**مواد و روش‌ها**

**2.1. مواد**

در این مطالعه، تمامی مواد شیمیایی و معرف‌های به‌کاررفته از درجه خلوص آزمایشگاهی بوده و بدون هیچ‌گونه تصفیه یا آماده‌سازی اضافی مورد استفاده قرار گرفتند. ژلاتین (کد 104070)، GPTMS (کد 841807)، محلول 25 درصد گلوتارآلدهید در آب (کد 354400) و استون (کد 107021) به‌عنوان مواد اصلی برای سنتز میکروحامل‌های ژلاتینی (GMs) از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. تنها استثنا استونی بود که در حجم زیاد برای فیلتراسیون و شست‌وشوی کامل میکروحامل‌ها استفاده شد که این استون از شرکت Neutron Pharmachemical Co، تهران، ایران تهیه گردید. برای آزمون‌های آنتی‌باکتریال و رهایش دارو، پودر آنتی‌بیوتیک (Vancomax® 500mg، وانکومایسین هیدروکلراید) از شرکت داروسازی دنا (تبریز، ایران) خریداری شد.

**2.2. ساخت میکروحامل‌های بدون دارو**

به طور کلی، میکروحامل‌های ژلاتینی (GMs) با روش **امولسیون-استخراج حلال** تهیه شدند. به‌طور خلاصه، 2.5 گرم ژلاتین در 25 میلی‌لیتر آب دیونیزه در دمای حدود 50 درجه سانتی‌گراد حل شد. محلول شفاف حاصل به صورت قطره‌ای به 125 میلی‌لیتر روغن زیتون تصفیه‌شده و از پیش‌گرم‌شده اضافه شد و هم‌زمان با سرعت 500 دور در دقیقه توسط همزن مکانیکی مخلوط گردید. این فرایند منجر به تشکیل و پراکندگی یکنواخت میکروحامل‌ها در امولسیون آب در روغن شد. سپس سیستم امولسیون به‌وسیله حمام یخ سرد شد. بعد از 30 دقیقه، 50 میلی‌لیتر استون سرد و 0.5 میلی‌لیتر گلوتارآلدهید به‌طور ملایم اضافه گردید تا آب باقی‌مانده استخراج و هم‌زمان میکروحامل‌ها شبکه‌ای (crosslink) شوند. امولسیون به مدت یک ساعت دیگر هم زده شد و سپس میکروحامل‌ها توسط فیلتراسیون جمع‌آوری و چندین بار با استون (حدود 1.5 لیتر) شسته شدند تا روغن زیتون باقی‌مانده کاملاً حذف گردد. در نهایت، میکروحامل‌های جمع‌آوری‌شده به‌طور کامل با استفاده از خلأ در طول شب خشک شدند و برای آزمون‌های بعدی ذخیره گردیدند. این دسته به‌عنوان میکروحامل‌های شبکه‌ای‌شده با گلوتارآلدهید (G-GA) شناخته شدند.

برای ساخت میکروحامل‌های شبکه‌ای‌شده با GPTMS، شرایط سنتز کمی تغییر داده شد. این تغییر به دلیل مکانیسم متفاوت واکنش شبکه‌ای‌شدن GPTMS بود که یک واکنش تدریجی نوع سل-ژل محسوب می‌شود. بدین منظور، مقدار مناسبی GPTMS (1.25 میلی‌لیتر، معادل 50 درصد وزنی نسبت به ژلاتین) مستقیماً به 25 میلی‌لیتر محلول 10 درصد وزنی ژلاتین اضافه گردید. سپس محلول به‌مدت 2 ساعت در دمای 40 درجه سانتی‌گراد با همزن مغناطیسی مخلوط شد تا سُل پیش‌ماده تشکیل شود. در مرحله بعد، این محلول به‌صورت قطره‌ای به 125 میلی‌لیتر روغن زیتون پیش‌گرم‌شده افزوده شد و در همان سرعت هم‌زدن (500 دور در دقیقه) قرار گرفت. امولسیون تشکیل‌شده به مدت‌های مختلف (5، 10، 24 و 48 ساعت) در دمای ثابت 40 درجه سانتی‌گراد هم زده شد تا واکنش پیری و شبکه‌ای‌شدن کامل شود. سپس مراحل بعدی مطابق روش پیش‌فرض شامل سردکردن، افزودن استون، فیلتراسیون، شست‌وشو و خشک‌کردن انجام گرفت. برای سهولت، میکروحامل‌های ساخته‌شده با GPTMS در زمان‌های مختلف با کدهای G-GP-5، G-GP-10، G-GP-24 و G-GP-48 مشخص شدند.

همچنین میکروحامل‌های بدون شبکه‌ای‌شدن (Gel) نیز با روش پیش‌فرض ساخته شدند، با این تفاوت که هیچ عامل شبکه‌ای‌کننده‌ای به کار نرفت و این نمونه‌ها به‌عنوان کنترل در آزمون‌های بعدی استفاده شدند.

**2.3. بارگذاری وانکومایسین در میکروحامل‌ها**

برای بارگذاری وانکومایسین (Vm) در میکروحامل‌های شبکه‌ای‌شده، از خاصیت تورمی آن‌ها استفاده گردید. به طور خلاصه، 100 میلی‌گرم از هر نوع میکروحامل شبکه‌ای‌شده با افزودن قطره‌ای محلول Vm متورم شد. طی این فرایند، میکروحامل‌ها به آرامی تکان داده شدند تا تمام ذرات به‌طور یکنواخت در معرض جذب محلول دارو قرار گیرند. مقدار محلول دارو متناسب با قابلیت جذب آب هر نمونه بود. میکروحامل‌های G-GA به دلیل تورم زیاد، بیشترین جذب محلول دارو (500 میکرولیتر) را داشتند. نمونه‌های G-GP-5 و G-GP-10 به ترتیب 400 و 350 میکرولیتر محلول را جذب کردند، در حالی که G-GP-24 و G-GP-48 کمترین جذب (250 میکرولیتر) را نشان دادند. چون مقدار محلول دارو کمتر از حجم تورمی تئوری هر نمونه بود، کل محلول جذب شد که این امر امکان تعیین دقیق مقدار اولیه دارو و سپس پایش آزادسازی را فراهم کرد. میکروحامل‌های بارگذاری‌شده با Vm به مدت 24 ساعت انجماد-خشک شدند و برای آزمون‌های بعدی ذخیره شدند. لازم به ذکر است محلول دارو در غلظت‌های 5 و 25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد که اولی برای آزمون آزادسازی دارو و دومی برای مطالعات آنتی‌باکتریال استفاده گردید.

**2.4. مشخصه‌یابی میکروحامل‌ها**

* **بررسی مورفولوژی و اندازه ذرات:** با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) انجام شد و میانگین اندازه‌ها با نرم‌افزار ImageJ محاسبه گردید.
* **بررسی تغییرات شیمیایی:** طیف‌سنجی FTIR برای ارزیابی موفقیت شبکه‌ای‌شدن استفاده شد.
* **درصد شبکه‌ای‌شدن:** با آزمون نینهیدرین و مقایسه درصد گروه‌های آمینی آزاد قبل و بعد از شبکه‌ای‌شدن تعیین شد.
* **رفتار تورمی:** با غوطه‌وری در آب دیونیزه و بررسی میکروسکوپی پس از 24 ساعت انجام گرفت.
* **تجزیه در شرایط درون‌کشتگاهی:** با غوطه‌ورسازی در PBS و بررسی تغییرات مورفولوژیک در 37 درجه سانتی‌گراد به‌صورت روزانه انجام شد.

**2.5. رهایش درون‌کشتگاهی وانکومایسین**

پروفایل آزادسازی Vm از میکروحامل‌ها با قرار دادن 100 میلی‌گرم از نمونه‌ها در 10 میلی‌لیتر PBS و انکوباسیون در 37 درجه سانتی‌گراد بررسی شد. در فواصل زمانی مشخص (تا 21 روز)، نمونه‌برداری از محیط انجام و جایگزین PBS تازه شد. مقدار Vm آزادشده به‌وسیله طیف‌سنجی UV–Vis در طول‌موج 280 نانومتر اندازه‌گیری گردید. سپس درصد تجمعی رهایش دارو محاسبه شد.

**2.6. آزمون‌های آنتی‌باکتریال**

فعالیت آنتی‌باکتریال میکروحامل‌های بارگذاری‌شده با Vm با روش انتشار دیسکی (Kirby–Bauer) علیه باکتری **استافیلوکوکوس اورئوس** بررسی شد. به دلیل دشواری تهیه دیسک‌های استاندارد از میکروحامل‌ها بدون آسیب به ساختارشان، از سوپرناتانت‌های آزادسازی‌شده در 24 ساعت به‌عنوان نماینده اثربخشی استفاده شد. این سوپرناتانت‌ها به دیسک‌های کاغذی استریل منتقل و روی محیط آگار تلقیح‌شده با S. aureus قرار داده شدند. پس از 24 ساعت انکوباسیون در 37 درجه سانتی‌گراد، قطر هاله‌های بازدارندگی اندازه‌گیری شد.

همچنین آزمون بقا (survival assay) برای بررسی توان کشندگی انجام شد. در این آزمون، سوسپانسیون شبانه کشت S. aureus در محیط مایع، در معرض سوپرناتانت‌های آزادسازی دارو قرار گرفت و پس از 1 و 4 ساعت انکوباسیون، روی محیط آگار کشت داده شد. تعداد کلنی‌ها پس از 24 ساعت شمارش و با گروه کنترل بدون دارو مقایسه شد.

آیا می‌خواهید همین بخش را به‌صورت یک فایل **ورد (docx)** یا **پی‌دی‌اف فارسی** هم برایتان آماده کنم تا قابل استفاده مستقیم در کار پژوهشی‌تان باشد؟

ر