

## ساخت پیچ ریزسوزن حل شونده برای درمان و تسکین درد بیماری آرتریت روماتوئید

سید سپهر کوچک کوثری<sup>۱</sup>، علی پورخلیل<sup>۱\*</sup>، هادی تابش<sup>۱</sup>، حسن فرخ زاد<sup>۲</sup>، مصطفی بشیری برازنده<sup>۱</sup>، علی گل کار<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده گان علوم و فناوری های میان رشته ای، دانشگاه تهران، تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه پتروشیمی، دانشکده مهندسی شیمی، نفت و گاز، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران

### اطلاعات مقاله

### چکیده



#### واژه های کلیدی:

آرتریت روماتوئید،  
ریزسوزن های حل شونده،  
متوترکسات، دارورسانی موضعی،  
روان کنندگی مفاصل، هیالورونیک اسید

#### Keywords:

Rheumatoid arthritis,  
Dissolving microneedles,  
Methotrexate,  
Local drug delivery,  
Joint lubrication,  
Hyaluronic acid

دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۰۲

پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۱

نوع مقاله: علمی - پژوهشی

آرتریت روماتوئید یک بیماری مزمن التهابی مفصلی است که غشای زلاله ای را تحت تأثیر قرار داده و تولید مایع زلاله ای، روان کننده طبیعی مفاصل، را مختل می کند. درمان های رایج مبتنی بر متوترکسات به رغم کاربرد گسترده، با محدودیت هایی چون فراهمی زیستی پایین، سمیت بالا، و نفوذ پذیری ضعیف همراه هستند. همچنین، این روش ها به طور عمده بر کاهش التهاب تمرکز داشته و برای تسکین درد، نیازمند استفاده هم زمان از مسکن ها هستند. در این پژوهش، پیچ ریزسوزن حل شونده ای طراحی شده که برای نخستین بار حاوی متوترکسات و دو روان کننده هیالورونیک اسید و گلیسرول است تا هم زمان به درمان و تسکین درد کمک کند. نتایج آزمایش های مکانیکی نشان دادند که پیچ طراحی شده با تحمل نیروی ۰/۱۱ نیوتن به ازای هر ریزسوزن و نفوذ مؤثر در ۴ لایه ابتدایی پارافیلیم، قابلیت نفوذ به بافت مفاصل بدون شکستگی را دارد. آزمایش های رهایش برون تنی از پوست موش و بستار نشان داد که این پیچ دارو را به صورت موضعی آزاد کرده و ۴۸/۴۶ درصد دارو پس از رهایش در بافت باقی می ماند. گلیسرول، علاوه بر ایجاد روان کنندگی، انعطاف پذیری پیچ را افزایش داده و توانایی شکل پذیری روی مفاصل با انحناهای متغیر را فراهم می کند. پیچ ریزسوزنی طراحی شده با قابلیت درمان و تسکین هم زمان درد، امکان بهبود روش های درمانی آرتریت روماتوئید را فراهم کرده و جایگزینی مناسب برای روش های درمانی موجود در بازار محسوب می شود.

### مقدمه

از جمعیت ایران را مبتلا کرده است [۱، ۲]. این بیماری به واسطه حمله سلول های ایمنی به بافت مفاصل، تورم و درد مزمن ایجاد می کند

آرتریت روماتوئید یکی از مهم ترین و شایع ترین بیماری های خودایمنی، مزمن و التهابی است که تقریباً ۱ درصد از جمعیت جهان و ۰/۳۷ درصد

\* عهده دار مکاتبات

+E-mail: ali.poorkhalil@ut.ac.ir

رجاع: سید سپهر کوچک کوثری، علی پورخلیل، هادی تابش، حسن فرخ زاد، مصطفی بشیری برازنده، علی گل کار، ساخت پیچ ریزسوزن حل شونده برای درمان و تسکین درد بیماری آرتریت روماتوئید، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۱) ۴۵: ۳۹ تا ۵۲ (۱۴۰۵).

نتایج مشابهی در مطالعات Zhao و همکاران نیز مشاهده شده است که نشان دهنده بهبود کارایی ریزسوزن‌ها نسبت به کرم‌های پوستی و روش‌های تزریقی است [۲۰].

علاوه بر این، هیالورونیک اسید، به‌عنوان یکی از اجزای طبیعی بافت زلاله‌ای، توجه زیادی به خود جلب کرده است [۲۱]. این پلی‌ساکارید زیست‌سازگار که در بسیاری از بافت‌های بدن یافت می‌شود، نقش مهمی در روان‌کنندگی و کاهش اصطکاک مفاصل ایفا می‌کند و تزریق مستقیم هیالورونیک اسید به مفاصل آسیب‌دیده نشان داده است که می‌تواند سطح مایع زلاله‌ای را جبران کند و منجر به کاهش درد، سفتی و اصطکاک مفاصل شود [۲۲، ۲۳]. تحقیقات نشان داده‌اند که وزن مولکولی هیالورونیک اسید تزریقی تأثیر قابل توجهی بر کارایی آن دارد به طوری که هر چه وزن مولکولی بالاتر، اثربخشی آن بیشتر خواهد بود [۲۴].

علاوه بر قابلیت روان‌کنندگی گلیسرول، این ماده به دلیل خواص منحصربه‌فرد خود نقش مهمی در افزایش عملکرد پیچ‌های پوستی ایفا می‌کند. پس از اعمال پیچ، گلیسرول به‌عنوان پلاستی‌سایزر انعطاف‌پذیری لازم را برای تطابق پیچ با تغییرات ظاهری و انحنای بافت مفاصل هنگام تحرک فراهم می‌آورد [۲۵]. با این کار، گلیسرول با ایجاد چسبندگی مناسب بین پیچ و سطح بافت مفصل، مانع از جدا شدن پیچ در اثر حرکات مداوم مفاصل می‌شود و در نتیجه تضمین می‌کند که مواد موثره به طور کامل به ناحیه موردنظر منتقل شوند [۲۶]. این ویژگی‌های چندگانه گلیسرول، آن را به گزینه‌ای مناسب برای بهبود عملکرد پیچ‌های ریزسوزن و افزایش اثربخشی درمانی تبدیل کرده است.

در این مطالعه، برای نخستین بار یک پیچ ریزسوزن طراحی و توسعه یافته است که با هدف ارائه درمانی دوگانه برای بیماری آرتريت روماتوئید عمل می‌کند. این سامانه دارورسانی نه تنها امکان رهایش کنترل شده و موضعی داروی متوترکسات را برای کنترل بلندمدت بیماری فراهم می‌سازد، بلکه با تزریق هم‌زمان هیالورونیک اسید به‌عنوان روان‌کننده، موجب تسکین درد و بهبود تحرک مفصل در کوتاه‌مدت نیز می‌شود. ساختار پیچ شامل مجموعه‌ای از ریزسوزن‌های حل‌شونده بر پایه پلی‌وینیل الکل است که داروها در آن بارگذاری شده‌اند و این مجموعه بر روی لایه‌ای انعطاف‌پذیر از پلی‌وینیل الکل و گلیسرول به‌عنوان پلاستی‌سایزر قرار گرفته است تا تطبیق‌پذیری مناسبی با سطح مفصل آسیب‌دیده داشته باشد. نتایج حاصل از ارزیابی‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهد که این پیچ می‌تواند به‌عنوان یک گزینه مؤثر برای رهایش موضعی متوترکسات مطرح شود و با کاهش عوارض جانبی ناشی از روش‌های رایج مصرف دارو، چشم‌انداز امیدوارکننده‌ای برای جایگزینی آن‌ها در درمان آرتريت روماتوئید فراهم آورد.

و در نهایت منجر به آسیب‌دیدگی غضروف، غشای زلاله‌ای<sup>۱</sup> و استخوان می‌شود [۳]. آسیب به غشای زلاله‌ای منجر به کاهش غلظت و تغییر مولکولی هیالورونیک اسید در مایع سینوویال<sup>۲</sup> به سمت وزن‌های پایین‌تر و با کارایی کمتر می‌شود [۴، ۵]. این تغییر، که روان‌کنندگی<sup>۳</sup> مفاصل و کاهش اصطکاک غضروفی را مختل می‌کند، باعث افزایش سفتی، درد و کاهش عملکرد مفاصل در بیماران مبتلا به آرتريت روماتوئید می‌شود [۶]. افزایش نرخ تخریب هیالورونیک اسید در محیط التهابی ناشی از تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد، فعالیت بالای آنزیم‌های تجزیه‌کننده مانند هیالورونیداز، و نفوذپذیری بالای عروق، منجر به رقیق شدن مایع سینوویال و افت کارایی آن می‌شود [۷]. همچنین، مصرف بالای هیالورونیک اسید در بافت آسیب‌دیده باعث کاهش کارایی تزریق مستقیم آن می‌شود، زیرا به سرعت تخریب شده و از بافت حذف می‌شود. این مسئله محققان را به تلاش برای افزایش زمان ماندگاری و بهبود اثرات درمانی آن سوق داده است [۸].

متوترکسات، به‌عنوان یک داروی ضد روماتیسمی اصلاح‌کننده بیماری، اولین گزینه درمانی برای مدیریت آرتريت روماتوئید است. این دارو به دلیل تأثیر هم‌زمان در کاهش علائم بالینی، از جمله درد و تورم، و جلوگیری از پیشرفت بیماری، جایگاه مهمی در پروتکل‌های درمانی دارد [۹، ۱۰]. با این حال، عوارض جانبی متعدد و محدودیت‌های مربوط به روش‌های تجویز رایج آن، مانند مصرف خوراکی و تزریق مستقیم، چالش‌هایی جدی در استفاده بهینه از این دارو ایجاد کرده است. این محدودیت‌ها شامل فراهمی زیستی پایین، اثر عبور اولیه کبدی<sup>۴</sup>، فارماکوکینتیک غیرخطی، و عوارض گوارشی در روش خوراکی [۱۱] و همچنین تهاجمی بودن، خطر عفونت، و نیاز به تخصص پرسنل پزشکی در روش تزریقی است [۱۲].

برای غلبه بر این محدودیت‌ها روش‌های نوین دارورسانی، از جمله استفاده از فناوری ریزسوزن‌ها، در سال‌های اخیر مورد توجه ویژه محققان قرار گرفته‌اند [۱۳]. ریزسوزن‌ها مجموعه‌ای از سوزن‌های کوچک با ابعاد کمتر از ۱ میلی‌متر هستند که به‌عنوان ابزار دارورسانی تراپوستی طراحی شده‌اند [۱۴، ۱۵]. پژوهش‌های گسترده‌ای برای بررسی اثربخشی انواع ریزسوزن‌های حاوی متوترکسات، از جمله ریزسوزن‌های جامد [۱۶]، حل‌شونده [۱۷] و هیدروژلی [۱۸] انجام شده است. نتایج این پژوهش‌ها نشان داده است که دارورسانی با ریزسوزن‌ها می‌تواند رهایش موضعی و کنترل‌شده تری ارائه دهد که منجر به کاهش عوارض جانبی و افزایش بازده درمانی می‌شود. به‌عنوان مثال، مطالعه‌ای توسط Rajendran و همکاران نشان داد که استفاده از ریزسوزن‌های حل‌شونده حاوی متوترکسات، علاوه بر کاهش سطح التهاب در مدل‌های حیوانی، زمان ماندگاری دارو در بدن را نسبت به تزریق زیرپوستی افزایش می‌دهد [۱۹].

(۱) Synovial membrane

(۳) Lubrication

(۲) Synovial fluid

(۴) First pass metabolism

## مواد و روش‌ها

### مواد

مواد بکار برده شده در این پژوهش شامل پلی‌وینیل الکل<sup>۱</sup>، سیگما آلدریج با وزن مولکولی ۷۲۰۰۰ دالتون، گلیسرول سیگما آلدریج، هیالورونیک اسید<sup>۲</sup> سیگما آلدریج با وزن مولکولی ۱۸۰۰۰۰ دالتون، قرص بافر فسفات نمکی<sup>۳</sup> سیگما آلدریج و یک پلی دی متیل سیلوکسان مختومه به وینیل<sup>۴</sup> از شرکت PMP هست. پارافیلیم با ضخامت ۰/۱۲۷ میلی‌متر از شرکت برمیس آمریکا تهیه شده است. داروی متوترکسات از داروی تجاری ترکسومای شرکت نانوفناوران دارویی الوند تهیه شده است. پوست موش ویستار از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شده است.

### تهیه پوست موش ویستار

برای تهیه پوست موش ویستار آزمایشگاهی با ضخامت کامل از روشی مشابه تحقیقات پیشین استفاده شده است [۲۷]. نخست حیوان توسط ترکیبی از کتامین و زایلازین بیهوش شد. سپس موی پشت رت توسط کرم موبر اصلاح شده و در نهایت با دستمال مرطوب تمیز شده است. در گام بعد از روش جابه‌جایی ستون فقرات برای آسان‌کشی حیوان استفاده شد. در این راستا، رت را روی زمین خوابانده و یک دست را روی گردن رت فشرده و در همین زمان با دست دیگر دم رت کشیده شده تا ستون فقرات جابجا شد. سپس بافت پوست محوطه اصلاح شده با استفاده از تیغ جراحی جدا شده و روی سطحی سفت و مسطح فیکس شده است. در گام بعد با استفاده از یک درماتوم دستی سه سوراخه، بافت پوست با ضخامت مشخص ۱ میلی‌متر برش زده شده است. بافت تهیه شده به شکل دایره‌هایی به قطر ۲ سانتی‌متر برش زده شده و در محلول فرمالین ۱۰ درصد برای استفاده در تست‌های نفوذپذیری و رهایش دارو نگهداری شده است.

### ساخت ریزسوزن‌های حل‌شونده

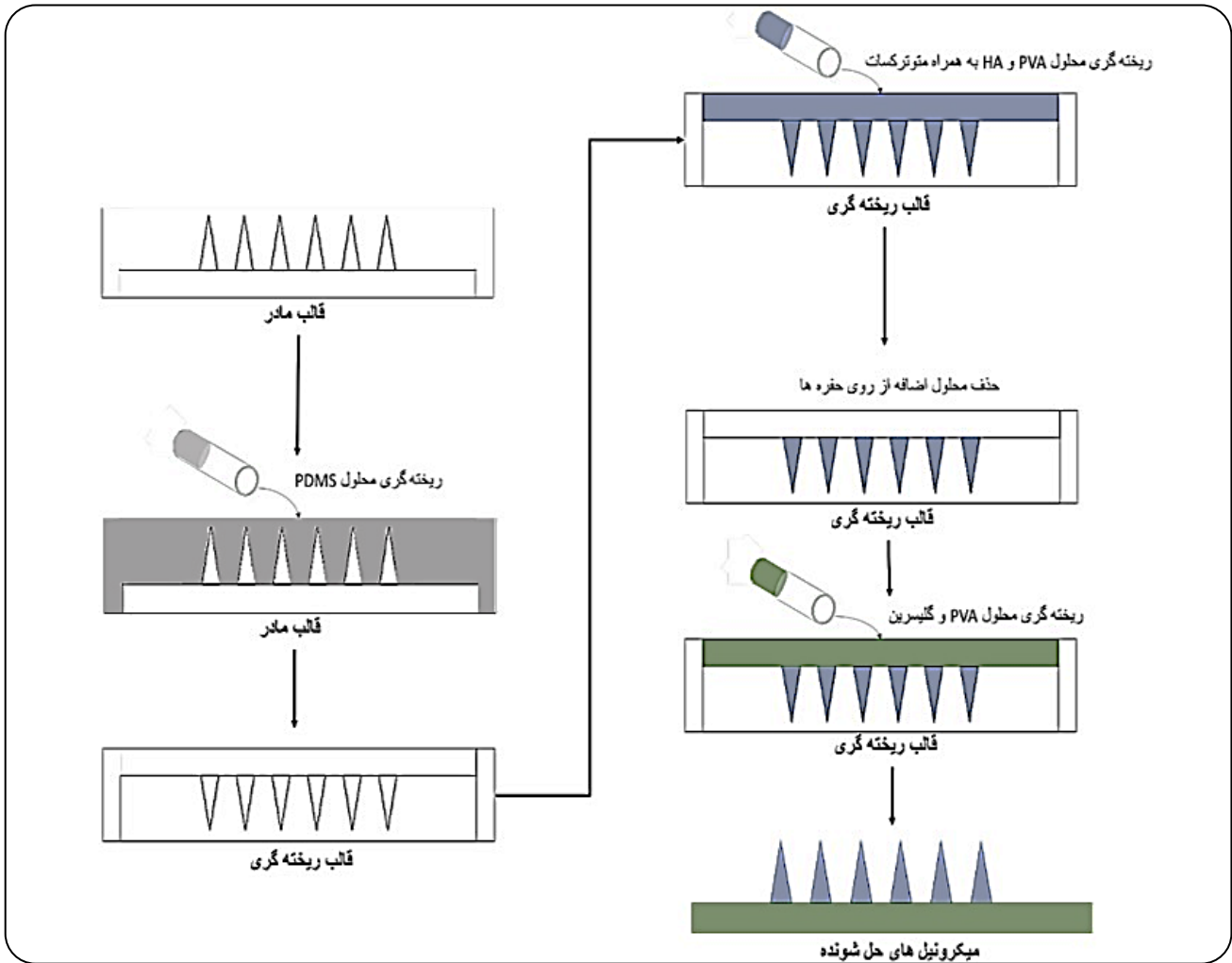
برای ساخت پیج ریزسوزن‌های حل‌شونده از روش ریخته‌گری دومرحله‌ای مشابه با تحقیقات پیشین استفاده شده است که لازمه آن وجود یک قالب مادر<sup>۵</sup> و یک قالب ریخته‌گری<sup>۶</sup> هست [۲۸]. برای ساخت قالب مادر یک مدل سه بعدی از ریزسوزن‌های مخروطی شکل با آرایه ی ۶\*۶ به ترتیب به قطر پایه، ارتفاع و فاصله نوک تا نوک برابر با ۰/۵ میلی‌متر، ۱ میلی‌متر و ۱ میلی‌متر، توسط نرم‌افزار Ansys SpaceClaim طراحی شده است. قطر صفحه‌ای که ریزسوزن‌ها روی آن قرار گرفته‌اند برابر با ۱۰ میلی‌متر، قطر صفحه سازنده شکاف بین جداره‌ها و صفحه ریزسوزن‌ها برابر

۰/۵ میلی‌متر و ضخامت جداره برابر با ۱ میلی‌متر در نظر گرفته شده است. شکاف طراحی شده بین صفحه‌ای که ریزسوزن‌ها روی آن قرار گرفته است با جداره خارجی به این علت است که پس از ریخته‌گری پلیمر سیلیکانی، قالب ریخته‌گری دارای جداره باشد تا بتواند محلول حاوی فرمولاسیون پلیمر و دارو را در خود نگه دارد. برای ساخت فایل مدل سه‌بعدی از فرمت STL به فرمت G-code تبدیل شده و توسط پرینتر سه‌بعدی MSLA (Phrozen Technology، تایوان) با دقت ۵۰ میکرون، با سرعت ۶ mm/s چاپ می‌شود. پس از چاپ، نمونه‌ها مجدداً به مدت ۲ دقیقه تحت تابش UV با طول موج ۴۰۵ نانومتر پخته می‌شوند. در نهایت برای حذف رزین پخته نشده از سطح نمونه‌ها، آنها به مدت ۲ دقیقه در دستگاه هموزنایزر فراصوت (Topsonics، ایران) در محلول ایزوپروپیل شسته می‌شود.

در ادامه، نخستین فرایند ریخته‌گری برای ساخت قالب ریخته‌گری چند بار مصرف انجام می‌شود. به این منظور ۱ گرم محلول PDMS با نسبت پلیمر به عامل پخت ۱:۱ روی قالب مادر ریخته می‌شود و به آن ۲۴ ساعت در دمای اتاق زمان داده می‌شود تا فرایند پختن تکمیل گردد. پس از آن قالب ریخته‌گری سیلیکونی به آرامی از قالب جدا می‌شود. برای ساخت ریزسوزن‌های حل‌شونده دومین فرایند ریخته‌گری انجام می‌شود. برای این منظور ۱۰ گرم از محلول سازنده ریزسوزن‌ها شامل ۱۰ درصد وزنی PVA، ۰/۵ درصد وزنی HA درون فالدکون ۵۰ سی‌سی ریخته می‌شود و پس از قراردادن قالب‌های ریخته‌گری در فالدکون، مجموعه با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌شود تا حفره‌ها به طور یکنواخت پر شوند و همچنین حباب‌های باقی‌مانده نیز حذف گردند. پس از اتمام سانتریفیوژ و پر شدن حفره‌ها، محلول اضافه روی حفره‌ها توسط یک اسپاچول برداشته می‌شود تا ۰/۵ گرم محلول سازنده لایه پایه ریزسوزن‌ها متشکل از PVA ۱۰ درصد وزنی و گلیسرول ۵ درصد وزنی روی حفره‌های قالب ریخته‌گری ریخته شود. قالب‌ها جهت تکمیل فرایند ریخته‌گری به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق نگهداری می‌شوند و در نهایت ریزسوزن‌ها از قالب ریخته‌گری جدا می‌شوند. در پایان، پیج‌های ریزسوزن تهیه شده در ظروف پتری مهر و موم شده با پارافیلیم آب‌گریز نگهداری می‌شوند تا از نفوذ رطوبت به داخل نمونه‌ها جلوگیری گردد. برای ساخت ریزسوزن‌های حل‌شونده حامل دارو ۰/۴ میلی‌لیتر از حجم آب حین تهیه فرمولاسیون محلول سازنده ریزسوزن‌ها با داروی ترکسومای ۱۰ میلی‌گرم جایگزین می‌شود. پس از تهیه فرمولاسیون جدید، مابقی با آنچه در بالا توصیف شده است، یکسان خواهد بود. شکل ۱ شماتیکی از روند ساخت پیج ریزسوزن‌های حل‌شونده حاوی داروی متوترکسات و روان‌کننده هیالورونیک اسید و پلاستی‌سایزر گلیسرول را نشان می‌دهد.

(۱) Poly (vinyl alcohol), PVA  
(۳) Phosphate buffer saline, PBS  
(۵) Master mold

(۲) Hyaluronic acid, HA  
(۴) Vinyl-terminated poly (dimethyl siloxane), v-PDMS  
(۶) Female mold



شکل ۱ - فرایند ساخت ریزسوزن‌های حل‌شونده حامل متوترکسات و روان‌کننده‌های هیالورونیک اسید و گلیسرول با روش ریخته‌گری دو مرحله‌ای

### ریخت‌شناسی ریزسوزن‌ها

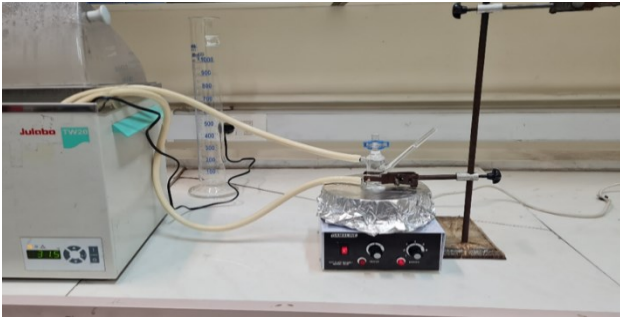
برای بررسی ریخت‌شناسی ریزسوزن‌های ساخته شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (TESCANMIRA، جمهوری چک) و میکروسکوپ لوپ (Olympus، ایتالیا) استفاده شده است. همان‌طور که در بخش گذشته به آن اشاره شد، ریزسوزن‌های این آزمون با روش خشک کردن عادی در دمای محیط تولید شدند تا از تشکیل ساختار متخلخل و تضعیف خواص مکانیکی ناشی از خشک‌کن انجامادی جلوگیری شود. همچنین، پیش از استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی ریزسوزن‌ها با طلا پوشش داده می‌شود. ابعاد ریزسوزن‌ها از روی تصاویر تهیه شده توسط نرم‌افزار Image J بررسی شده است. برای این منظور، ابعاد ریزسوزن‌ها (شامل ارتفاع، قطر پایه و قطر نوک) با انتخاب تصادفی ۶ ریزسوزن از ردیف‌های جلویی و آنالیز آنها توسط نرم‌افزار محاسبه شده است. مقادیر نهایی به صورت میانگین‌گیری و رند شده گزارش گردیده‌اند تا ضمن حفظ دقت، از پراکندگی غیرضروری داده‌ها جلوگیری شود. تصاویر تهیه شده از قالب مادر و قالب ریخته‌گری نیز با استفاده از میکروسکوپ لوپ تهیه شده است.

### خواص مکانیکی ریزسوزن‌ها

برای بررسی خواص مکانیکی ریزسوزن‌ها از روشی مشابه با تحقیقات پیشین استفاده شده است [۲۹]. برای این منظور از دستگاه سنجش بافت (AMETEK Brookfield، آمریکا) در حالت فشار استفاده شده است. با این آزمایش مشخص می‌شود که آیا ریزسوزن‌ها استحکام و قدرت کافی را برای نفوذ به داخل پوست پیش از شکستن را دارند یا نه. برای این کار پیچ ریزسوزن‌ها را توسط چسبی دوطرفه به ضخامت ۱ mm روی پروب (بخش متحرک دستگاه) فیکس کرده و پروب با سرعت ۰/۱ mm/s، با نیروی اولیه ۵ N و جابه‌جایی کل ۰/۶ mm روی یک صفحه تخت از جنس فولاد ضد زنگ فشرده می‌شود. در پایان نمودار نیرو بر حسب جابه‌جایی تهیه می‌شود. این آزمون سه بار تکرار شده و نتایج به صورت میانگین گزارش شده است.

### توانایی نفوذپذیری ریزسوزن‌ها

برای بررسی توانایی نفوذپذیری پیچ ریزسوزن‌های هیدروژلی از پارافیلیم به‌عنوان یک مدل تأیید شده مشابه پوست و همچنین پوست موش و بیستار



شکل ۲ - چینی استفاده شده برای آزمون رهایش برون تنی متوترکسات از پیج ریزسوزن‌های حل‌شونده شامل سل فرانتز، استیرر و حمام آب

به گزینه‌ای مناسب برای بررسی رفتار انحلال‌پذیری ریزسوزن‌ها تبدیل می‌کند [۳۱].

### پروفایل رهایش برون تنی متوترکسات

برای بررسی پروفایل رهایش برون تنی متوترکسات از روشی مشابه با تحقیقات پیشین استفاده شده است [۳۲]. در این راستا یک سل انتشار فرانتز با حجم محفظه گیرنده ۱۲ میلی‌لیتر و قطر اوریفیس ۱۵ میلی‌متر مطابق شکل ۲ طراحی و ساخته شده است. در ابتدا پیج ریزسوزن‌های حاوی متوترکسات توسط فشار شست دست به مدت ۶۰ ثانیه روی پوست موش ویستار فشرده شده و بلافاصله پس از برداشتن دست روی آن یک وزنه استوانه‌ای قرار داده می‌شود تا از اتصال پیج به بافت اطمینان حاصل شود. مجموعه‌ی پوست، پیج ریزسوزن‌ها و وزنه روی بخش اهدا کننده‌ی سل فرانتز قرار داده شده و توسط یک گیره فیکس می‌شود. محفظه گیرنده که از پیش با محلول PBS با pH برابر با ۷/۴ پر شده است، توسط مگنت با دور ۶۰۰ rpm در تمام طول آزمایش همزده می‌شود. هدف از این کار شبیه‌سازی جریان مایع میان‌بافتی و خون در بافت و همچنین یکنواخت‌تر ساختن محلول حین نمونه‌برداری است. دمای سل فرانتز توسط آبی که از حمام آب مستقیماً به‌واسطه‌ی شیلنگ در ژاکت حرارتی آن در جریان است، روی ۳۷ درجه سلسیوس نگه داشته می‌شود تا دمای بدن را شبیه‌سازی کند. از محفظه گیرنده توسط یک سوزن اسپینال به طول ۸۰ میلی‌متر در بازه‌های زمانی مشخص (۰، ۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت) به میزان ۳۰۰ میکرولیتر نمونه‌برداری می‌شود. بلافاصله پس از نمونه‌برداری، همان مقدار از محلول PBS تازه جایگزین می‌شود تا حجم از دست رفته جبران شود. در پایان غلظت نمونه‌ها توسط دستگاه طیف‌سنج مرئی-فرابنفش (Thermo Fisher scientific, Nanodrop، آمریکا) و با استفاده از منحنی استاندارد از پیش تعیین شده بررسی می‌شوند. طول موج مشخصه متوترکسات برای خواندن میزان جذب نمونه‌ها برابر با ۳۰۲ نانومتر است. این تست سه مرتبه تکرار شده است.

با ضخامت کامل مانند تحقیقات پیشین استفاده شده است [۳۰]. به‌طور خلاصه، پارافیلیم با ضخامت لایه ۰/۱۲۷ میلی‌متر به‌صورت ۸ لایه به ضخامت تقریبی ۱ میلی‌متر تا شده و برش زده می‌شود. پیج ریزسوزن‌ها با فشار شست دست به مدت ۶۰ ثانیه روی پارافیلیم فشرده شده و در پایان از پارافیلیم جدا می‌شوند. در ادامه لایه‌های پارافیلیم از هم باز شده و تعداد حفره‌های ایجاد شده در هر لایه توسط میکروسکوپ نوری بررسی می‌شود. درصد حفره‌های ایجاد شده در هر لایه نسبت به کل ریزسوزن‌های موجود در پیج مطابق معادله ۱ به دست می‌آید. عمق نفوذ نیز با توجه به مشخص بودن ضخامت هر لایه از ورقه‌های پارافیلیم براحتی به دست می‌آید. این آزمون سه مرتبه تکرار شده است. درصد حفره‌ها در پارافیلیم

$$(۱) \quad 100 * \frac{\text{تعداد حفره های دیده شده}}{\text{تعداد ریزسوزن ها در پیج}} = \text{درصد حفره ها در پارافیلیم}$$

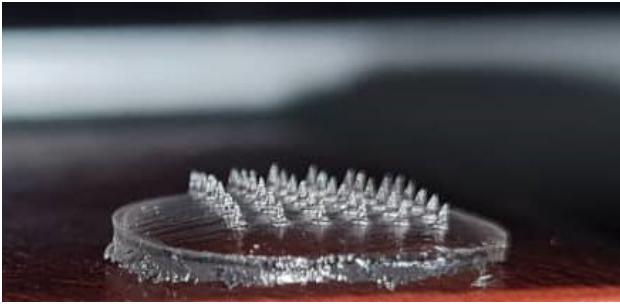
همچنین یک آزمون نفوذپذیری روی پوست جدا شده موش ویستار انجام شده است. برای این کار پیج ریزسوزن‌ها به مدت ۶۰ ثانیه توسط فشار شست دست روی پوست موش ویستار فشرده می‌شوند. پس از جداسازی ریزسوزن‌ها از پوست، بافت در محلول تولوئیدین بلو ۱ درصد وزنی حجمی به مدت ۱۵ ثانیه غوطه‌ور و رنگ‌آمیزی شده و تعداد حفره‌های ایجاد شده روی پوست توسط میکروسکوپ بررسی می‌شود.

برای بررسی عمق ریزسوزن‌ها در بافت، یک آزمون نفوذپذیری روی پوست جدا شده موش ویستار با اعمال ریزسوزن‌ها روی بافت مشابه آزمون قبل و سپس رنگ‌آمیزی بافت این بار به روش هماتوکسیلین - ائوزین<sup>۱</sup> (H&E) انجام شده است. در پایان توسط میکروسکوپ نوری عمق نفوذ ریزسوزن‌ها در بافت به کمک نرم‌افزار Image J محاسبه شد.

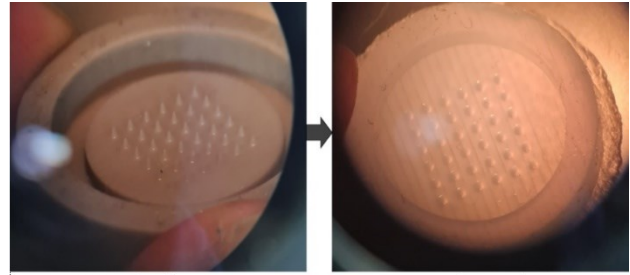
### نرخ انحلال‌پذیری ریزسوزن‌ها

در این مطالعه، نرخ انحلال‌پذیری ریزسوزن‌ها با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد وزنی مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، پیج‌های ریزسوزن بر سطح لایه‌ای از ژل آگارز فشرده شدند و در فواصل زمانی مشخص از محیط آزمایش خارج گردیدند. سپس، وضعیت ساختاری ریزسوزن‌ها با استفاده از تصویربرداری دیجیتال ثبت شد. برای تهیه ژل آگارز، ۲ گرم آگارز پودری در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از مگنت همزن حل گردید. سپس، ۵ میلی‌لیتر از محلول آماده‌شده در پتری دیش ریخته شد و برای مدت ۱ ساعت در دمای یخچال نگهداری شد تا ژل‌سازی به طور کامل انجام شود. انتخاب آگارز برای این آزمایش به دلیل زمان ژل‌شدن پایین و توانایی حفظ بالای آب انجام گرفته است که این ویژگی‌ها آن را

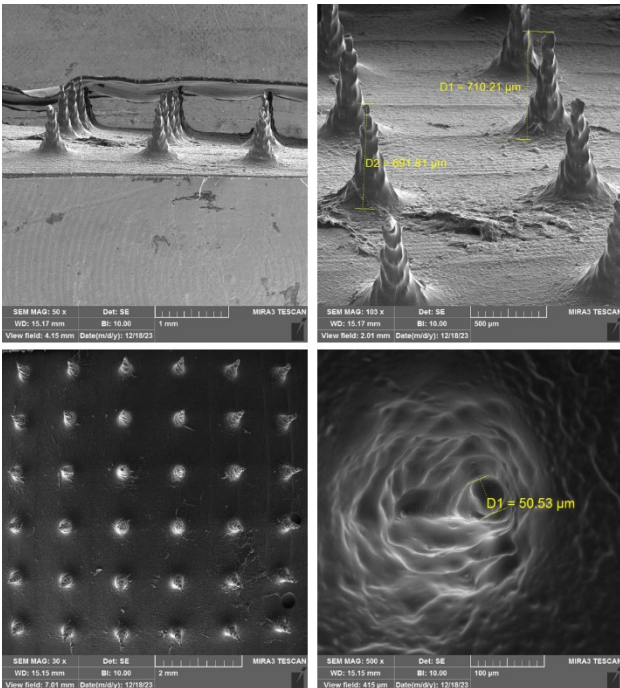
(۱) Hematoxylin and Eosin



شکل ۴ - تصویر تهیه شده از پیچ ریزسوزن‌های حل‌شونده با استفاده از دوربین دیجیتال



شکل ۳ - تصاویر تهیه شده از قالب مادر پرینت شده با چاپگر سه بعدی MSLA و قالب ریخته‌گری از جنس PDMS



شکل ۵ - تصاویر میکروسکوپ الکترون روبشی پیچ ریزسوزن‌های حل‌شونده از روبرو و از بالا

ارتفاع ریزسوزن‌ها حدود  $250 \mu\text{m}$  کمتر از ارتفاع مدل طراحی شده درآمده است که این امر ریشه دقت چاپگر سه بعدی استفاده شده دارد [۲۸]. راه کار پیشنهادی برای حل این مشکل نیز شامل طراحی مدل سه بعدی با ارتفاع بیشتر است. در هر حال، باتوجه به مقادیر به‌دست آمده برای پارامترهای هندسی ریزسوزن، نسبت ابعادی ریزسوزن‌ها (نسبت ارتفاع به قطر پایه ریزسوزن) برابر با  $1/5$  به‌دست می‌آید. بازه‌ی ایده‌آل برای این پارامتر جهت طراحی ریزسوزن ۲-۴ گزارش شده است به طوری که هر چه این نسبت به عدد ۲ نزدیک‌تر باشد، انتظار می‌رود ریزسوزن‌ها خواص مکانیکی بالاتر و عمق نفوذ در پوست پایین‌تر داشته باشند و برعکس هر چه این نسبت به عدد ۴ نزدیک‌تر باشد، ریزسوزن‌ها خواص مکانیکی پایین‌تر و عمق نفوذ در پوست بالاتر داشته باشند [۳۳، ۳۴]. باتوجه به اینکه در این پژوهش بافت هدف برای اعمال پیچ ریزسوزن‌ها

برای تعیین مقدار داروی بارگذاری شده اولیه در پیچ ریزسوزن‌ها، این بار به صورت خارج بدنی آنها را مستقیماً در  $12 \text{ mL}$  محلول PBS (معادل با حجم محفظه گیرنده سل فرانتز) غرق کرده و به آن زمان داده می‌شود تا پیچ کاملاً حل شده و تمام دارو آزاد شود. در نهایت از محلول نمونه برداری شده و در طول موج  $302 \text{ nm}$  توسط دستگاه طیف‌سنج مرئی - فرابنفش جذب آن خوانده می‌شود. مقدار داروی اولیه بارگذاری شده نیز از روی غلظت محاسبه شده با توجه به منحنی استاندارد به دست می‌آید.

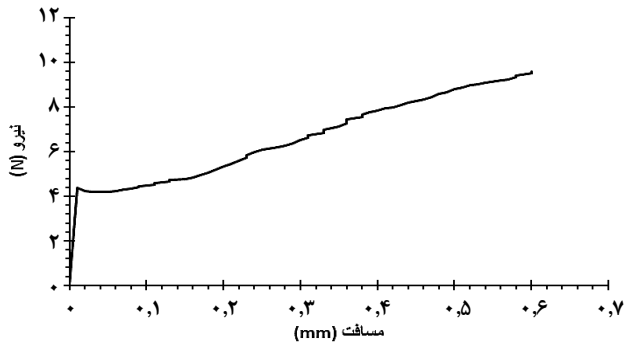
## نتایج و بحث

### ریخت شناسی ریزسوزن‌ها

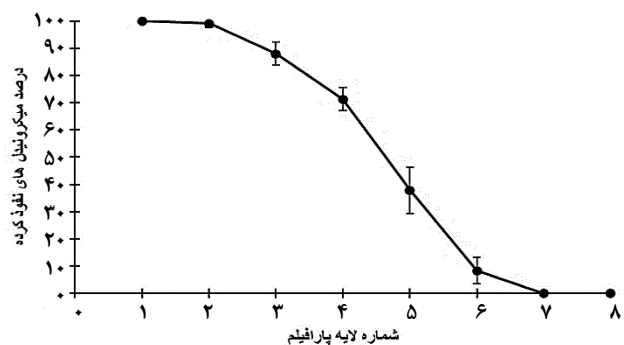
شکل ۳ تصاویر تهیه شده از قالب مادر پرینت شده توسط چاپگر سه بعدی MSLA و قالب ریخته‌گری سیلیکانی را که از هر دو در روند ساخت ریزسوزن‌ها استفاده شده است، نشان می‌دهد. باتوجه به شکل، مشاهده می‌شود که در قالب مادر، تمامی ریزسوزن‌ها با حفظ ساختار مخروطی شکل طراحی شده در مدل سه بعدی بدون نقص چاپ شده‌اند. در قالب ریخته‌گری نیز تمامی حفره‌های مخروطی شکل بدون نقص درآمده است و همچنین وجود شکاف بین صفحه ریزسوزن‌ها و جداره قالب مادر، توانسته است باعث تشکیل جداره‌ای اطراف قالب ریخته‌گری برای جلوگیری از بیرون ریختن فرمولاسیون سازنده ریزسوزن‌ها شود.

شکل ۴ تصویر تهیه شده از پیچ ریزسوزن‌های حل‌شونده توسط میکروسکوپ لوپ را نشان می‌دهد. باتوجه به شکل می‌توان دید که تمام  $36$  ریزسوزن طراحی شده بدون هیچگونه آسیبی از قالب ریخته‌گری جدا شده و هندسه ریزسوزن‌ها به شکل مخروطی و مطابق با مدل اولیه درآمده است.

شکل ۵ نیز تصاویر تهیه شده از یک ریزسوزن توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی را نشان می‌دهد. بررسی تصویر تهیه شده توسط نرم‌افزار Image J میانگین ارتفاع، قطر پایه و قطر نوک ریزسوزن‌ها را به ترتیب تقریباً برابر  $470$ ،  $750$  و  $50$  میکرومتر نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد همان‌طور که از تحقیقات پیشین نیز انتظار می‌رفت



شکل ۶ - منحنی نیرو بر حسب جابجایی بدست آمده از آزمون فشار



شکل ۷ - درصد ریزسوزن‌های حل شونده نفوذ کرده در ۸ از پارافیلیم

### توانایی نفوذپذیری ریزسوزن‌ها

برای بررسی عمق نفوذ ریزسوزن‌ها در بافت از پارافیلیم ۸ لایه به‌عنوان مدلی جایگزین برای پوست استفاده شده است. شکل ۷ توانایی نفوذپذیری ریزسوزن‌های حل شونده در پارافیلیم ۸ لایه را نشان می‌دهد. نتیجه به‌دست آمده نشان داد که ۱۰۰ درصد از ریزسوزن‌ها در ۲ لایه و تا عمق  $0.254 \mu\text{m}$  نفوذ کرده‌اند. تعداد حفره‌ها و عمق نفوذ ریزسوزن‌ها در ۳ لایه بعدی کاهش یافته است به‌گونه‌ای که در لایه‌ها ۳، ۴ و ۵ از پارافیلیم به ترتیب  $87/96$ ،  $71/29$  و  $37/93$  درصد از ریزسوزن‌ها نفوذ کرده‌اند. باتوجه به نتایج به‌دست آمده، نفوذ ریزسوزن‌ها تنها در ۳ و ۴ لایه نخست مطلوب بوده و بنابراین عمق نفوذ احتمالی ریزسوزن‌ها در بافت را در بازه  $0.381-5.08$  میکرومتر می‌توان پیش‌بینی کرد. لازم به ذکر است که هر نقطه روی منحنی نشان‌دهنده یک لایه از هشت لایه پارافیلیم هست که با ضرب آن در ضخامت هر لایه، عمق نفوذ ریزسوزن‌ها به‌دست آمده است. اگر چه استفاده از پارافیلیم روشی رایج برای مدل‌سازی بافت پوست بشمار می‌رود با این‌وجود نتایج پژوهش پیشین خطای  $150-100$  میکرومتری را نیز بین عمق نفوذ در پارافیلیم و بافت پوست گزارش کرده‌اند [۳۶]. در نتیجه انتظار می‌رود عمق نفوذ ریزسوزن‌ها در واقعیت در پوست بین  $350-450$  میکرومتر باشد.

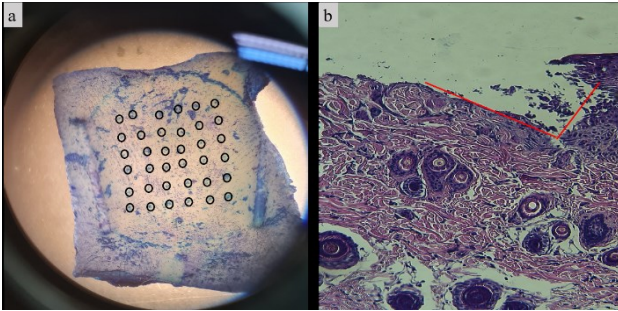
اگر چه استفاده از پارافیلیم روشی رایج برای مدل‌سازی بافت پوست بشمار می‌رود با این‌وجود نتایج پژوهش پیشین [۳۶] خطای  $150-100$  میکرومتری را نیز بین عمق نفوذ در پارافیلیم و بافت پوست

بافت مفاصل به‌ویژه مفصل‌های آرنج، زانو و مچ دست است، پیج ریزسوزن‌ها باید خواص مکانیکی بالاتری داشته باشند؛ چراکه پوست روی مفاصل در مقایسه با سایر نقاط بدن به علت نزدیکی استخوان و غضروف به بافت پوست، از سختی بیشتری برخوردار است. از این‌رو نسبت ابعادی به‌دست آمده برای ریزسوزن‌های ساخته شده، می‌تواند کافی بودن خواص مکانیکی آنها را برای نفوذ به درون بافت مفاصل بدون شکستن ریزسوزن‌ها تضمین کند. از سوی دیگر، قطر پایه ریزسوزن‌ها حدود  $30 \mu\text{m}$  کمتر از مقدار طراحی شده درآمده است که این امر می‌تواند ریشه در انقباض ریزسوزن‌ها حین تکمیل فرایند ریخته‌گری داشته باشد. همچنین، قطر نوک ریزسوزن‌ها در بازه ایده‌آل  $0-75$  میکرومتر که نشانه‌ای از تیز بودن ریزسوزن است، درآمده است که این امر برای عمق نفوذ هر چه بهتر ریزسوزن‌ها در بافت امری حیاتی است. در مجموع باتوجه به نتایج به‌دست آمده، انتظار می‌رود ریزسوزن‌ها تیزی و خواص مکانیکی لازم برای نفوذ در بافت پوست روی مفاصل را داشته باشند.

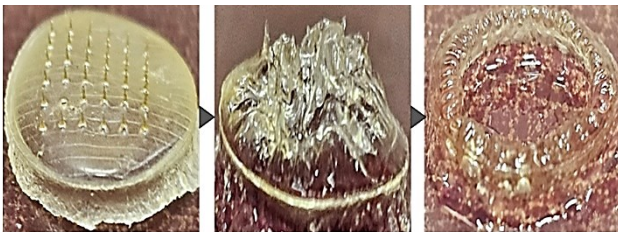
همچنین کاملاً مشهود است که از آنجایی که برای ساخت قالب مادر که قالب ریخته‌گری از روی آن ساخته شده است، از روش ساخت افزایشی استفاده شده است، ریزسوزن‌ها نیز ساختار لایه به لایه به خود گرفته‌اند.

### خواص مکانیکی ریزسوزن‌ها

شکل ۶ نمودار نیرو بر حسب جابجایی برای پیج ریزسوزن‌های حل شونده از جنس PVA و HA را نشان می‌دهد. نتیجه حاصل از تست فشار نشان داد که ریزسوزن‌ها توانسته‌اند در بازه ی جابجایی تعریف شده برای دستگاه، تا نیروی  $0.11$  نیوتن به‌ازای هر ریزسوزن (در مجموع  $36$  ریزسوزن متحمل نیروی  $4$  نیوتن) را بدون شکستن تحمل کنند چرا که در صورت بروز شکستگی منحنی به‌دست آمده باید در نقطه ی شکستگی دچار افت شدید می‌شد. پس از این نقطه منحنی دچار یک افت کوچک شده است که می‌تواند ریشه در ایجاد ترک در ساختار ریزسوزن‌ها داشته باشد. در پایان آزمون، ریزسوزن‌ها تنها تغییر شکل داده و خم شده بودند ولی هیچ‌گونه شکستگی بزرگی دیده نشد. باتوجه به اینکه تحقیقات پیشین نیروی وارد شده لازم به ریزسوزن‌ها توسط شست دست هنگام اعمال پیج روی پوست را در بازه  $0.58$  نیوتن به‌ازای هر ریزسوزن محاسبه کرده‌اند [۳۵]، می‌توان گفت ریزسوزن‌های طراحی شده در این پژوهش توانایی لازم جهت تحمل فشار حین نفوذ به درون بافت را خواهند داشت. این افزایش قابل توجه در میزان تحمل فشار توسط ریزسوزن‌های هیدروژلی، کاملاً با نتیجه به‌دست آمده برای پارامتر نسبت ابعادی ریزسوزن‌ها که مقداری برابر با  $1/5$  و نزدیک به  $2$  داشت، همخوانی دارد.



شکل ۸ - نفوذپذیری ریزسوزن (a) حفره‌های ایجاد شده روی بافت پوست جدا شده موش ویستار و رنگ‌آمیزی با تولوئیدین بلو (b) عمق نفوذ ریزسوزن در بافت رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین-انوزین



شکل ۹ - تصاویر تهیه شده از نرخ انحلال‌پذیری ریزسوزن‌های حل‌شونده در لایه ای از ژل آگارز  
پیش از آزمون ۱۵ ثانیه ۶۰ ثانیه

### پروفایل رهایش برون تنی متوترکسات

میزان داروی بارگذاری شده اولیه پس از انحلال کامل پیچ ریزسوزن‌های حامل دارو در محلول PBS، ۱۵۶ میکروگرم محاسبه شده است. این امر ریشه در این دارد که علی‌رغم اینکه در ۱۰ گرم محلول موجود در فالكون حین سانتریفیوژ در ساخت ۲/۵ میلی‌گرم دارو وجود داشت، ولی در پایان روی هر قالب تنها ۰/۶ گرم محلول حاوی دارو جا می‌گیرد و این امر میزان داروی بارگذاری شده اولیه را کاهش می‌دهد.

شکل ۱۰ پروفایل رهایش برون تنی متوترکسات از میان پوست موش ویستار با استفاده از سل فرانتز را نشان می‌دهد. همان‌طور که در نمودار دیده می‌شود، رهایش متوترکسات از پیچ ریزسوزن‌ها تا دقیقه ۲۴۰ یک روند افزایشی را نشان می‌دهند و پس از آن غلظت دارو حین رهایش کنترل شده پس از رسیدن نمودار به حالت سکون حدوداً برابر با ۶,۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است. با ضرب این مقدار در حجم محفظه گیرنده سل فرانتز که نمونه‌برداری از آنجا انجام می‌شود، مقدار داروی رها شده پس از رسیدن به پروفایل رهایش به حالت سکون ۸۰/۴ میکروگرم محاسبه می‌شود. این میزان از داروی رها شده نسبت به مقدار داروی موجود در پیچ ریزسوزن‌ها کسری حدود ۷۵/۶ میکروگرمی دارد. این کسری ایجاد شده به دلیل به دام افتادن دارو در بافت پوست و عدم نفوذ آن به داخل محلول PBS است چرا که پس از اتمام آزمایش ریزسوزن‌ها کاملاً حل شده و متوترکساتی در پیچ باقی نمانده است.

گزارش کرده‌اند. در نتیجه انتظار می‌رود عمق نفوذ ریزسوزن‌ها در واقعیت در پوست بین ۳۵۰-۴۵۰ میکرومتر باشد.

لازم به ذکر است تمام حفره‌های ایجاد شده روی بافت، عمق نفوذ یکسانی نخواهند داشت و این امر در تست نفوذپذیری روی پارافیلیم نیز مشهود بوده است. علت این امر می‌تواند ریشه در ایجاد انحنا در لایه پایه‌ای پیچ پس از تخییر حلال حین تکمیل فرایند ریخته‌گری و همچنین عدم قرارگرفتن صحیح شست دست روی پیچ داشته باشد. در مجموع نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که ریزسوزن‌های طراحی شده کاملاً توانایی نفوذ به بافت پوست برای جذب مایع میان‌بافتی و رهایش دارو را دارا هستند.

شکل ۸a نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی بافت جدا شده پوست موش ویستار با استفاده از تولوئیدین بلو پس از اعمال پیچ ریزسوزن‌های حل‌شونده را نشان می‌دهد. در این شکل، ۳۶ حفره آبی‌رنگ مشاهده می‌شود که بیانگر آن است تمامی ۳۶ ریزسوزن موجود بر روی پیچ توانسته‌اند به طور کامل به داخل بافت نفوذ کنند. همچنین، حفره‌های ایجاد شده توسط رنگ پر شده‌اند که اثربخشی نفوذ ریزسوزن‌ها را به‌وضوح مشخص می‌کند. شکل ۸b هم عمق نفوذ ریزسوزن در بافت رنگ‌آمیزی شده با H&E را نشان می‌دهد که در آن عمق نفوذ به‌صورت میانگین تقریباً برابر ۲۴۶ میکرومتر به‌دست‌آمده است. عمق نفوذ ریزسوزن به‌دست‌آمده در این روش با نتایج آزمون نفوذپذیری ریزسوزن در پارافیلیم همخوانی داشته و در بازه پیشنهاد شده قرار دارد.

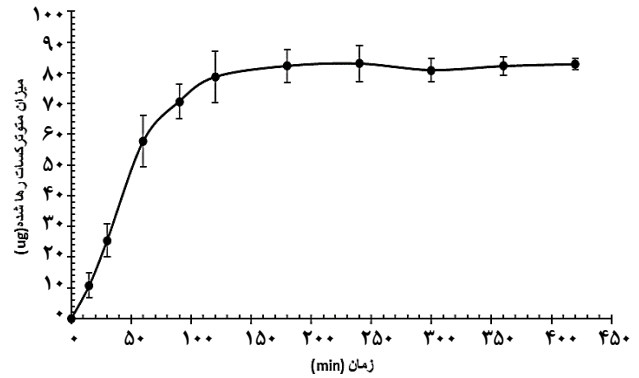
علاوه بر این، نتایج آزمون‌های نفوذپذیری تأیید می‌کنند که ریزسوزن‌ها از خواص مکانیکی کافی برای تحمل نیروهای وارد شده برخوردارند و هم‌زمان از تیزی مناسب برای نفوذ به بافت بهره‌مند هستند. این ویژگی‌ها با قطر کم نوک ریزسوزن‌ها که پیش‌تر در ارزیابی ریخت شناسی آن‌ها بررسی شده بود، کاملاً مطابقت دارد و عملکرد مطلوب ریزسوزن‌ها را در فرایند دارورسانی تضمین می‌کند.

### نرخ انحلال‌پذیری ریزسوزن‌های حل‌شونده

شکل ۹ روند انحلال‌پذیری ریزسوزن‌های حل‌شونده از جنس PVA و HA با لایه پایه‌ای از جنس PVA و گلیسرول را پیش و پس از اعمال روی لایه‌ای از ژل آگارز نشان می‌دهد. ۱۵ ثانیه پس از اعمال پیچ، ماتریکس پلیمری ریزسوزن‌ها و لایه پایه‌ای پیچ دچار آب‌پوشانی شده و در آستانه انحلال قرار می‌گیرد. پس از ۶۰ ثانیه، تمامی ریزسوزن‌ها همراه با لایه پایه‌ای پیچ کاملاً در ژل آگارز حل شده‌اند. این نتایج نشان می‌دهد که متوترکسات و هیالورونیک اسید موجود در ریزسوزن‌ها، همراه با گلیسرول موجود در لایه پایه‌ای پیچ، می‌تواند پس از انحلال کامل پیچ در بافت آزاد شده و اثر درمانی خود را اعمال می‌کنند.

به دنبال دفع سریع دارو پس از تزریق مستقیم با سرنگ، یک پروفایل دو فازی شامل فاز رهایش تدریجی و به دنبال آن فاز رهایش پایدار را نشان داد [۳۷]. این ویژگی می‌تواند از تجمع دوزهای بالای دارو و بروز سمیت سیستمیک جلوگیری کند. با این حال، نرخ رهایش مشاهده‌شده نسبتاً سریع بود و برای حفظ دوز مؤثر متوترکسات، نیاز به تعویض چندباره پیچ در طول روز وجود دارد که این امر می‌تواند راحتی بیمار را تحت تأثیر قرار دهد. اگرچه این روش میزان داروی سمی وارد شده به بدن را کاهش می‌دهد، بهبود نرخ رهایش مطلوب به نظر می‌رسد. پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آتی، نرخ رهایش متوترکسات از ریزسوزن‌های پلی‌وینیل الکل و هیالورونیک اسید با دوزهای بارگذاری شده بالاتر دارو نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. این رویکرد می‌تواند هم زمان رهایش دارو و رسیدن به حالت پایدار در نمودار رهایش را طولانی‌تر کرده و هم نیاز به تعویض مکرر پیچ توسط بیمار را به یک بار در روز یا حتی یک بار در هفته کاهش دهد [۳۸]. از سوی دیگر، ماهیت آب‌دوستی ذاتی متوترکسات و انحلال‌پذیری بالای آن در محیط آبی، به وضوح در نمودار رهایش برون‌تنی و در قالب پدیده رهایش انفجاری اولیه مشهود است. این پدیده، که ناشی از حل شدن سریع و گسترده دارو در محیط هیدروفیلیک و ایجاد یک گرادیان غلظت بسیار شیب‌دار در عرض غشا است، به طور همزمان هم رهایش سریع را تضمین می‌کند و هم نفوذ کارآمد دارو را در بافت پوست تسهیل می‌نماید. با این حال، همین ویژگی منجر به دفع سریع سیستمیک و کاهش زمان ماندگاری دارو در بدن می‌شود. همین محدودیت، انگیزه اصلی بسیاری از پژوهش‌ها برای مکانیسم‌های جایگزین، از جمله بارگذاری این دارو در نانوحامل‌های آب‌گریز بوده است. این راهبرد با هدف دستیابی به یک پروفایل رهایش پایدار و کنترل‌شده، جلوگیری از دفع زود هنگام و در نهایت افزایش زمان ماندگاری دارو در بافت هدف فراهمی زیستی بهتر پیگیری می‌شود.

یافته‌های پژوهش حاضر در زمینه دستیابی به پروفایل رهایشی چند فازی برای متوترکسات از ریزسوزن‌های حل‌شونده، با نتایج مطالعه *Hongyao Du* و همکاران همسو است [۳۹]. با این حال، زمان رسیدن به فاز رهایش پایدار در پژوهش آن‌ها کوتاه‌تر گزارش شده است. این تفاوت احتمالاً به دلیل ویژگی‌های متفاوت مواد سازنده ریزسوزن‌ها، به ویژه انحلال‌پذیری و خاصیت آب‌دوستی هیالورونیک اسید در مقایسه با پلی‌وینیل الکل، مرتبط است. استفاده از ترکیب پلی‌وینیل الکل و هیالورونیک اسید در فرمولاسیون ریزسوزن‌های ما ممکن است منجر به افزایش زمان انحلال و در نتیجه، تأخیر در رسیدن به فاز رهایش پایدار شده باشد. همچنین، وزن مولکولی بالاتر هیالورونیک اسید به کار رفته در این مطالعه در مقایسه با پژوهش پیشین می‌تواند عامل دیگری در افزایش نرخ انحلال و سرعت رهایش دارو باشد.



شکل ۱۰ - پروفایل رهایش برون تنی متوترکسات از پیچ ریزسوزن‌های حل‌شونده و از میان پوست موش ویستار با استفاده از دستگاه سل فرانتز

این پدیده مهر تأییدی است بر امکان رهایش موضعی دارو چرا که میزان داروی موجود در محفظه گیرنده سل فرانتز و محلول PBS میزان داروی جذب شده توسط مویرگ‌ها و میزان دارو در جریان گردش خون را شبیه‌سازی می‌کند. این رهایش موضعی دارو در بافت هدف با توجه به سمیت بالای متوترکسات، برتری قابل توجهی را به پیچ ریزسوزن‌های حامل متوترکسات در مقایسه با سرنگ‌های از پیش پر شده با دوز یکسان دارو می‌دهد؛ چراکه با تزریق متوترکسات با این سرنگ‌ها، سطح این داروی سمی در سیستم گردش خون به یکباره و به صورت کنترل نشده بالا می‌رود. در مقابل همان‌طور که دیده شد با استفاده از پیچ ریزسوزن‌های حامل متوترکسات، غلظت دارو در ابتدای رهایش به صورت کنترل شده افزایش یافته و سپس به صورت پایدار حفظ می‌شود. علاوه بر این، به علت ماهیت آب‌دوستی متوترکسات نیمه‌عمر این دارو در بدن پایین است و دارو توسط کلیه به سرعت از جریان گردش خون خارج شده و دفع می‌شود. رهایش کنترل شده متوترکسات مطابق نتایج به دست آمده، می‌تواند وجود دوز مشخصی از دارو را در بازه زمانی طولانی‌تر در بافت هدف و حتی جریان گردش خون حفظ کند.

## بحث

در پژوهش حاضر، روش ساخت پیچ‌های ریزسوزن حل‌شونده حاوی داروی متوترکسات و روان‌کننده هیالورونیک اسید به همراه یک لایه پایه انعطاف‌پذیر متشکل از گلیسرول به عنوان پلاستیسایزر مورد بررسی قرار گرفت. پیچ‌های ساخته‌شده قابلیت رهایش موضعی متوترکسات در بافت پس از انحلال ریزسوزن‌ها را نشان دادند. این امر می‌تواند منجر به افزایش زمان ماندگاری دارو در بافت هدف شده و در نتیجه، عوارض جانبی گوارشی ناشی از مصرف خوراکی و تزریقی متوترکسات را کاهش دهد و بازده درمانی را در مقایسه با روش‌های رایج دارورسانی بهبود بخشد. پروفایل رهایش متوترکسات از این پیچ‌ها، برخلاف رهایش غیرقابل کنترل و پیک ناگهانی

رهایش برون تنی متوترکسات هم‌راستا است؛ به طوری که نمودار رهایش تا حدود ۲۴۰ دقیقه پس از اعمال، به حالت پایدار رسیده است.

در این پژوهش همچنین نشان داده شد که افزودن گلیسرول به لایه پایه ریزسوزن‌های حل‌شونده، انعطاف‌پذیری لازم را برای انطباق پیچ با تغییرات انحنای بافت آسیب‌دیده در حین تحرک مفاصل فراهم می‌آورد. این ویژگی می‌تواند به حفظ تماس پیوسته و مؤثر بین پیچ ریزسوزن‌ها و بافت کمک کرده و از رهایش کامل و بدون اختلال دارو و روان‌کننده‌ها در اثر جداشدن پیچ از سطح پوست در طول حرکت مفصل اطمینان حاصل کند. نویسنده پیشنهاد می‌کند که در مطالعات آتی، میزان چسبندگی و قابلیت شکل‌پذیری پیچ در مواجهه با تغییرات انحنای به صورت کمی و با بهره‌گیری از روش‌های استاندارد در تحقیقات پیشین ارزیابی شود. علاوه بر این، بررسی توانایی روان‌کنندگی گلیسرول برای بافت آسیب‌دیده مفاصل در محیط درون‌تنی و در مدل‌های حیوانی نیز به عنوان گام‌های بعدی تحقیق پیشنهاد می‌گردد.

### نتیجه‌گیری

این مطالعه به بررسی پیچ ریزسوزن‌های حل‌شونده حاوی متوترکسات، هیالورونیک اسید و گلیسرول برای درمان آرتريت روماتوئید و کاهش درد پرداخت. ساختار و ریخت‌شناسی ریزسوزن‌ها نشان‌دهنده دقت مناسب روش ساخت و توانایی نفوذ مؤثر در پوست بود. آزمون فشار و نفوذپذیری تأیید کرد که ریزسوزن‌ها توان تحمل نیروی ۰/۱۱ نیوتن و نفوذ تا ۴۲۲ میکرومتر را دارند که شرایط مطلوبی برای رهایش کامل دارو و روان‌کننده فراهم می‌کند. نتایج آزمون رهایش برون‌تنی متوترکسات نشان داد که ۵۶٪ از دارو در بافت باقی می‌ماند که امکان کاهش عوارض جانبی مصرف خوراکی و تزریقی را فراهم می‌آورد. وجود گلیسرول به عنوان پلاستی‌سایزر انعطاف‌پذیری پیچ را افزایش داده و باعث تماس منسجم آن با مفصل در طول دوره رهایش شد که تأثیرگذاری درمان را بهبود می‌بخشد. در مجموع این روش، یک راهکار نوین و کارآمد برای رهایش هدفمند دارو در درمان آرتريت روماتوئید ارائه می‌دهد.

### قدردانی

محققین این پژوهش مراتب تشکر و قدردانی خود را از حمایت‌های مادی و معنوی دانشکدگان علوم و فناوری‌های میان‌رشته‌ای دانشگاه تهران و استادان گران‌قدر اعلام می‌دارند.

در تلاش برای غلبه بر چالش رهایش نسبتاً سریع متوترکسات از ریزسوزن‌های حل‌شونده، محققان دیگر استراتژی‌های نوینی را دنبال کرده‌اند. یکی از این رویکردها، استفاده از ریزسوزن‌های هیدروژلی به عنوان بستری برای بارگذاری متوترکسات است. این روش با ایجاد یک مخزن دارویی خارجی با نرخ انحلال آهسته‌تر [۱۸] یا با تنظیم خواص هیدروژل (مانند درصد تورم و نرخ جذب آب) [۴۰]، امکان کنترل دقیق‌تر و طولانی‌تر رهایش دارو را فراهم می‌آورد. علاوه بر این، برای مقابله با دفع سریع متوترکسات از طریق کلیه‌ها پس از رهایش، استراتژی دیگری شامل بارگذاری دارو در نانوحامل‌ها و سپس تعبیه این نانوحامل‌های حاوی دارو در ساختار ریزسوزن‌های حل‌شونده مورد توجه قرار گرفته است [۱۷، ۴۱]. این روش با هدف محافظت از دارو و تسهیل رهایش پایدارتر آن در طول زمان دنبال می‌شود.

در پژوهش حاضر، قابلیت انحلال کامل ریزسوزن‌های حاوی هیالورونیک اسید در بافت و رهایش این ماده در محل آسیب‌دیده نیز به اثبات رسید. با وجود این یافته امیدوارکننده در زمینه ساخت پیچ، انجام تحقیقات درون‌تنی و حیوانی در آینده برای تأیید اثربخشی درمانی رهایش هیالورونیک اسید از طریق ریزسوزن‌ها در بافت آسیب‌دیده ضروری به نظر می‌رسد. این امر از آن جهت اهمیت دارد که تزریق‌های رایج هیالورونیک اسید در درمان استئوآرتريت مستقیماً به عمق بافت مفاصل آسیب‌دیده انجام می‌شود [۴۲]، در حالی که پیچ‌های ریزسوزن حل‌شونده پیشنهادی در این مطالعه قادر به نفوذ تا عمق حدود ۲۴۶ میکرومتر هستند. لذا، انجام آزمایش‌های تکمیلی برای تعیین توانایی هیالورونیک اسید با وزن مولکولی بالا مورد استفاده در این پژوهش در نفوذ به لایه‌های عمیق‌تر بافت آسیب‌دیده الزامی است. اگرچه استفاده از هیالورونیک اسید با وزن مولکولی پایین‌تر می‌تواند راهکاری برای افزایش نفوذ باشد، مطالعات نشان داده‌اند که این نوع هیالورونیک اسیدها ویسکوالاستیسیته لازم برای روان‌کنندگی و تحمل بار در مفاصل آسیب‌دیده را به طور مطلوب تأمین نمی‌کنند [۴۳].

اگرچه نرخ انحلال ریزسوزن‌ها در محیط ژل آگاروز ۲٪ (با ۹۸٪ رطوبت) حدود ۶۰ ثانیه اندازه‌گیری شده است، اما باید توجه داشت که این شرایط با محیط واقعی پوست تفاوت‌های اساسی دارد. بافت پوست، با رطوبت ۶۴-۷۰٪ و ساختار پیچیده سلولی و چندلایه‌ای خود، موجب کاهش قابل توجه سرعت انحلال می‌شود. بر اساس مطالعات پیشین روی ریزسوزن‌های پلی‌وینیل‌الکلی [۴۴] و نمونه‌های تجاری مبتنی بر هیالورونیک اسید مانند پیچ ضد آکنه ZitSticka™، زمان تخریب معمولاً بین ۱ تا ۸ ساعت گزارش شده است. این تأخیر در نرخ انحلال‌پذیری ریزسوزن‌ها با روند کند رسیدن به تعادل در پروفایل

## مراجع

- [1] Rezaee M., Lotfi F., Gholami A., Azizpoor J., Aflaki E., Vazin A., Keshavarz K., [Economic Burden of Rheumatoid Arthritis in Iran: A Societal Perspective Economic Burden of RA.](#) (2022).
- [2] Radu A. F., Bungau S.G., [Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview.](#) *Cells*, **10(11)**: 2857 (2021).
- [3] Weyand C.M., Goronzy J.J., [The Immunology of Rheumatoid Arthritis.](#) *Nature immunology*, **22(1)**: 10-18 (2021).
- [4] Dahl L.B., Dahl I.M., Engström-Laurent A., Granath K., [Concentration and Molecular Weight of Sodium Hyaluronate in Synovial Fluid from Patients with Rheumatoid Arthritis and Other Arthropathies,](#) *Annals of the rheumatic diseases*, **44(12)**: 817-822 (1985).
- [5] Kosinska M.K., Ludwig T.E., Liebisch G., Zhang R., Siebert H.C., Wilhelm J., Steinmeyer, J., [Articular Joint Lubricants During Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis Display Altered Levels and Molecular Species.](#) *PloS one*, **10(5)**: e0125192 (2015).
- [6] Guo Q., Wang Y., Xu D., Nossent J., Pavlos N.J., Xu J., [Rheumatoid Arthritis: Pathological Mechanisms and Modern Pharmacologic Therapies.](#) *Bone research*, **6(1)**: 15 (2018).
- [7] Zhang W., Yin G., Zhao H., Ling H., Xie Z., Xiao C., Chen Y., Lin Y., Jiang, T., Jin S., Wang J., [Secreted KIAA1199 Promotes the Progression of Rheumatoid Arthritis by Mediating Hyaluronic Acid Degradation in an ANXA1-Dependent Manner.](#) *Cell death & disease*, **12(1)**: 102 (2021).
- [8] Seo J., Park S.H., Kim M.J., Ju H.J., Yin X.Y., Min B.H., Kim M.S., [Injectable Click-Crosslinked Hyaluronic Acid Depot to Prolong Therapeutic Activity in Articular Joints Affected by Rheumatoid Arthritis.](#) *ACS applied materials & interfaces*, **11(28)**: 24984-24998 (2019).
- [9] Caporali R., Caprioli M., Bobbio-Pallavicini F., Montecucco C., [DMARDS and Infections in Rheumatoid Arthritis.](#) *Autoimmunity reviews*, **8(2)**: p. 139-143 (2008).
- [10] Friedman B., Cronstein B., [Methotrexate Mechanism in Treatment of Rheumatoid Arthritis,](#) *Joint bone spine*, **86(3)**: 301-307 (2019).
- [11] Wang W., Zhou H., Liu L., [Side Effects of Methotrexate Therapy for Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review.](#) *European journal of medicinal chemistry*, **158**: 502-516 (2018).
- [12] Bianchi G., Caporali R., Todoerti M., Mattana P., [Methotrexate and Rheumatoid Arthritis: Current Evidence Regarding Subcutaneous Versus Oral Routes of Administration.](#) *Advances in therapy*, **33**: 369-378 (2016).
- [13] Gorantla S., Batra U., Samshritha R.N., Puppala E.R., Waghule,T., Naidu V.G.M., Singhvi G., [Emerging Trends in Microneedle-Based Drug Delivery Strategies for the Treatment of Rheumatoid Arthritis.](#) *Expert Opinion on Drug Delivery*, **19(4)**: 395-407 (2022).
- [14] Rad Z.F., Prewett P.D., Davies G.J., [An Overview of Microneedle Applications, Materials, and Fabrication Methods.](#) *Beilstein journal of nanotechnology*, **12(11)**: 1034-1046 (2021).
- [15] Teymoori M., Poorkhalil A., Farrokhzad H., Tabesh H., [Glucose Responsive Microneedle Patch Using a Reversible and an Irreversible Crosslinking Agents.](#) *Results in Engineering*, 106134 (2025).

- [16] Vora D., Garimella H.T., German C.L., Banga A.K., [Microneedle and Iontophoresis Mediated Delivery of Methotrexate Into and Across Healthy and Psoriatic Skin](#). *International journal of pharmaceutics*, **618**: 121693 (2022).
- [17] Tekko, I. A., Permana, A. D., Vora L., Hatahet T., McCarthy H.O., Donnelly R.F., [Localised and Sustained Intra-dermal Delivery of Methotrexate using Nanocrystal-Loaded Microneedle Arrays: Potential for Enhanced Treatment of Psoriasis](#). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **152**: 105469 (2020).
- [18] Tekko I.A., Chen G., Domínguez-Robles J., Thakur R.R.S., Hamdan I.M., Vora L., Larrañeta E., McElnay J.C., McCarthy H.O., Rooney M. Donnelly R.F., [Development and Characterisation of Novel Poly \(Vinyl Alcohol\)/Poly \(Vinyl Pyrrolidone\)-Based Hydrogel-Forming Microneedle Arrays for Enhanced and Sustained Transdermal Delivery of Methotrexate](#). *International journal of pharmaceutics*, **586**: 119580 (2020).
- [19] Rajendran K., Pahal S., Badnikar K., Nayak M.M., Subramanyam D.N., Vemula P.K., Krishnan U.M., [Methotrexate Delivering Microneedle Patches for Improved Therapeutic Efficacy in Treatment of Rheumatoid Arthritis](#). *International Journal of Pharmaceutics*, **642**: 123184 (2023).
- [20] Zhao W., Zheng L., Yang J., Ma Z., Tao X., Wang Q., [Dissolving Microneedle Patch-Assisted Transdermal Delivery of Methotrexate Improve the Therapeutic Efficacy of Rheumatoid Arthritis](#). *Drug Delivery*, **30(1)**: 121-132 (2023).
- [21] Orr C., Vieira-Sousa E., Boyle D.L., Buch M.H., Buckley C.D., Cañete J.D., Catrina A.I., Choy E.H., Emery P., Fearon U. Filer A., [Synovial Tissue Research: A State-of-the-Art Review](#). *Nature Reviews Rheumatology*, **13(8)**: 463-475 (2017).
- [22] Kim K.S., Park S.J., Yang J.A., Jeon J.H., Bhang S.H., Kim B.S., Hahn S.K., [Injectable Hyaluronic Acid–Tyramine Hydrogels for the Treatment of Rheumatoid Arthritis](#). *Acta biomaterialia*, **7(2)**: 666-674 (2011).
- [23] Chou C.L., Li H.W., Lee S.H., Tsai K.L., Ling H.Y., [Effect of Intra-Articular Injection of Hyaluronic Acid in Rheumatoid Arthritis Patients with Knee Osteoarthritis](#). *Journal of the Chinese Medical Association*, **71(8)**: 411-415 (2008).
- [24] Lu K.H., Lu P.W.A., Lin C.W., Lu E.W.H., Yang S.F., [Different Molecular Weights of Hyaluronan Research in Knee Osteoarthritis: A State-of-the-Art Review](#). *Matrix Biology*, **117**: 46-71 (2023).
- [25] Mishra A., Pathak A., [Plasticizers: A Vital Excipient in Novel Pharmaceutical Formulations](#). *Current Research in Pharmaceutical Sciences*, 1-10 (2017).
- [26] Ananda P.W.R., Elim D., Zaman H.S., Muslimin W., Tunggeng M.G.R., Permana A.D., [Combination of Transdermal Patches and Solid Microneedles for Improved Transdermal Delivery of Primaquine](#). *International Journal of Pharmaceutics*, **609**: 121204 (2021).
- [27] Kochhar J.S., Soon W.J., Choi J., Zou S., Kang L., [Effect of Microneedle Geometry and Supporting Substrate on Microneedle Array Penetration into Skin](#). *Journal of pharmaceutical sciences*, **102(11)**: 4100-4108 (2013).

- [28] Wu M., Xia T., Li Y., Wang T., Yang S., Yu J., Liang Q., Shen T., Yu M. Zhao B., [Design and Fabrication of R-Hirudin Loaded Dissolving Microneedle Patch for Minimally Invasive and Long-Term Treatment of Thromboembolic Disease](#). *Asian journal of pharmaceutical sciences*, **17(2)**: 284-297 (2022).
- [29] Cao J., Zhang, N., Wang Z., Su J., Yang J., Han J., Zhao Y., [Microneedle-Assisted Transdermal Delivery of Etanercept for Rheumatoid Arthritis Treatment](#). *Pharmaceutics*, **11(5)**: 235 (2019).
- [30] Lu Y., Xiao T., Lai R., Liu Z., Luo W., Wang Y., Fu S., Chai G., Jia J. Xu Y., [Co-Delivery of Loxoprofen and Tofacitinib by Photothermal Microneedles for Rheumatoid Arthritis Treatment](#). *Pharmaceutics*, **15(5)**: 1500 (2023).
- [31] Zhang D., Das D.B., Rielly C.D., [Microneedle Assisted Micro-Particle Delivery from Gene Guns: Experiments using Skin-Mimicking Agarose Gel](#). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **103(2)**: 613-627 (2014).
- [32] Wei H., Liu S., Tong Z., Chen T., Yang M., Guo Y., Sun H., Wu Y., Chu Y. Fan L., [Hydrogel-Based Microneedles of Chitosan Derivatives for Drug Delivery](#). *Reactive and Functional Polymers*, **172**: 105200 (2022).
- [33] Oliveira C., Teixeira J.A., Oliveira N., Ferreira S., Botelho C.M., [Microneedles' Device: Design, Fabrication, and Applications](#). *Macromol*, **4(2)**: 320-355 (2024).
- [34] Jeong J., Park J., Lee S., [3D Printing Fabrication Process for Fine Control of Microneedle Shape](#). *Micro and Nano Systems Letters*, **11(1)**: 1 (2023).
- [35] Yang H.W., Ju S.P., Chen H.Y., Cheng Y.C., Hsu W.L., [Ovalbumin-Loaded Gelation Microneedles Made of Predictive Formulation by Molecular Dynamics Simulation for Enhancement of Skin Immunization](#). *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **5(11)**: 6012-6021 (2019).
- [36] Larrañeta E., Moore J., Vicente-Pérez E.M., González-Vázquez P., Lutton R., Woolfson A.D., Donnelly R.F., [A Proposed Model Membrane and Test Method for Microneedle Insertion Studies](#). *International journal of pharmaceutics*, **472(1-2)**: 65-73 (2014).
- [37] Liu T., Fu J., Chen M., Wu Q., Quan G., Wu C., Pan X., [In Situ Polymeric Nanomicelle-Generating Dissolving Microneedle Patch for Enhanced Transdermal Methotrexate Delivery in Rheumatoid Arthritis Treatment](#). *European Polymer Journal*, **210**: 113008 (2024).
- [38] Penn M.J., Hennessy M.G., [Optimal Loading of Hydrogel-Based Drug-Delivery Systems](#). *Applied Mathematical Modelling*, **112**: 649-668 (2022).
- [39] Du H., Liu P., Zhu J., Lan J., Li Y., Zhang L., Zhu J. Tao J., [Hyaluronic Acid-Based Dissolving Microneedle Patch Loaded with Methotrexate for Improved Treatment of Psoriasis](#). *ACS applied materials & interfaces*, **11(46)**: 43588-43598 (2019).
- [40] Himawan A., Anjani Q.K., Detamornrat U., Vora L.K., Permana A.D., Ghanma R., Naser Y., Rahmawanty D., Scott C.J. Donnelly R.F., [Multifunctional Low Temperature-Cured PVA/PVP/Citric Acid-Based Hydrogel Forming Microarray Patches: Physicochemical Characteristics and Hydrophilic Drug Interaction](#). *European Polymer Journal*, **186**: 111836 (2023).

- [41] Du H., Yang J., Li M., Xia Y., Li Y., Zhu J., Zhang L. Tao J., [Microneedle-Assisted Percutaneous Delivery of Methotrexate-Loaded Nanoparticles Enabling Sustained Anti-Inflammatory Effects in Psoriasis Therapy](#). *Journal of Materials Chemistry B*, **12(10)**: 2618-2627 (2024).
- [42] Evanich J.D., Evanich C.J., Wright M.B., Rydlewicz J.A., [Efficacy of Intraarticular Hyaluronic Acid Injections in Knee Osteoarthritis](#). *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, **39**: 173-181 (2001).
- [43] Gigis I., Fotiadis E., Nenopoulos A., Tsitas K., Hatzokos I., [Comparison of Two Different Molecular Weight Intra-Articular Injections of Hyaluronic Acid for the Treatment of Knee Osteoarthritis](#). *Hippokratia*, **20(1)**: 26 (2016).
- [44] Saepang K., Buranrat B., Pitaksuteepong T., Boontha S., [Effect of Polyvinyl Alcohol Concentrations on the Characteristics and in Vitro Skin Permeation of Rhein-Loaded Dissolving Microneedle Patches](#). *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **108**: 106955 (2025).