

# ساخت و بررسی رهایش لیدوکایین هیدروکلراید از فیلم پلیمری به عنوان زخم پوش

شهرزاد زیرک حسن کیاده<sup>۱</sup>، آزاده غایی<sup>۲</sup>، جواد محمدنژاد آروق<sup>\*۳</sup>، آرزو مشاک<sup>۴</sup>

## مقاله پژوهشی

**مقدمه:** در میان مواد حامل با قابلیت رهایش کنترل شده دارو، زروژل‌های سیلیکایی برای بارگذاری و رهایش ثابت دارو در دراز مدت، مورد توجه قرار گرفته‌اند. این زروژل‌ها از طریق تکنولوژی سل ژل و با استفاده از آغازگر سیلیکا سنتر می‌شوند. یکی از آغازگرهای رایج، تترا اورتوسیلیکات (TEOS) است.

**روش بررسی:** این مطالعه، یک مطالعه پایه‌ای تجربی است، که در آن خواص زروژل‌های سیلیکایی پس از افزودن کیتوسان به آن‌ها، شامل مورفولوژی، مساحت سطحی، توبوگرافی و رفتار مکانیکی بررسی شدند. سپس، درون زروژل‌های هیبرید کیتوسان-سیلیکا، داروی لیدوکایین هیدروکلراید بارگذاری شده و رفتار رهایش دارو از آن‌ها ارزیابی و با زروژل‌های سیلیکایی خالص مقایسه شد. همچنین، پیوند کوالانسی بین زنجیره‌های کیتوسان و شبکه سیلیکا به‌کمک آزمون FTIR تایید شد و برای بررسی سمیت سلولی نمونه‌های نهایی، آزمون MTT انجام شد.

**نتایج:** منحنی رهایش زروژل‌های هیبریدی دو فازی بودند و نرخ رهایش تجمعی از آن‌ها تقریباً ۷۱ درصد بود. حضور کیتوسان اثر رهایش انفحاری و نرخ رهایش را کاهش، اما مدت زمان دوره رهایش دارو را در مقایسه با زروژل سیلیکایی افزایش داده است. همچنین ترکیب کیتوسان و TEOS ازدیاد طول کششی را افزایش داده و اندازه ابعاد تخلخل‌های زروژل‌های بر پایه TEOS را می‌کاهد.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه برونقتنی نشان داد که روش سل ژل برای به دام انداختن داروی لیدوکایین هیدروکلراید درون تخلخل‌های زروژل‌ها و رهایش کنترل شده آن، موثر است. همچنین استفاده همزمان از کیتوسان و TEOS خواص مکانیکی فیلم‌های زیست‌سازگار حاصل را بهبود داد. بنابراین، این مطالعه نشان داد که استفاده از مواد آلی-غیرآلی به عنوان پوشش یا فیلم‌های نازک در کاربردهای زیست‌پزشکی همچون رهایش دارو مفید خواهد بود.

**واژه‌های کلیدی:** شبکه کیتوسان-سیلیکا، رهایش دارو، زخم پوش

**ارجاع:** زیرک حسن کیاده شهرزاد، غایی آزاده، محمد نژاد آروق جواد، مشاک آرزو. ساخت و بررسی رهایش لیدوکایین هیدروکلراید از فیلم پلیمری به عنوان زخم پوش. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی بیزد ۱۳۹۹؛ ۲۸(۸): ۵۰-۲۹۳۴.

۱-دانشجو دکتری زیست مواد، گروه مهندسی علوم زیستی، مهندسی پزشکی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲-دانشیار، گروه مهندسی علوم زیستی، مهندسی پزشکی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳-استادیار، گروه مهندسی علوم زیستی، نانوویوتکنولوژی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۴-کارشناسی ارشد، گروه سامانه‌های داروسانی، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، تهران، ایران.

\*(نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۲۴۱۸۶۳۰، پست الکترونیکی: mohamadnejad@ut.ac.ir صندوق پستی: ۱۴۳۹۹۵۷۱۳۱

## مقدمه

گروههای سیلان سیلیکا و آمین یا هیدروکسیل کیتوسان تشکیل می‌شود (۴). سیلیکا مانند یک عامل کراس لینک کننده، خواص مکانیکی ضعیف و پایداری شیمیایی و حرارتی کم کیتوسان و تثبیت ترکیبات شیمیایی را بهبود می‌دهد. رزولزهای هیبرید به‌شکل داریست جهت ترمیم زخم، رهایش دارو، زیست حس‌گرها و مهندسی بافت بسیار استفاده می‌شوند (۱۷-۲۲). در این مطالعه، هدف از ساخت فیلم رزولز کیتوسان-سیلیکا، ساخت یک سیستم دارورسان جهت پوشش زخم بود بنابراین رزولزهای کیتوسان-سیلیکا به روش سل-ژل و به شکل فیلم سنتز شدند. پس از تایید پیوندهای کوالانسی ایجاد شده بین زنجیره‌های کیتوسان و شبکه سیلیکا، خواص فیزیکی و مکانیکی و سمیت سلولی نمونه‌ها بررسی شدند. رهایش داروی مدل از رزولزها و ارتباط آن با خواص ساختاری نمونه‌ها نیز بررسی شد. لیدوکایین هیدروکلراید (داروی مدل آب‌دوست) یک بی‌حس کننده موضعی و دارای یک گروه آمین و یک بخش آروماتیک است که از دریافت سیگنال در اعصاب محیطی، ممانعت می‌کند (۲۳،۲۴). برطبق نتایج، در نمونه هیبرید کیتوسان-سیلیکای حاوی دارو، شکنندگی فیلم سیلیکای خالص و استحکام پایین فیلم کیتوسان خالص بهبود یافتد. استفاده از پلیمر، رهایش دارو را از فیلم سیلیکایی، آهسته‌تر و کنترل شده‌تر کرد. در نتیجه، می‌توان این فیلم هیبریدی نانو متخلفل و زیست‌سازگار را به عنوان یک سیستم دارورسانی و به شکل پوشش زخم جهت کاربرد زیست‌پزشکی مناسب دانست.

## روش بررسی

### مواد

کیتوسان (وزن مولکولی متوسط، درجه داستیلیشن ۸۵-۷۵) درصد) از کمپانی سیگما-آلدریچ و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از جمله تتراتیل اورتوسیلیکات (TEOS)، اسید استیک و نمک‌های مایع شبیه‌ساز زخم (PECF)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ،  $\text{KCl}$ ،  $\text{NaCl}$  و  $\text{NaHCO}_3$  از کمپانی (LKT) مرک خریداری شدند. همچنین، داروی استفاده شده، یعنی لیدوکایین هیدروکلراید از کمپانی دارو پخش (تهران، ایران)

فرآیند پلیمریزاسیون غیرآلی سل-ژل Sol-gel یکی از تکنیک‌های رایج جهت سنتز سیستم‌های دارورسانی است (۱). رزولزهای Xerogels سیلیکایی نانوساختار حاصل، آمورف، بسیار متخلفل و فعال هستند و به عنوان حامل، جهت رهایش کنترل شده ترکیبات زیست فعال بررسی شده‌اند (۲،۳). این مواد مزیت‌های بی‌شماری دارند؛ از جمله دمای پایین فرآیند سنتز، خنثی بودن از لحاظ شیمیایی، تورم ناچیز در محلول‌های آلی و آبی، پایداری حرارتی (۴،۵) و زیست‌سازگاری؛ چون درون بدن به  $\text{Si(OH)}_4$  تخریب و توسط کلیه‌ها، حذف می‌شوند (۶،۷). علی‌رغم این مزیت‌ها، رزولزهای سیلیکایی با پلیمرهای زیست‌سازگار کامپوزیت می‌شوند تا برخی خواص مکانیکی آن‌ها مانند چقرمگی و انعطاف‌پذیری کم بهبود یابد (۸). تراواورتوسیلیکات (TEOS) Tetraethylortosilicate آغازگر رایج برای تشکیل شبکه سیلیکایی در مسیر هیدرولیز Condensation - تراکم Hydrolysis هیدروکسیل سیلان است (۹،۱۰). ترکیبات زیست‌فعال، می‌توانند قبل از تشکیل ژل، درون سل اضافه شوند و پس از تشکیل ژل، در میان شبکه متخلفل سیلیکایی به دام بیفتد. تشکیل ژل سیلیکایی می‌تواند با تغییر پارامترهای فیزیکی-شیمیایی (دما، pH و نوع کاتالیزگر) کنترل شود، که قرار گرفتن مولکول‌ها یا سلول‌ها را در شبکه تسهیل می‌کند (۱۰،۱۳). کاتالیزگر اسیدی، باعث تخلخل کمتر، استحکام مکانیکی بهتر و رهایش آهسته‌تر می‌شود (۱۱،۱۲). کیتوسان یکی از پلی‌ساقاریدهایی است که می‌تواند در فرآیند سل-ژل استفاده شود، چون در محلول اسیدی حل می‌شود و گروههای هیدروکسیل ( $-\text{OH}$ ) و آمین ( $-\text{NH}_2$ ) دارد، که با گروههای عاملی فعال و غیرآلی سیلیکا پیوند برقرار می‌کنند (۱۲،۱۳). کیتوسان، خواصی مانند زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری و فعالیت ضد میکروبی دارد و رشد سلول‌های فیبروبلاست پوست را بهبود می‌بخشد؛ بنابراین کاربرد فراوانی جهت ترمیم زخم و حامل‌های رهایش دارو دارد (۱۴-۱۶). در رزولزهای کیتوسان-سیلیکا به روش سل-ژل، پیوندهای کوالانسی بین

دقیقه مخلوط و همزدہ می‌شود و یک محلول هموژن را تشکیل می‌دهد. برای سنتز فیلم هیبریدی حاوی دارو، مقدار مناسبی از محلول دارو هم به محلول یکنواخت مذکور (۱:۳) اضافه شده و در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت همزدہ می‌شود. محلول دارو حاوی ۵ درصد وزنی دارو (لیدوکایین هیدروکلراید) در آب دیونیزه است؛ یعنی در ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه‌های نهایی سیلیکایی خالص و سیلیکا-کیتوسان حاوی دارو، به ترتیب، حدود  $\frac{64}{3}$  و  $\frac{34}{3}$  میلی‌گرم دارو وجود دارد. محلول کیتوسان-TEOS-دارو روی بستر گسترانیده و به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق خشک شد. پس از تبخیر حلال‌ها، یک فیلم بسیار نازک به روش سل-زل حاصل شد. اطلاعات مربوط به آماده‌سازی هر نمونه در جدول ۱ آورده شده است. نمونه‌های سیلیکا در کیسه نایلون قرار داده شده و به کمک تشعشع گاما (۲۵ kGy و نرخ ۶ kGy/h) سترون شدند (۲۶، ۲۷).

تهیه شد. بافر فسفات سالین (PBS  $\times 1$ ) و محیط کشت کمپانی تکنولوژی‌های زنده گیبکو-بی‌آرال تهیه و سلول‌های فیبروبلاست از بانک سلولی ایران (انیستیتو پاستور، ایران) خردباری شدند.

#### آماده‌سازی غشای کیتوسان-سیلیکا

محلول هیدرولیز، با حل کردن TEOS، در اسید استیک (۲٪ حجمی) و اتانول به دست می‌آید؛ نسبت TEOS و اسید استیک و اتانول، ۱:۱:۴ است. محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت TEOS جهت هیدرولیز، همزدہ می‌شود. پس از آن، محلول می‌تواند روی بستر گسترانیده و فیلم‌های سیلیکایی تشکیل دهد. برای سنتز فیلم‌های هیبرید، محلول ۴ درصد وزنی کیتوسان در اسید استیک (۰.۲٪ حجمی) ساخته می‌شود که در این مرحله، pH تخریب دارو نیز در نظر گرفته شد (۲۸). سپس محلول کیتوسان و TEOS با نسبت دو به یک، به مدت ۳۰

جدول ۱) نسبت‌های حجمی به کار رفته در آماده‌سازی هر نمونه سیلیکایی و شکل آن‌ها

نمونه	TEOS	دارو	کیتوسان	شکل نمونه
TEOS	۱	۰	۰	پودر
TEOS-lid	۱	۱	۰	فیلم، قطعه
TEOS-Cs	۱	۰	۲	فیلم، قطعه
TEOS-Cs-lid	۱	۱	۲	فیلم، قطعه

#### Field FE-)emission scanning electron microscopy (SEM)

به منظور بررسی مورفولوژی زرزل سیلیکایی و ساختار سطح مقطع آن‌ها، نمونه‌ها با میکروسکوپ FE-SEM (HITACHI S4160 ۵۰ ژاپن) در ولتاژ Kv ۱۵ روشن شدند. از آنجایی که زرزل‌های سیلیکایی شکننده هستند، جهت تصویربرداری از مقطع عرضی، به آسانی در دمای اتاق شکسته می‌شوند و نیاز به عملیات آماده‌سازی خاصی ندارند. همه نمونه‌ها توسط یک لایه از طلا پوشش داده شدند. برای بررسی مورفولوژی سلول‌ها، ابتدا سلول‌ها روی سطح ثبیت شدند. برای ثبیت آن‌ها از یک

#### ارزیابی خواص فیزیکی و شیمیایی Fourier transformed (FTIR) infrared spectroscopy

به منظور بررسی برهمکنش‌های موجود بین گروه‌های عاملی برای سیلیکای خالص از روش FTIR و برای نمونه‌های هیبریدی از روش ATR-FTIR استفاده شد؛ چون سیلیکای خالص بسیار شکننده و قبل از آماده‌سازی به شکل فیلم نبود. طیف FTIR از  $400\text{ cm}^{-1}$  تا  $4000\text{ cm}^{-1}$  توسط طیف سنج مدل PerkinElmer ساخت کشور آمریکا و طیف ATR-FTIR توسط طیف سنج مدل Bruker ساخت کشور انگلستان مورد بررسی قرار گرفت.

(MagicDroplet®) تخمین زده شدند و این آزمون حداقل سه بار برای هر نمونه تکرار، سپس میانگین داده‌ها، گزارش شد.

**Tensile mechanical testing** آزمون مکانیکی کششی به منظور ارزیابی خواص مکانیکی غشاء‌های کیتوسان-STM-20 سیلیکا، با استفاده از دستگاه آزمون کششی مدل ۵۰۰۰، ساخت ایران، مدول الاستیک، استحکام کششی و کرنش در نقطه شکست نمونه‌ها، مطابق با استاندارد ASTM-D882 تعیین شدند. فک به صورت گیره دوتایی با فاصله اولیه ۳۰ میلی‌متر و سرعت حرکت ۲۵ میلی‌متر بر دقیقه انتخاب شد. نمونه‌ها به صورت مستطیل‌های  $50 \times 10$  میلی‌متر آماده شدند.

#### آزمون سمیت سلولی

جهت بررسی سمیت سلولی زروزل‌های سنتز شده به روش سل-ژل، از آزمون سمیت سلولی (MTT، غیر مستقیم)، با استفاده از رده سلولی A431، فیبروبلاست انسانی، انجام شد. جهت این آزمون، عصاره‌گیری مطابق با استاندارد ISO 10993-12، پس از ۳، ۶ و ۷ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد (۲۸). در عصاره‌گیری به ازای هر  $0.06$  سانتی‌متر مربع از سطح مقطع نمونه،  $10^{-1}$  میلی‌لیتر محیط به ظرف حاوی نمونه افزوده شد و برای مدت ۷ روز درون انکوباتور حاوی گاز اکسید کربن ۵٪ و دمای کشت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. حجم مشابهی از محیط کشت نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. جهت عصاره‌گیری از پودر نیز، به میزان یک میلی‌لیتر از محیط کشت سلولی به  $1$  میلی‌گرم از پودر استریل اضافه و درون انکوباتور با شرایط فوق قرار داده شد. برای بررسی میزان تکثیر سلولی از آزمون دی‌متیل‌تیازل دی‌فنیل‌تترازولیوم بروماید (MTT) استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا سلول‌های فیبروبلاست درون محیط DMEM، تکمیل شده با  $10$  درصد سرمه‌جنین گاوی،  $100$  U/ml پنی‌سیلین و  $100$  U/ml استروپتومایسین پاساژ داده شدند تا به عدد  $10^5$  بررسند. سپس  $10 \times 10^4$  سلول فیبروبلاست، درون پلیت کشت سلولی ۹۶ چاهکی ریخته شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با اتمسفر حاوی  $5$  درصد  $\text{CO}_2$  قرار گرفت تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. پس از آن، محیط

میلی‌لیتر محلول گلوتارآلدهید ( $4$  درصد حجمی) در بافر فسفات با  $\text{pH}=7/4$  استفاده شد، که نمونه‌ها باید به مدت  $-30$  دقیقه درون آن غوطه ور باشند. سپس به آرامی با آب دوبار تقطیر، دو بار شستشو داده شدند. پس از آن هر  $5$  دقیقه به صورت پشت سر هم با اتانول ( $50$ ،  $60$ ،  $70$ ،  $80$ ،  $96$  و  $100$  درصد)، خشک شدند. سپس در زیر هود قرار گرفته تا حلال‌های باقیمانده نیز از آن‌ها خارج شود و در یخچال نگهداری شدند. بعد از آن نمونه‌ها مورد تصویربرداری قرار گرفتند.

#### Atomic force microscopy (AFM)

برای بررسی خواص سطحی نظیر توپوگرافی و زیری سطح و میزان و اندازه تخلخل‌ها، از میکروسکوپ AFM (مدل Nano II wizard، آلمان) استفاده شد. زیری سطح از دسته خواصی است که می‌تواند بر چسبندگی سلول و باکتری تأثیر بگذارد، لذا بررسی زیری سطح از اهمیت بالایی برخوردار است. زروزل‌های TEOS-Cs-lid و TEOS-Cs مورد بررسی قرار گرفتند و تصاویر در حالت غیر تماسی و در سطح  $5 \times 5$  میکرومتر مربع گرفته شدند. نتایج با استفاده از نرم‌افزار مربوط (Auto-probe®) تعیین و گزارش شدند.

#### Brunauer Emmett Teller (BET)

اندازه تخلخل متوسط و مساحت سطح زروزل‌های سیلیکایی با روش BET (Micromeritics Gimini) تخمین زده شدند. این آزمون براساس جذب گاز نیتروژن است.

#### آزمون ترشوندگی (WCA)

خواص سطحی (فیزیکی و شیمیایی) زخم پوش عامل تعیین کننده در چسبندگی و رشد سلول‌های سیلیکایی تخلخل‌ها مورد مطالعه قرار گرفته شد. زاویه تماس ایستای فیلم‌های سیلیکایی توسط دستگاه زاویه سنج مدل G10 ساخت کشور آلمان تعیین شد. به منظور تعیین زاویه تماسی از حلal آب یون زدایی شده استفاده شد. در دمای محیط، قطره حلal به طور جداگانه روی سطح فیلم توسط سرنگ مجهز به موتور ریخته شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار مربوط

ارلن‌های حاوی نمونه، در دستگاه انکوباتور شیکر (incubator) ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حداقل سرعت ممکن) در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و در بازه‌های زمانی مشخص، ۲ میلی‌لیتر از محیط رهایش برداشته و با حجم Sink یکسان، محیط تازه جایگزین شد تا شرایط حمام (Sink conditions) حفظ شود. اندازه جذب نور در حجم مشخصی از نمونه‌ها، با دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-vis در طول موج جذب ماکزیمم لیدوکائین هیدروکلراید (۲۶۳ نانومتر) اندازه‌گیری، و از روی منحنی استاندارد، غلظت دارو محاسبه شد. به کمک فرمول (۲-۳) این غلظت‌ها اصلاح شدند و درصد تجمعی دارو محاسبه شد (۳۲). هر آزمون ۳ بار تکرار شد.

$$\text{غلظت اندازه‌گیری شده قبلی} \times \frac{\text{حجم نمونه بر انتخاب شده}}{\text{حجم محیط رهایش}} + \text{غلظت اندازه‌گیری شده} = \text{غلظت اصلاح شده}$$

(۲-۳)

کشت در روزهای ۱، ۳ و ۷ با عصاره گرفته شده از هر نمونه تعویض شد. پس از ۲۴ ساعت عصاره‌ها خارج شدند و ۱۰۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۵/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک حاوی سلول اضافه شد. پس از گذشت ۴ ساعت، محلول روی سلول‌ها خارج شد و DMSO به آن‌ها اضافه گردید تا بلورهای فرمزان بنفس رنگ ایجاد شده را حل کند. سپس ۵۴۵ مقدار غلظت ماده حل شده، با دستگاه الایزا، در طول موج ۵۴۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. چاهک دارای سلول‌های زنده بیشتر چگالی نوری (OD) بالاتری نسبت به چاهک با سلول کمتر نشان می‌دهد. بنابراین می‌توان از رابطه (۲-۱) و (۲-۲) فعالیت میتوکندری فیبروبلاست‌ها و در نتیجه میزان زنده‌مانی سلول‌ها را مشخص و با نمونه شاهد مقایسه کرد. هر نمونه سه بار مورد آزمون قرار گرفته و داده نهایی به صورت عدد میانگین  $\pm$  انحراف از معیار گزارش شد (۳۰، ۳۹).

(۲-۱)

$$\left( \frac{OD_{\text{متیک سلولی}}}{OD_{\text{متیک شاهد}}} - 1 \right) \times 100 = \% \text{ سمت سلولی}$$

$$\% \text{ سمت سلولی} - 100 = \% \text{ زنده‌مانی سلول‌ها}$$

(۲-۲)

**In vitro Drug Release** آزمون برون تن رهایش دارو در این آزمون، رهایش دارو (لیدوکایین هیدروکلراید)، از زروری‌های TEOS-Cs-lid و TEOS-lid مورد بررسی قرار گرفت. طول موج جذب ماکزیمم لیدوکایین هیدروکلراید، ۲۶۳ نانومتر است (۶). ابتدا منحنی استاندارد دارو، با دستگاه-UV-vis اندازه‌گیری ورسم شد. این منحنی اندازه جذب بر حسب غلظت دارو را نشان می‌دهد و از قانون بیر-لمبرت تبعیت کرده و خطی است. ۱۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه توزین شد و درون کیسه دیالیز (سیگما، آلمان) شست و شو داده شده، قرار گرفت. سیستم حاصل درون محیط رهایش غوطه‌ور گردید. محیط رهایش، مایع شبیه‌ساز زخم (PECF) انتخاب شد، که با حل کردن NaCl ۳/۴ (۱۲/۵ گرم)، NaHCO<sub>3</sub> ۱/۱ (۱ گرم) و NaHPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O ۱/۷۵ (۵۰۰ میلی‌لیتر آب) مقتدر، با pH متوسط ۸/۰  $\pm$  ۰/۵ به دست آمد (۳۱).

## تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها به صورت عدد متوسط  $\pm$  انحراف از معیار از سه آزمون مستقل گزارش شده‌اند که در غیر این صورت در متن اشاره شده است. تفاوت‌ها از طریق آزمون تحلیل واریانس One-way analysis of variance (یک عامله) SPSS version 16 مقایسه و وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین آن‌ها مشخص شد. زمانی که  $p < 0.05$  آن‌گاه تفاوت معنی‌دار است.

## ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه تهران تایید شده است

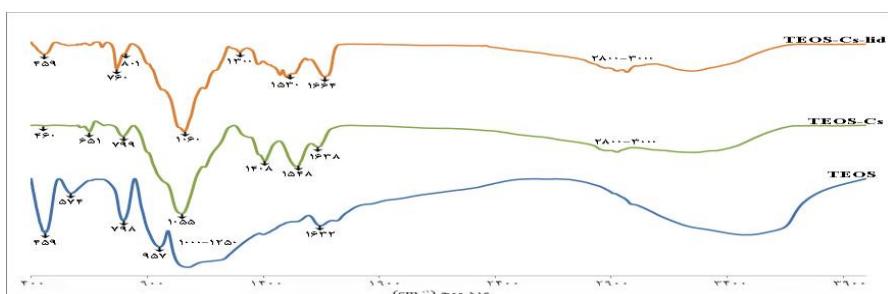
## نتایج

### طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)

نتایج FTIR زروری‌های تهیه شده به روش سل-ژل در شکل ۲ نمایش داده شده‌اند؛ در نمودار FTIR زروری سیلیکایی خالص، پیک‌هایی در ۱۲۵۰، ۱۰۰۰، ۷۹۸ و ۴۵۹ cm<sup>-1</sup> دارد، که تقریباً با نتایج مطالعه آهولا Ahola و همکارانش در سال ۲۰۰۰ همخوانی دارد؛ این پیک‌ها به ترتیب ناشی از ارتعاشات متقارن و غیرمتقارن کششی و خمی پیوند Si-O-Si است

ارتعاشات Si-O-Si، C-O و Si-C هستند (۱۸) (همچنین ارتعاشات کششی گروههای هیدروکسیل متصل به اتمهای کربن (۳۶)). این پیوندهای قوی کوالانسی بیشتر از پیوند ضعیف N در بین سیلانها و کیتوسان تشکیل می‌شود. یک پیک جذبی قوی در  $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  وجود دارد که مربوط به ارتعاشات کششی C-H است. البته نمودار FTIR زروزلهای هیبرید، باندهای مشخصه کیتوسان حدود  $1638\text{ cm}^{-1}$  (ارتعاشات تغییر شکل  $\text{NH}_2$ -)، حدود  $1530\text{ cm}^{-1}$  (ارتعاشات خمثی C-H)،  $1310\text{ cm}^{-1}$  (ارتعاشات نامتقارن CH-) و  $1080\text{ cm}^{-1}$  (ارتعاش کششی C-O-C) را نیز نشان می‌دهند (۳۶). البته بعضی از پیکهای OH را نیز نشان می‌دهند (۳۶). مشخصه با پیکهای TEOS همپوشانی دارند. علاوه بر این، پیکهای حدود  $780\text{ cm}^{-1}$  (حلقه آروماتیک را نشان می‌دهد)،  $1640\text{ cm}^{-1}$  (R-CO-NHR) باندهای مشخصه لیدوکائین هیدروکلراید هستند که به علت همپوشانی با پیکهای دیگر، در شکل ۱ قابل تشخیص نیستند. نتایج حاصل از این آزمون تشکیل پیوند در شبکه سیلیکا و بین سیلیکا و کیتوسان را تایید می‌کند.

(۱۰)، که در داده‌های FTIR نمونه‌های TEOS-Cs-lid نیز وجود دارند. همچنین باند جذبی در  $957\text{ cm}^{-1}$ ، مربوط به ارتعاشات خمثی Si-OH است (۱۰، ۳۳، ۳۴). گروههای سیلانول (Si-OH) باقیمانده در بسیاری از مواد تهیه شده به روش سل-ژل یافت می‌شوند که حاکی از عدم کامل بودن مرحله تراکم پلیمریزاسیون است (۳۴). پیکهای موجود در  $3800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ ،  $1632\text{ cm}^{-1}$  و  $574\text{ cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به پیوند O-H و تغییر شکل گروه H-O-H است، که می‌تواند آب جذب شده در ساختار یا هیدرولیز ناقص TEOS را نشان دهد؛ در صورتی که اسید ضعیف باشد قادر به هیدرولیز کامل ساختار آلوکوسید (TEOS) نیست (۳). دو باند آخری، در  $1632\text{ cm}^{-1}$  و  $572\text{ cm}^{-1}$ ، ممکن است به علت واکنش میان پیوندهای هیدروژن و گروههای سیلانول باشد (۵). باند مشخصه دیگر در  $798\text{ cm}^{-1}$  (مربوط به ساختار حلقه  $\text{SiO}_4$ ) و  $614\text{ cm}^{-1}$  واقع شده است. که در نمودار FTIR نمونه‌های TEOS-Cs-lid و TEOS-Cs مشخصه زروزل TEOS (۳۵)، پیکهای دیگری در  $1260\text{ cm}^{-1}$ ،  $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ ،  $1110\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$  و  $760\text{ cm}^{-1}$  وجود دارند که مربوط به همپوشانی باندهای جذبی



شکل ۱: اسپکتروگراف‌های FTIR فیلم‌های TEOS-Cs-lid، TEOS-Cs و TEOS

بیشتر گرفته شود و اندازه تخلخل‌ها در این تصاویر SEM قابل تخمين نیستند. بنابراین با توجه به این ریزگراف‌ها می‌توان نتیجه گرفت که تخلخل در نمونه‌ها، در صورت وجود دارای ابعاد نانو هستند، که برای اثبات این فرضیه نیاز به آزمون BET وجود دارد. همچنین از این تصاویر می‌توان دریافت که نمونه حاوی کیتوسان سطح صاف‌تری نسبت به نمونه سیلیکایی خالص دارد.

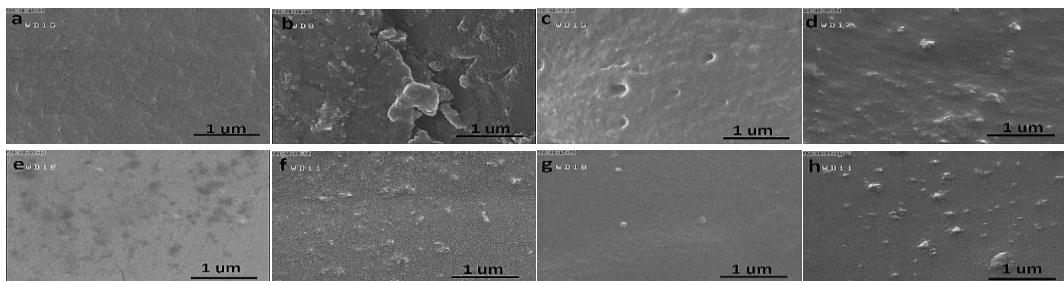
### میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

شکل ۲، به ترتیب ریزگراف‌های SEM سطح بالایی و ساختار سطح مقطع نمونه‌های TEOS-Cs-lid، TEOS-lid، TEOS و TEOS-Cs را نشان می‌دهد. از آنجایی که قدرت اشعه FE-SEM بالا بود و نمونه‌های حاوی کیتوسان را تخریب می‌کرد، تصاویر کیتوسان-سیلیکا نمی‌توانست با بزرگنمایی

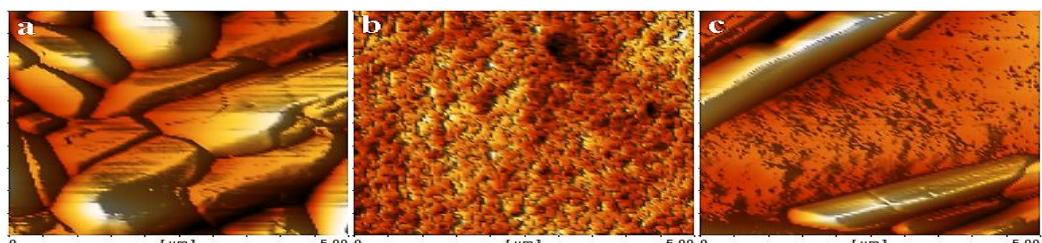
دانسیته قله هستند. همانطور که مشاهده می‌شود، این نتایج، نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی را تکمیل می‌کنند. با اینکه حضور کیتوسان زبری سطح نمونه سیلیکایی را کاهش داده است، در نمونه‌های حاوی داروی لیدوکایین، جوانه‌هایی را مشاهده می‌کنیم که احتمالاً جوانه‌های  $\text{SiO}_2$  هستند.

### آزمون میکروسکوپی نیروی اتمی (AFM)

توپوگرافی سطح پوشش هیبریدی بر پایه TEOS، با استفاده از تکنیک AFM مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۳). پارامترهای زبری نمونه‌های هیبرید سل-ژل در جدول ۲ آورده شده‌اند و سطح نمونه‌های TEOS-Cs-lid، TEOS-lid و TEOS-Cs را توصیف می‌کنند. پارامترهای  $\text{Sa}$ ،  $\text{Sq}$  و  $\text{Sds}$  به ترتیب، زبری متوسط، میانگین ریشه توان دوم زبری (RMS) و تعداد یا



شکل ۲: ریزگراف‌های SEM سطح بالایی (a, b, c و d) و ساختار مقطع (e, f, g و h) نمونه‌های TEOS-Cs-lid، TEOS-Cs و TEOS-lid (به ترتیب).



شکل ۳: تصاویر AFM سطح نمونه‌های (a) TEOS-lid و (b) TEOS-Cs و (c) TEOS-Cs-lid (به ترتیب).

### زاویه تماسی آب (WCA)

برای ارزیابی بهتر رفتار سطح، زاویه تماسی ایستای آب برای فیلم‌های TEOS-Cs-lid، TEOS-lid و TEOS-Cs پلافلسله پس از چکاندن قطره آب روی فیلم‌ها اندازه گرفته شد. نتایج به دست آمده در جدول ۴ جهت مقایسه ارائه شده‌اند. نتایج درون جدول بیانگر کاهش نمونه‌های سیلیکایی با افزودن کیتوسان یا داروی لیدوکایین هستند.

### آزمون مکانیکی تست کششی (testing)

از آنجایی که دلیل عدمه تولید مواد کامپوزیت آلی-غیرآلی، تقویت عملکرد مکانیکی آن‌هاست. ارزیابی مکانیکی کامپوزیت‌های پلیمری حاصل، دارای اهمیت است. تست

### آزمون بروونار-ایمیت-تلر (BET)

نتایج آزمون BET از زروری‌های TEOS-Cs-lid، TEOS-lid و TEOS-Cs در جدول ۳ آورده شده‌اند. زروری‌های TEOS-Cs-lid خالص تهیه شده، به علت شکننده بودن، قابل آماده‌سازی به شکل فیلم جهت بررسی با آزمون BET نبودند. نتایج حاصل از این آزمون وجود نانو تخلخل‌ها را در نمونه‌های سیلیکایی تایید می‌کند. قطر متوسط این نانوتخلخل‌ها کمتر از ۵ نانومتر اندازه‌گیری شده است. همچنین مساحت سطحی نمونه‌های سیلیکایی حاوی دارو به مراتب بسیار از نمونه فاقد دارو کمتر است که با در نظر گرفتن نتایج میکروسکوپ الکترونی و نیروی اتمی به علت حضور جوانه متراکم سیلیکایی در سطح نمونه حاوی دارو است.

وجود نداشت (۳۷). همانطور که از جدول پیداست نمونه‌های سیلیکایی دارای مدول یانگ نسبتاً بالای حدود ۸۲۸ مگاپاسکال در نمونه‌های کیتوسان-سیلیکا هستند که با حضور دارو به ۶۶۸ کاهش می‌یابد. اما این نمونه‌ها، ازدیاد طول در نقطه شکست بسیار کمی بین ۲ تا ۵ درصد دارند.

mekanikي کششی یک روش رایج برای بررسی خواص مکانیکی غشاها تولید شده است که پارامترهای اصلی مدول یانگ، استحکام مکانیکی و ازدیاد طول (%) را محاسبه می‌کند. این پارامترها در نمونه‌های در جدول ۵ خلاصه شده اند. نمونه‌های TEOS و TEOS-lid (بدون کیتوسان) بسیار نازک و شکننده بودند لذا امکان آماده‌سازی آن‌ها برای ارزیابی با این تست

جدول ۲: پارامترهای زیری نمونه‌های هیبرید سل-ژل

$S_{ds}$ ( $\mu\text{m}^2$ )	$S_q$ (nm)	$S_a$ (nm)	نام نمونه‌ها
۳۶/۳	۱۱/۶	۹/۱۶	TEOS-lid
۲/۴۴	۱۴۹	۱۱۸	TEOS-Cs
۲۵/۳	۱۳/۴	۱۰/۸	TEOS-Cs-lid

نماینده Nm

جدول ۳: قطر متوسط تخلخل و مساحت سطح نمونه‌های هیبرید سل-ژل به روش آزمون BET

مساحت سطح با BET ( $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ )	قطر متوسط تخلخل (nm)	نام نمونه‌ها
۵/۹	۴/۵	TEOS-lid
۷۸/۵	۱/۸	TEOS-Cs
۲/۲	۴/۱	TEOS-Cs-lid

نماینده Nm  $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ 

جدول ۴: زاویه تماسی ایستای آب فیلم‌های TEOS-Cs-lid و TEOS-lid

TEOS-Cs-lid	TEOS-Cs	TEOS-lid	نام نمونه
$۶۶/۷ \pm ۲/۰۱$	$۱۰۰/۷ \pm ۵/۰۴$	$۶۴/۳ \pm ۱/۰۷$	زاویه تماس آب (°)

درجه °

جدول ۵: پارامترهای تست مکانیکی کششی فیلم‌های نازک TEOS-Cs-lid و TEOS-Cs

نام نمونه	ضخامت ( $\mu\text{m}$ )	مدول یانگ (MPa)	ازدیاد طول در نقطه شکست (%)	استحکام کششی در نقطه شکست (MPa)
TEOS-Cs	۱۱۰	۴/۸	۸۲۸/۶	۳۲
TEOS-Cs-lid	۵۰	۲/۴	۶۶۸/۰	۱۳/۸

نماینده Mpa  $\mu\text{m}$ 

رهایش دارو، میزان جذب نور هر نمونه در طول موج ۲۶۳ نانومتر اندازه‌گیری شده است. نتایج آزمون رهایش برون تن داروی لیدوکائین هیدروکلراید از نمونه‌های حاوی داروی TEOS-lid و TEOS-Cs-lid در شکل ۵ نشان داده شده است؛ و نتایج حاکی از آن است که افزودن کیتوسان رهایش انفجاری اولیه را تا حدی

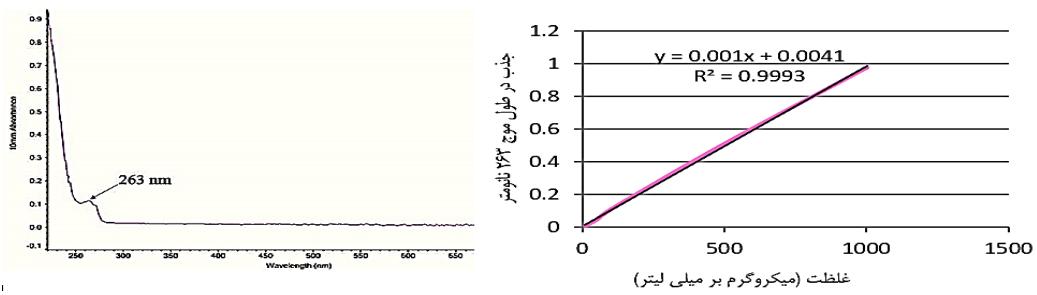
منحنی استاندارد لیدوکائین هیدروکلراید که در شکل ۴ ارائه شده است، تقریباً خطی ( $y = 0.9993x + 0.0041$ ) است. معادله خطی منحنی ( $y = 0.9993x + 0.0041$ ) میزان جذب نور UV و غلاظت دارو را به هم مرتبط می‌کند. برای رسم منحنی استاندارد و مطالعه آزمون رهایش دارو

آزمون پس از ۱، ۳ و ۷ روز در معرض عصاره نمونه‌ها قرار گرفته و سپس مورد بررسی قرار گرفتند. سطح آب‌گریز نمونه سیلیکایی خالص و چاهک ظرف کشت، به ترتیب نمونه‌های شاهد مثبت و منفی بودند. نتایج این آزمون، در تمام نمونه‌ها زنده‌مانی بالای ۸۰ درصد را نشان داد که بیانگر زیست‌سازگاری نمونه‌هاست؛ بین نتایج MTT نمونه‌ها، تفاوت معناداری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). آزمون برای هرنمونه، سه بار تکرار و نتیجه آخر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف از معیار گزارش شده است.

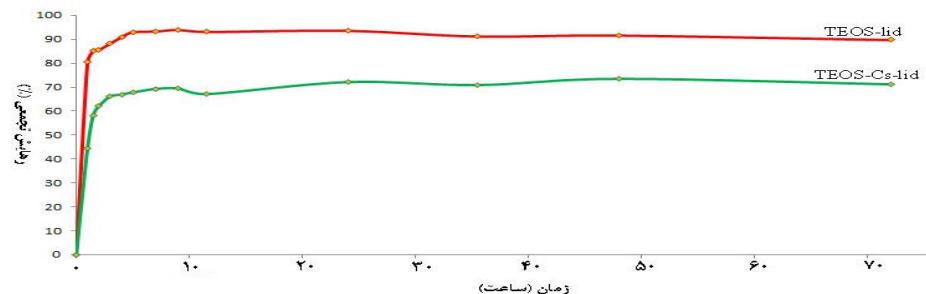
کاهش می‌دهد. همچنین پس از ۷۲ ساعت، حدود ۷۰ درصد از محتوای داروی نمونه حاوی کیتوسان آزاد می‌شود.

### بررسی زیست‌سازگاری با آزمون MTT

توسط آزمون غیر مستقیم MTT، سمیت سلولی برون تن زروزل‌های سیلیکایی تحقیق شد. گروه پایه TEOS (یعنی TEOS-Cs-lid، TEOS-lid و TEOS-Cs) طبق پروتکل استاندارد ISO 10993-5 برای ۲۴ ساعت، عصاره‌گیری شدند. سپس عصاره آن‌ها به هر چاهک ظرف کشت سلولی اضافه شدند. این چاهک‌ها، حاوی رده سلول‌های فیبریلاست A431 بودند که از قبل، کشت و پاساز داده شده و در این



شکل ۴: منحنی استاندارد و ماکزیمم طول موج جذب لیدوکایین هیدروکلراید



شکل ۵: نتایج آزمون رهایش برون تن داروی لیدوکایین هیدروکلراید از نمونه‌های حاوی داروی TEOS-CS-lid و TEOS-lid

هیدروکلراید کیتوسان سیلیکایا اتفاق افتاده است، تایید کردند. پیک‌های  $3600\text{--}3200\text{--}1100\text{--}1110\text{ cm}^{-1}$ ،  $1000\text{--}1110\text{ cm}^{-1}$ ،  $760\text{--}1260\text{ cm}^{-1}$  و  $440\text{ cm}^{-1}$  مربوط به همپوشانی باندهای جذبی ارتعاشات C-O-R، Si-O-Si، C-O و Si-C (همچنین ارتعاشات کششی گروه‌های هیدروکسیل متصل به اتم‌های کربن) (۳۶). این پیوندهای قوی کوالانسی بیشتر از پیوند ضعیف Si-N در بین سیلان‌ها و

### بحث

در این تحقیق، بیopolymer کیتوسان به محلول اضافه شد؛ در راستای مطالعات پیشین، کیتوسان قادر است برخی از خواص فیزیکی (مانند انعطاف‌پذیری) زروزل‌های سیلیکایی را بهبود دهد. نتایج FTIR زروزل‌های سیلیکایی را بهبود دهد. نتایج ۲ زروزل‌های تهیه شده به روش سل-ژل که در شکل ۲ نمایش داده شده‌اند، واکنش سل-ژل را که در نمونه‌های

توده‌های  $\text{SiO}_2$  است (۳۷). این برجستگی‌ها در تصاویر FE-SEM نیز نمایان هستند. با توجه به جدول ۲ و شکل ۳، می‌توان ادعا کرد که سطح TEOS-Cs صافتر دو نمونه دیگر است که می‌تواند به علت ممانعت کیتوسان از تشکیل توده‌های سیلیکایی باشد. به همین ترتیب، می‌توان سطح زبرتر نمونه TEOS-lid را نسبت به TEOS-Cs-lid توضیح داد. اینطور به نظر می‌رسد که افزودن لیدوکایین هیدروکلراید، ویسکوزیته سل را کاهش داده که در نتیجه آن حرکت زنجیره‌های پلیمری تسهیل می‌شود. این امر موجب سهولت واکنش‌های مرحله تراکم، و تجمع بیشتر ذرات سیلیکایی می‌شود. همچنین نتایج AFM، احتمال وجود ساختاری در حد نانو در نمونه‌ها را نشان می‌دهند که با آزمون BET، بررسی شد. از آنجایی که تخلخل زروژل‌های حاوی دارو نقش حیاتی در سینتیک رهایش آن‌ها دارند، قطر متوسط تخلخل‌ها، مساحت سطح نمونه‌ها با روش BET اندازه‌گیری شد. از مطالعات قبلی و نتایج این آزمون، می‌توان به طور واضح مشاهده کرد که اندازه متوسط قطر تخلخل‌ها با افزودن کیتوسان به ترتیب کاسته شده در حالی که مساحت سطح افزایش یافته است (۴۱، ۳۶). آیرز (Ayers) و همکارانش گزارش کردند که پیوندهای هیدروژنی بین کیتوسان و سیلیکا، باعث کاهش واکنش‌های گروه‌های هیدروکسیل در مرحله تراکم و کاهش انقباض ژل می‌شود. البته افزایش بیشتر محتوای کیتوسان مساحت سطح را کاهش می‌دهد چون تمامی کیتوسان به طور کامل حل نمی‌شود (۴۲). نکته جالب توجه TEOS-Cs-lid، این است که قطر متوسط تخلخل نمونه دیگر، بیشتر از نمونه TEOS-Cs است. معمولاً در حین خشک شدن ژلهای سیلیکا، با تراکم گروه‌های سیلانول درون تخلخل‌ها، ساختار ژل منقبض می‌شود و در نتیجه اندازه تخلخل کاهش می‌یابد. اما ذره‌های چگال سیلیکایی، استحکام ژل را افزوده و مکان‌های دسترسی گروه‌های سیلانول را برای واکنش‌های تراکم درونی، کاهش می‌دهد. در نتیجه، انقباض ژل در حین خشک شدن، کمتر می‌شود (۴۲، ۴۳). همچنین، با توجه به مطالعات و نتایج آزمون‌های

کیتوسان تشکیل می‌شود. به منظور بررسی ریخت Morphology سطح فیلم‌های سیلیکایی و ساختار سطح مقطع آن‌ها، از روش FE-SEM استفاده شد. با توجه به مطالعات قبلی زروژل‌های کاتالیز شده اسیدی بسیار ساختار متراکم‌تری دارند و علت کمتر بودن شاخه‌های جانبی پلیمرها است که در حین فرآیند خشک شدن می‌توانند به سهولت در هم نفوذ کنند (۳۸). شکل SEM همچنین نشان می‌دهد که سطح و ساختار زروژل‌های TEOS، با افزودن کیتوسان به ترکیب نمونه هیبریدی، صافتر و شل‌تر (Looser) شده است چون کیتوسان، پلی‌ساقاریدی است که مقدار زیادی گروه‌های هیدروکسیل دارد که در واکنش‌های مرحله تراکم فرآیند هیدروکسیل دارد. در حین این واکنش پیوند ژل دخالت دارند. در حین هیدروکسیل تشکیل Clusters میان گروه‌های سیلانول و هیدروکسیل شده و از رشد خوش Clusters های سیلیکایی ممانعت می‌کند. علاوه بر این ذره‌های جوانه زنی سیلیکا، به عنوان یک فاز متراکم و در شکل کره‌های سفید غیرآلی در ریزساختار نمونه‌های lid و TEOS-lid مشاهده می‌شوند که در نمونه lid TEOS-Cs-lid کوچک‌تر هستند (۳۹). این ممکن است به علت اضافه کردن لیدوکائین هیدروکلراید به محلول سل باشد که ویسکوزیته را کاهش داده و نفوذ Diffusion گروه‌های سیلانول را تسهیل کرده است. از طرفی خاصیت اسیدی محلول هیدرولیز را افزایش می‌دهد. گروه‌های سیلانول در حین هیدرولیز آغازگر (TEOS) تشکیل می‌شوند. در نهایت، با توجه به شکل ۲، هیچ جدایش فازی در نمونه‌ها مشاهده نمی‌شود و ذره‌های سیلیکایی به طور یکنواخت در نمونه TEOS-lid پراکنده شده‌اند که می‌تواند واکنش خوب میان زنجیره‌های پلیمری کیتوسان و سیلیکا را در راستای نتایج FTIR نشان دهد (۱۱، ۴۰). از تصویر AFM نمونه TEOS-Cs نیز می‌توان دریافت که شبکه سیلیکایی درون زنجیره‌های پلیمری کیتوسان یکنواخت توزیع شده است که با نتایج FTIR نیز قابل تایید است. در حالی که نمونه‌های حاوی دارو، برجستگی‌هایی دارند که احتمالاً نشان‌دهنده

پیوسته و ثابت رها کند، می‌تواند به‌طور موثری سازگاری بیمار را بهبود بخشد و عوارض جانبی مضر را از بین ببرد. با توجه به نتایج آزمون رهایش، پس از ۷۲ ساعت، رهایش تجمعی دارو، به ۸۶ درصد از نمونه TEOS-lid و ۷۱ درصد از نمونه TEOS-Cs-lid رسیده است، رهایش انفجاری در نمونه دوم، به طرز قابل توجهی کاسته شده است. نتایج نمونه TEOS-Cs-lid نشان می‌دهد که افزودن کیتوسان به کنترل بهتر رهایش دارو کمک کرده است. هم‌چنان رهایش انفجاری اولیه از نمونه‌های سیلیکایی ممکن است مربوط به حل شدن داروهای قرار گرفته در سطوح خارجی زروژل‌ها و تورم نمونه‌ها پس از غوطه‌وری در محیط PECF باشد. پس از آن، یک رفتار رهایش دارای ثبات در مرحله دوم مشاهده می‌شود که احتمالاً مربوط به‌داروی به دام افتاده در حفرات زروژل‌هاست. قابل ذکر است که نمونه‌های TEOS-lid پس از ۲۴ ساعت، به قطعات کوچکتر خرد می‌شوند اما نمونه‌های TEOS-Cs-lid تا انتهای زمان آزمون به‌شکل اولیه باقی می‌مانند. منحنی رهایش شکل ۵ را می‌توان با دو رویکرد مختلف توضیح داد:

۱.۱.۱ اثر خواص ساختاری زروژل روی رهایش دارو با در نظر گرفتن نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های SEM، AFM و BET، افزودن کیتوسان به ماتریس سیلیکایی منجر به کاهش اندازه متوسط تخلخل و زبری سطح نمونه شده است. پس انتظار داریم که کاهش این دو پارامتر، ترخ رهایش را کمتر کنند که با نتایج به‌دست آمده حاصل شد.

۱.۱.۲ فعل و انفعالات بین دارو، کیتوسان و شبکه سیلیکایی سه فعل و انفعال، روی نرخ رهایش دارو اثر می‌گذارد:

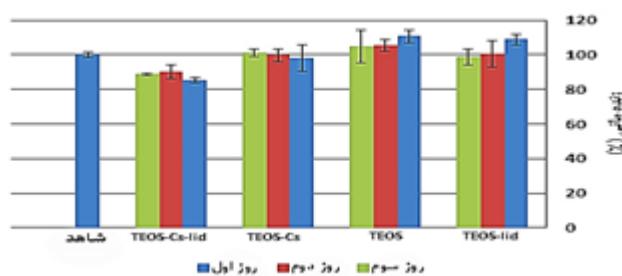
- (۱) فعل و انفعالات الکتروستاتیک،
- (۲) پیوند هیدروژنی
- (۳) فعل و انفعالات آب‌گریز (۶).

فعل و انفعالات الکتروستاتیک، بین زروژل‌های سیلیکایی، لیدوکایین هیدروکلراید و کیتوسان وجود دارد. زروژل‌های سیلیکایی از واحدهای سیلوکسان متصل به‌هم تشکیل شده‌اند. اگر برای سنتز آن‌ها از آغازگر ارگانوسیلان

دیگر، مساحت سطح کم نمونه TEOS-lid نشان‌دهنده ساختاری با تخلخل کمتر (۴۴،۴۳) و ناخالصی‌های جامد (۴۲) است. با ارزیابی زاویه تماسی ایستای آب برای فیلم‌های TEOS-lid و TEOS-Cs می‌توان مشاهده کرد که، با افزودن کیتوسان به فرمولا‌سیون پایه TEOS، زاویه تماسی آب کاهش پیدا می‌کند یعنی سطح آبدوست‌تر می‌شود. علت این امر، ممکن است با حضور گروه‌های هیدروکسیل بیشتر رو سطح، که در واقع مکان‌هایی برای ایجاد پیوند هیدروژنی با آب هستند، قابل توجیه باشد. از طرف دیگر، پیوندهای هیدروژنی بین زنجیره‌های سیلیکا و کیتوسان، باعث کاهش آبدوستی نسبت به کیتوسان خالص هم هست (۴۵). به علاوه زروژل حاوی دارو آبدوست‌تر از زروژل‌های بدون دارو هستند. این آبدوستی به علت ذره‌های سیلیکا (زبری بیشتر سطح) یا ماهیت آبدوست لیدوکایین هیدروکلراید است. شبکه سخت و انعطاف ناپذیر (Rigid) Si-O موجب کاهش درصد ازدیاد طول در نقطه شکست و افزایش مدول یانگ (که مرتبط با سفت بودن ماده است (۴۵)) و استحکام کششی فیلم کیتوسان خالص شد. این امر به علت افزایش پیوندهای هیدروژنی درون ماده هیبرید است (۴۹-۴۶). پس با توجه به منحنی تنش-کرنش نمونه‌ها، فیلم‌های نازک و TEOS-Cs TEOS-Cs-lid انعطاف پذیری نسبتاً پایینی دارند. از طرف دیگر، زروژل TEOS-Cs-lid ضخامت، مدول یانگ و استحکام کمتر، و ازدیاد طول بیشتری نسبت به فیلم TEOS-Cs دارد. در واقع افزودن دارو (لیدوکایین هیدروکلراید) مدول یانگ و ازدیاد طول ماتریس سیلیکایی را کاهش داده است، که ممکن است به ترتیب، به‌دلیل خاصیت روان‌سازی دارو و تشکیل ذرات متراکم سیلیکایی در ساختار فیلم حاوی دارو باشد (۳۷). لیدوکایین هیدروکلراید یک عامل بی‌حسی موضعی است که کاتالیز یون سدیم را می‌بندد. این دارو به‌طور گستره‌هایی، برای کاهش درد استفاده می‌شود. اما این دارو، طول عمر نسبتاً کوتاهی (تنها ۱/۵ تا ۲ ساعت) دارد. چون گروه آمید و در نتیجه متابولیسم سریعی در کبد دارد. بنابراین زخم پوشی که این دارو را به‌طور

کیتوسان و گروههای سیلانول، منجر به حل شدن آهسته‌تر ماتریس و حفظ ساختار بهتر و در نتیجه کنترل بیشتر نرخ رهایش دارو و کاهش مقدار رهایش انفحاری اولیه می‌شود. این فرضیات، با داده‌های حاصل از آزمایش، تایید شدند. برهمکنش‌های آب‌گریز، نیز بین لیدوکایین هیدروکلرايد و زروژل‌ها اتفاق می‌افتد. با پیوند کوالانسی گروههای آلی به شبکه سیلیکایی، آب‌گریزی افزایش پیدا می‌کند. آب‌گریزی بیشتر زمینه، رفتار رهایش دارو به گونه‌ای کنترل می‌کند که رهایش دارو، در محیط آبی کاسته می‌شود. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، رهایش از هیبرید TEOS-Cs-lid کمتر از ماتریس سیلیکای خالص حاوی دارو، است و به مدت ۷۲ ساعت به طول می‌انجامد. برای آنکه ثابت شود نمونه‌های به دست آمده، جهت کاربردهای پزشکی مناسب هستند، آزمون غیرمستقیم MTT انجام شد؛ با در نظر گرفتن پروتکل استاندارد MTT انجام شد؛ با در نظر گرفتن پروتکل استاندارد MTT یک نمونه مشخص زمانی برای سلول سمی محسوب می‌شود که درصد زنده‌مانی سلول، کمتر از ۷۰ درصد باشد. بنابراین، با توجه به شکل ۶، به وضوح مشاهده می‌شود که تمام زروژل‌های سیلیکایی و میزان داروی آزاد شده از آن‌ها، زیست‌سازگار بوده و روی سلول‌های فیبروبلاست اثر سمیت ندارد.

استفاده شده باشد، گروههای عاملی در سطح آن‌ها اغلب، گروههای سیلانول و آلی است. گزارش شده است که فرآیند سل ژل تک مرحله‌ای با کاتالیزگر اسیدی، گروههای سیلانول کمتری روی سطح نمونه سیلیکا را ایجاد می‌کند. به علاوه، این گروه‌ها بسته به ماهیت محیط اطرافشان (اگر محلول باشند) تغییر می‌کنند. بنابراین، با رطوبتی زروژل سیلیکایی، به pH محلول (که از ۶ تا ۱۱ به سرعت تغییر می‌کند) بستگی دارد. pH محیط PECEF، تقریباً ۸ است، پس زروژل در این محلول، بار منفی دارد. از طرف دیگر، لیدوکایین هیدروکلرايد بیشتر به صورت کاتیون‌های شدن در محیط وجود دارد. در نتیجه، یک جاذبه الکتروستاتیک بین زروژل‌های خالص سیلیکا و دارو است. با توجه به موارد ذکر شده، افزودن کیتوسان (که یک پلیمر کاتیونی است)، باعیستی نرخ رهایش داروی لیدوکایین هیدروکلرايد را از ترکیب هیبریدی افزایش دهد که در شکل ۵ این طور مشاهده نمی‌شود. پس برهمکنش دیگر اثر فعل و انفعالات الکتروستاتیک را خنثی می‌کند. پیوند هیدروژنی، یک برهمکنش بسیار رایج موجود بین دارو و زمینه سل ژل است. از آنجایی که گروههای سیلانول بیشتری در ماتریس سیلیکایی خالص نسبت به هیبرید TEOS-Cs-lid هستند، احتمالاً دارو پیوند هیدروژنی قوی‌تری با سطح نمونه‌های خالص برقرار می‌کند. از طرف دیگر، پیوند هیدروژنی



شکل ۶: نتایج MTT زروژل‌های سیلیکایی

شیمیایی موجود در ساختار (برای مثال پیوند کوالانت بین زنجیره کیتوسان (فاز آلی) و شبکه سیلیکا (فاز غیرآلی)) در نمونه‌های هیبرید (ثابت شد. خواص مورفو‌لوزی ساختار و AFM سطح نمونه‌ها با استفاده از آزمون‌های SEM و بررسی گردید. نتایج حاصل از آزمون SEM نشان داد که

## نتیجه‌گیری

سیلیکای خالص و فیلم کیتوسان-سیلیکا (حاوی دارو و بدون آن)، با آغازگر تترا اورتوسیلیکات (TEOS)، به روش سل ژل، طی مسیر هیدرولیز و تراکم در شرایط اسیدی ساخته شد. با استفاده از آزمون FTIR، حضور پیوندهای

آزمون MTT، ارزیابی و نتایج حاکی از زیستسازگاری مناسب لایه‌های سیلیکا و کیتوسان- سیلیکا بود، که در نتیجه ساختارهای ذکر شده را به‌گزینه مناسبی برای کاربردهای پزشکی، تبدیل می‌کند.

### سپاس‌گزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه شهرزاد زیرک حسن کیاده در مقطع کارشناسی ارشد در رشته مهندسی پزشکی گرایش مهندسی بافت می‌باشد. از تمامی افرادی که ما را در این پژوهه یاری کرده‌اند، سپاس‌گزاری می‌کنیم.  
حامی مالی: ندارد.  
تعارض در منافع: وجود ندارد.

نمونه‌های هیرید، بهشت متخلخل و به آزمون تکمیلی BET، نانو ساختار هستند. با توجه به نتایج AFM، می‌توان ادعا کرد که حضور کیتوسان زیری سطح را کاهش می‌دهد و اندازه تخلخل را نیز کاهش می‌دهد. همچنین نرخ رهایش دارو از قطعات سیلیکای خالص و کیتوسان- سیلیکا ارزیابی گردید، که هر دو یک انفجار اولیه در ۱ ساعت اول نشان دادند و بازده دارورسانی نمونه‌ها به ترتیب ۸۶٪ و ۷۱٪ بود؛ مشاهدات حاکی از کاهش اندازه تخلخل و در نتیجه کاهش نرخ رهایش با افزودن کیتوسان به ماتریس سیلیکای خالص بود. خواص مکانیکی کششی این فیلم کیتوسان- سیلیکا نیز نشان داد، که با افزودن دارو، استحکام کششی، از ۳۲ به ۱۴/۴ مگاپاسکال کاسته می‌شود. در پایان، سمیت سلولی فیلم‌های سیلیکایی توسط

### References:

- 1-Owens GJ, Singh RK, Foroutan F, Alqaysi M, Han C-M, Mahapatra C, et al. *Sol-Gel Based Materials for Biomedical Applications*. Progress in Materials Sci 2016; 77: 1-79.
- 2-Teoli D, Parisi L, Realdon N, Guglielmi M, Rosato A, Morpurgo M. *Wet Sol-Gel Derived Silica for Controlled Release of Proteins*. J Controlled Release 2006; 116(3): 295-303.
- 3-Prokopowicz M. *Silica-Polyethylene Glycol Matrix Synthesis by Sol-Gel Method and Evaluation for Diclofenac Diethyloammonium Release*. Drug Delivery 2007; 14(3): 129-38.
- 4-Spirk S, Findenig G, Doliska A, Reichel VE, Swanson NL, Kargl R, et al. *Chitosan-Silane Sol-Gel Hybrid thin Films with Controllable Layer Thickness and Morphology*. Carbohydrate Polymers 2013; 93(1): 285-90.
- 5-Jeon HJ, Yi SC, Oh SG. *Preparation and Antibacterial Effects of Ag-Sio2 Thin Films by Sol-Gel Method*. Biomaterials 2003; 24(27): 4921-8.
- 6-Wu Z, Joo H, Lee TG, Lee K. *Controlled Release of Lidocaine Hydrochloride from the Surfactant-Doped Hybrid Xerogels*. J Controlled Release 2005; 104(3): 497-505.
- 7- Ahola M, Kortesuo P, Kangasniemi I, Kiesvaara J, Yli-Urpo A. *Silica Xerogel Carrier Material for Controlled Release of Toremifene Citrate*. International J Pharmaceutics 2000; 195(1-2): 219-27.
- 8-Mofakham EB, Ghaee A, Mashak A, Razzaghi-Abyanah M. *Progesterone Release from PDMS-Modified Silica Xerogels Containing Ag Nanoparticles*. Silicon 2019; 11(2): 703-11.

- 9-Shchipunov YA, Karpenko Tyy. *Hybrid Polysaccharide–Silica Nanocomposites Prepared by the Sol–Gel Technique*. Langmuir 2004; 20(10): 3882-7.
- 10-Silva GS, Oliveira PC, Giordani DS, Castro HF. *Chitosan/Siloxane Hybrid Polymer: Synthesis, Characterization and Performance as a Support for Immobilizing Enzyme*. J Brazilian Chem Society 2011; 22(8): 1407-17.
- 11-Zhuang GL, Tseng HH, Wey MY. *Preparation of PPO-Silica Mixed Matrix Membranes by In-Situ Sol-Gel Method for H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> Separation*. International J Hydrogen Energy 2014; 39(30): 17178-90.
- 12-Smitha S, Shajesh P, Mukundan P, Warrier K. *Sol-Gel Synthesis of Biocompatible Silica-Chitosan Hybrids and Hydrophobic Coatings*. J Materials Res 2008; 23(8): 2053-60.
- 13-Toskas G, Cherif C, Hund RD, Laourine E, Mahltig B, Fahmi A, et al. *Chitosan (PEO)/Silica Hybrid Nanofibers as a Potential Biomaterial for Bone Regeneration*. Carbohydrate Polymers 2013; 94(2): 713-22.
- 14-Silva SS, Santos MI, Coutinho O, Mano J, Reis R. *Physical Properties and Biocompatibility of Chitosan/Soy Blended Membranes*. J Materials Science: Materials in Med 2005; 16(6): 575-9.
- 15-Silva SS, Mano JF, Reis RL. *Soft Constructs for Skin Tissue Engineering*. Biomimetic Approaches for Biomaterials Development 2012: 537-57.
- 16-Varshosaz J, Jaffari F, Karimzadeh S. *Development of Bioadhesive Chitosan Gels for Topical Delivery of Lidocaine*. Scientia Pharmaceutica 2006; 74(4): 209-23.
- 17-Wang G, Xu JJ, Chen HY, Lu ZH. *Amperometric Hydrogen Peroxide Biosensor with Sol-Gel/Chitosan Network-Like Film as Immobilization Matrix*. Biosensors and Bioelectronics 2003; 18(4): 335-43.
- 18-Tan X, Li M, Cai P, Luo L, Zou X. *An Amperometric Cholesterol Biosensor based on Multiwalled Carbon Nanotubes and Organically Modified Sol-Gel/Chitosan Hybrid Composite Film*. Analytical Biochemistry 2005; 337(1): 111-20.
- 19-Liu X, Xie L, Li H. *Electrochemical Biosensor based on Reduced Graphene Oxide and au Nanoparticles Entrapped in Chitosan/Silica Sol-Gel Hybrid Membranes for Determination of Dopamine and Uric Acid*. J Electroanalytical Chem 2012; 682: 158-63.
- 20-Miao Y, Tan S. *Amperometric Hydrogen Peroxide Biosensor with Silica Sol-Gel/Chitosan Film as Immobilization Matrix*. Analytica Chimica Acta 2001; 437(1): 87-93.
- 21-Shiroasaki Y, Tsuru K, Hayakawa S, Osaka A, Lopes MA, Santos JD, et al. *Physical, Chemical and in Vitro Biological Profile of Chitosan Hybrid Membrane as a Function of Organosiloxane Concentration*. Acta Biomaterialia 2009; 5(1): 346-55.
- 22-Costache MC, Qu H, Ducheyne P, Devore DI. *Polymer-Xerogel Composites for Controlled Release Wound Dressings*. Biomaterials 2010; 31(24): 6336-43.

- 23-Krishnan C, Garnett M, Hsiao B, Chu B. *Solute-Solvent Interactions from Impedance Measurements: 'N-Way' conduction and Water Structure-Enforced Ion Pair Formation in Aqueous Lidocaine Hydrochloride.* Int J Electrochem Sci 2009; 4: 1085-99.
- 24-Rajendiran N, Mohandoss T, Saravanan J. *Guest:host interactions of lidocaine and prilocaine with natural cyclodextrins: spectral and molecular modeling studies.* Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2014, 11; 132: 387-96
- 25-Wisher D. *Martindale: The Complete Drug Reference.* J Med Libr Assoc 2012;100(1):75-6.
- 26-Singh D, Singh R. *Papain Incorporated Chitin Dressings for Wound Debridement Sterilized by Gamma Radiation.* Radiation Physics and Chem 2012; 81(11): 1781-5.
- 27-Soler DM, Rodríguez Y, Correa H, Moreno A, Carrizales L. *Pilot Scale-Up and Shelf Stability of Hydrogel Wound Dressings Obtained by Gamma Radiation.* Radiation Physics and Chem 2012; 81(8): 1249-53.
- 28-ISO E. *10993-12: 2008-Biological Evaluation of Medical Devices–Part 12: Sample Preparation and Reference Materials (ISO 10993-12: 2007).* German Version: DIN EN ISO 2008: 10993-12.
- 29-Picot J. *Human Cell Culture Protocols.* Springer Sci & Business Media; 2005.
- 30-Mirahmadi F, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA, Bonakdar S. *Enhanced Mechanical Properties of Thermosensitive Chitosan Hydrogel by Silk Fibers for Cartilage* *Tissue Engineering.* Materials Science and Engineering: C 2013; 33(8): 4786-94.
- 31-Asma C, Meriem E, Mahmoud B, Djaafer B. *Physicochemical Characterization of Gelatin-Cmc Composite Edibles Films from Polyion-Complex Hydrogels.* J Chilean Chemical Society 2014; 59(1): 2279-83.
- 32-Mangindaan D, Chen CT, Wang MJ. *Integrating Sol-Gel with Cold Plasmas Modified Porous Polycaprolactone Membranes for the Drug-Release of Silver-Sulfadiazine and Ketoprofen.* Applied Surface Sci 2012; 262: 114-9.
- 33-Rhee S-H, Choi JY, Kim HM. *Preparation of a Bioactive and Degradable Poly (E-Caprolactone)/Silica Hybrid through a Sol-Gel Method.* Biomaterials 2002; 23(24): 4915-21.
- 34-Silva SS, Ferreira RA, Fu L, Carlos LD, Mano JF, Reis RL, et al. *Functional Nanostructured Chitosan–Siloxane Hybrids.* J Materials Chem 2005; 15(35-36): 3952-61.
- 35-Copello GJ, Mebert AM, Raineri M, Pesenti MP, Diaz LE. *Removal of Dyes from Water Using Chitosan Hydrogel/Sio2 and Chitin Hydrogel/Sio2 Hybrid Materials Obtained by the Sol-Gel Method.* J Hazardous Materials 2011; 186(1): 932-9.
- 36-Budnyak TM, Pylypchuk IV, Tertykh VA, Yanovska ES, Kolodynska D. *Synthesis and Adsorption Properties of Chitosan-Silica Nanocomposite Prepared by Sol-Gel Method.* Nanoscale Research Letters 2015; 10(1): 1-10.
- 37-Atanacio AJ, Latella BA, Barbé CJ, Swain MV. *Mechanical Properties and Adhesion Characteristics of Hybrid Sol-Gel Thin Films.*

Surface And Coatings Technology 2005; 192(2-3): 354-64.

38-Ibrahim WAW, Ismail WNW, Keyon ASA, Sanagi MM. *Preparation and Characterization of a New Sol-Gel Hybrid Based Tetraethoxysilane-Polydimethylsiloxane as a Stir Bar Extraction Sorbent Materials*. J Sol-Gel Sci and Technology 2011; 58(3): 602-11.

39-El Nahrawy A, Hammadi AA, Turky G, Elnasharty M, Youssef A. *Synthesis and Characterization of Hybrid Chitosan/Calcium Silicate Nanocomposite Prepared Using Sol-Gel Method*. Intl J Adv Eng, Technol Comput Sci 2015; 2(1): 9-14.

40-Trujillo S, Pérez-Román E, Kyritsis A, Gómez Ribelles JL, Pandis C. *Organic-Inorganic Bonding in Chitosan-Silica Hybrid Networks: Physical Properties*. J Polymer Science Part B: Polymer Physics 2015; 53(19): 1391-400.

41-Lee EJ, Jun SH, Kim HE, Kim HW, Koh YH, Jang JH. *Silica Xerogel-Chitosan Nano-Hybrids for Use as Drug Eluting Bone Replacement*. J Materials Science: Materials in Med 2010; 21(1): 207-14.

42-Ayers MR, Hunt AJ. *Synthesis and Properties of Chitosan-Silica Hybrid Aerogels*. J Non-Crystalline Solids 2001; 285(1-3): 123-7.

43-Smitha S, Mukundan P, Pillai PK, Warrier K. *Silica-Gelatin Bio-Hybrid and Transparent Nano-Coatings through Sol-Gel Technique*. Materials Chem and Physics 2007; 103(2-3): 318-22.

44-Nampi PP, Mohan VS, Sinha AK, Varma H. *High Surface Area Sol-Gel Nano Silica as a Novel Drug Carrier Substrate for Sustained Drug Release*. Materials Research Bulletin 2012; 47(6): 1379-84.

45-Lima KO, Biduski B, Da Silva WMF, Ferreira SM, Montenegro LMP, Dias ARG, et al. *Incorporation of Tetraethylorthosilicate (TEOS) in Biodegradable Films based on Bean Starch (Phaseolus Vulgaris)*. European Polymer J 2017; 89: 162-73.

46-Lemos EM, Carvalho SM, Patrício PS, Donnici CL, Pereira MM. *Comparison of the Effect of Sol-Gel and Coprecipitation Routes on the Properties and Behavior of Nanocomposite Chitosan-Bioactive Glass Membranes for Bone Tissue Engineering*. J Nanomaterials 2015; 2015.

47-Cho SJ, Bae IS, Jeong HD, Boo JH. *A Study on Electrical and Mechanical Properties of Hybrid-Polymer Thin Films by a Controlled TEOS Bubbling Ratio*. Applied Surface Sci 2008; 254(23): 7817-20.

48-Lee EJ, Shin DS, Kim HE, Kim HW, Koh YH, Jang JH. *Membrane of Hybrid Chitosan-Silica Xerogel for Guided Bone Regeneration*. Biomaterials 2009; 30(5): 743-50.

49-Yeh JT, Chen CL, Huang KS. *Synthesis and Properties of Chitosan/Sio2 Hybrid Materials*. Materials Letters 2007; 61(6): 1292-5.

## Synthesis and Study of Lidocaine Hydrochloride from Polymeric Film as a Wound Dressing

Shahrzad Zirak Hassan Kiadeh<sup>1</sup>, Azadeh Ghaee<sup>2</sup>,  
Javad Mohammadnejad arough<sup>†3</sup>, Arezou Mashak<sup>4</sup>

### Original Article

**Introduction:** Among various carrier materials capable of drug controlled-release, silica xerogels have been found to be noteworthy for loading and sustaining drug release. These silica xerogels were synthesized through sol-gel technology using Tetraethylortosilicate (TEOS) as a silica precursor.

**Methods:** This study was an experimental basic research, which aimed to characterize the effect of adding chitosan to silica xerogels on Morphology, surface area and topography as well as mechanical behavior of the hybrid films. Furthermore, the lidocaine hydrochloride was incorporated on to the hybrid chitosan-silica xerogels and drug release behavior of the hybrid xerogels was evaluated and compared with pure silica xerogels. In addition, the covalent bond between chitosan chains and silica network was verified by FTIR; MTT assay was performed to evaluate cytotoxicity of the final system.

**Results:** The release profile of hybrid xerogels showed biphasic mode of release and approximately 71 % accumulative release rate. Chitosan slightly decreased burst effect and release rate, but extended release period in comparison with silica xerogel. Moreover, blending of chitosan and TEOS enhanced tensile elongation and reduced the average pore size of TEOS-based xerogels.

**Conclusion:** In conclusion, this in vitro study showed that the sol-gel method is useful for entrapping lidocaine hydrochloride in the pores of xerogels and its controlled release. Likewise, blending of chitosan and TEOS improves tensile mechanical properties of resulted biocompatible films. Hence, the final organic-inorganic films are capable to be applied as a coating or thin films in biomedical applications.

**Keywords:** Chitosan-silica network, Drug delivery, Wound dressing

**Citation:** Zirak Hassan Kiadeh SH, Ghaee A, Mohammadnejad arough J, Mashak A. **Synthesis and Study of Lidocaine Hydrochloride from Polymeric Film as a Wound Dressing.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2020; 28(8): 2934-50.

<sup>1-3</sup>Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran.

<sup>4</sup>Iran Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, Iran.

\*Corresponding author: Tel: 09124186330, email: Mohammadnejad@ut.ac.ir