abnormal Vaginal Flora in Cervical Incompetence Patients—the Impact of Escherichia coli. *Reproductive Sciences* 2023; 30(10): 3010-8.

19. Lyon LM, Doran KS, Horswill AR. Staphylococcus aureus fibronectin-binding proteins contribute to colonization of the female reproductive tract. *Infection and Immunity* 2023; 91(1): e00460-22.

20. Yu X, Mao Y, Li G, Wu X, Xuan Q, Yang S, et al. Alpha-Hemolysin from Staphylococcus aureus Obstructs Yeast-Hyphae Switching and Diminishes Pathogenicity in Candida albicans. *Journal of Microbiology* 2023; 61(2): 233-43.

CCBY-NC.4.0 DEED

21. Distler T, Schaller E, Steinmann P, Boccaccini A, Budday S. Alginate-based hydrogels show the same complex mechanical behavior as brain tissue. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials 2020; 111: 103979.

22. Aliaghaie M, Mirzadeh H, Dashtimoghadam E, Taranejoo S. Investigation of gelation mechanism of an injectable hydrogel based on chitosan by rheological measurements for a drug delivery application. *Soft Matter* 2012; 8(27): 7128-37.

23. Mohsin MEA, Siddiqa AJ, Mousa S, Shrivastava NK. Design, characterization, and release kinetics of a hybrid hydrogel drug delivery system for sustained hormone therapy. *Polymers* 2025; 17(8): 999.

24. Oyom W, Strange J, Nowlin K, Tukur P, Ferdaus MJ, Faraji H, et al. Development and characterization of bigel systems as carriers for thyme essential oil utilizing hydrogel from chicken processing by-products for food applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 2025; 292: 139222.

25. Irfan M, Liu JD, Du XY, Chen S, Xiao JJ. Hydrogen bond□reinforced double□network hydrogels with enhanced mechanical strength: Preparation, characterization and swelling behavior. *Journal of Polymer Science* 2024; 62(15): 3426-38.

26. Cicek C, Erdogan ZO. Detection of ciprofloxacin in ear drop using UV spectrophotometric method based on gold nanoparticles as a sensing probe. *Journal of Nanoparticle Research* 2024; 26(6): 121.

27. Abou-Okeil A, Taha GM. Investigation and kinetics of hydrogel scaffold with sustained release ciprofloxacin hydrochloride. *Polymer Bulletin* 2024; 81(18): 17393-411.

28. Parvekar P, Palaskar J, Metgud S, Maria R, Dutta S. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against Staphylococcus aureus. *Biomaterial investigations in Dentistry* 2020; 7(1): 105-9.

29. Caliari SR, Burdick JA. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature methods* 2016; 13(5): 405-14.

30. Sarker B, Singh R, Silva R, Roether JA, Kaschta J, Detsch R, et al. Evaluation of fibroblasts adhesion and proliferation on alginate-gelatin crosslinked hydrogel. *PloS one* 2014; 9(9): e107952.

31. Ghanbari M, Salavati-Niasari M, Mohandes F, Dolatyar B, Zeynali B. In vitro study of alginate–gelatin scaffolds incorporated with silica NPs as injectable, biodegradable hydrogels. *RSC Advances* 2021; 11(27): 16688-97.

CCBY-NC.4.0 DEED

32. Sahoo S, Chakraborti C, Mishra S, Naik S, Nanda U. FTIR and Raman spectroscopy as a tool for analyzing sustained release hydrogel of ciprofloxacin/carbopol *polymer* 2011.

33. Derkach SR, Voron'ko NG, Sokolan NI, Kolotova DS, Kuchina YA. Interactions between gelatin and sodium alginate: UV and FTIR studies. *Journal of Dispersion Science and Technology* 2020.

34. Alinavaz S, Mahdavinia GR, Jafari H, Hazrati M, Akbari A. Hydroxyapatite (HA)-based hybrid bionanocomposite hydrogels: Ciprofloxacin delivery, release kinetics and antibacterial activity. Journal of Molecular Structure 2021; 1225: 129095.

35. Hanna DH, Saad GR. Encapsulation of ciprofloxacin within modified xanthan gum-chitosan based hydrogel for drug delivery. *Bioorganic Chemistry* 2019; 84: 115-24.

36. Huang S, An S, Kannan PR, Wahab A, Ali S, Xiaoqing L, et al. Development and characterization of biodegradable antibacterial hydrogels of xanthan gum for controlled ciprofloxacin release. *International Journal of Biological Macromolecules* 2025: 142637.

CCBY-NC.4.0 DEED

Design and Evaluation of an Injectable Gelatin/Alginate Hydrogel Loaded with Ciprofloxacin for Vaginal Infection Therapy: A Laboratory Study

Mostafa Bashiri Barazandeh[1], Ali Golkar[1], Hadi Tabesh[2], Farah Farzaneh[3]

Received: 23/04/25 Sent for Revision: 25/08/25 Received Revised Manuscript: 06/10/25 Accepted: 08/108/25

Background and Objectives: Vaginal infections are common among women and are often caused by bacteria such as Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Conventional topical treatments have limitations, including short drug retention time, the need for frequent administration, and local irritation. This study aimed to design and evaluate a gelatin/alginate injectable hydrogel loaded with ciprofloxacin to improve the treatment of these infections.

Materials and Methods: In this laboratory study, hydrogels with different concentrations of gelatin and alginate, loaded with ciprofloxacin, were prepared. Their physical properties, including morphology, swelling ratio, and rheological behavior, were assessed. Drug release profiles were analyzed, and the antibacterial activity of the optimized hydrogel against E.coli and S.aureus was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Data were analyzed using the Shapiro–Wilk, Brown–Forsythe tests, and one-way analysis of variance (ANOVA).

Results: Comparative analyses showed that the gelatin/alginate injectable hydrogel with a 6:6 weight/volume ratio exhibited a uniform structure and controlled drug release, with higher biocompatibility compared to other formulations. Antibacterial tests indicated that the ciprofloxacin-loaded hydrogel effectively inhibited the growth of both tested bacteria and showed similar performance to free ciprofloxacin, while its cytotoxicity was significantly lower ($p=0.0111$).

Conclusion: The gelatin/alginate injectable hydrogel formulation can serve as an effective drug delivery system for the topical treatment of vaginal infections. By prolonging local drug retention, it enhances therapeutic efficacy and can be a suitable alternative to conventional treatments.

Keywords: Drug delivery, Ciprofloxacin, Injectable hydrogel, Gelatin, Alginate, Vaginal infection

Funding: This study was funded by the Preventative Gynecology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, under contract number 02-43007991.

Conflict of interest: None declared.

Ethical considerations: The Ethics Committee of Shahid Beheshti University of Medical Sciences approved the study (IR.SBMU.RETECH.REC.1402.704).

Authors' Contributions:

- **Conceptualization:** Hadi Tabesh
- **Methodology:** Mostafa Bashiri Barazandeh, Ali Golkar
- **Data collection:** Mostafa Bashiri Barazandeh, Ali Golkar
- **Formal analysis:** Mostafa Bashiri Barazandeh, Ali Golkar
- **Supervision:** Hadi Tabesh, Farah Farzaneh
- **Project administration:** Hadi Tabesh, Farah Farzaneh
- **Writing – original draft:** Mostafa Bashiri Barazandeh, Ali Golkar
- **Writing – review & editing:** Mostafa Bashiri Barazandeh, Ali Golkar

Citation: Bashiri Barazandeh M, Golkar A, Tabesh H, Farzaneh F. Design and Evaluation of an Injectable Gelatin/Alginate Hydrogel Loaded with Ciprofloxacin for Vaginal Infection Therapy: A Laboratory Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2025; 24 (8): 689-708. [Farsi]

1- MSc, College of Interdisciplinary Science and Technology, University of Tehran, Tehran, Iran
2- Associate Prof., College of Interdisciplinary Science and Technology, University of Tehran, Tehran, Iran
(Corresponding Author) Tel: 09022402250, E-mail: hadi.tabesh@ut.ac.ir
3- Associate Prof., Preventative Gynecology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran

CCBY-NC.4.0 DEED