نشریه علمی «علوم و فناوری‌های پدافند نوین»
سال دهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸؛ ص ۲۱۰-۲۰۳

سنتز و بررسی سمیت تری متیل کیتوزان کلرید به‌عنوان حامل واکسن و دارو

محمدرضا اکبری[1*]، مجتبی سعادتی[2]، حسین هنری[3]، جمیل زرگان[4]

۱- دانشجوی دکتری، ۲- استاد، ۳ و ۴- دانشیار، دانشگاه جامع امام حسین(ع)

(دریافت: ۹۷/۰۲/۱۵، پذیرش: ۹۷/۰۷/۱۸)

چکیده

تری متیل کیتوزان برای انتقال ژن، داروهای پپتیدی و واکسن‌ها از طریق مسیرهای مخاطی بینی و خوراکی به‌کار گرفته می‌شود. این پلیمر یک مشتق کیتوزان است که حلالیت آن در آب از طریق متیلاسیون گروه آمین نوع اول و تبدیل آن به آمونیوم افزایش پیدا کرده است. در این فرایند، متیلاسیون گروه هیدروکسی نیز انجام می‌شود که حلالیت آن در آب را کاهش می‌دهد. هدف این مطالعه بررسی سمیت تری متیل کیتوزان با وزن مولکولی بالا و درصد بیشتری از آمین نوع چهارم بوده است. به این منظور ابتدا دی متیل کیتوزان با روش متیلاسیون Eschweiler-Clarke سنتز گردید. سپس برای پرهیز از متیلاسیون گروه هیدروکسی که در شرایط قلیایی اتفاق می‌افتد ادامه متیلاسیون توسط واکنش Menshutkin و با استفاده از یدومتان به‌عنوان عامل آلکیله‌کننده و در حلال NMP انجام شد. درصد دی متیلاسیون و کواترنیزاسیون با روش‌های NMR و FTIR تعیین شد. میزان سمیت سلولی محصول تولیدشده، با روش MTT علیه سلول‌های اپی‌تلیال Caco2 بررسی شد. فعالیت همولیتیک محصول سنتزی نیز با روش رهایش هموگلوبین در گلبول‌های قرمز انسانی انجام شد. داده‌ها از لحاظ آماری با روش ANOVA و آزمون توکی بررسی شدند. پلیمر سنتز شده تا غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در سلول Caco2 فاقد سمیت بود و تا سطح ۰/۰۰۱ اختلاف معنادار مشاهده نشد ($p<0/001$). در آزمایش رهایش هموگلوبین نیز با افزایش غلظت پلیمر افزایش سمیت مشاهده نشد. بنابراین پلیمر سنتز شده می‌تواند به‌عنوان یک حامل انتقال مواد زیستی به کار رود.

کلیدواژه‌ها: تری متیل کیتوزان، متوکسی، سمیت سلولی، رهایش گلبول قرمز، انتقال واکسن

Synthesis and Toxicity Assay of Trimethyl Chitosan Chloride as a Carrier for Vaccines and Drugs

M. R. Akbari*, M. Saadati , H. Honari, J. Zargan
Imam Hossein University
(Received: 05/05/2018; Accepted: 10/10/2018)

Abstract

Tri-methyl chitosan is used to deliver genes, peptide drugs and vaccines through nasal and oral mucosal routes. This polymer is a chitosan derivative that the solubility in water has been enhanced by methylation of primary amine group and its convertion to quaternary amonium. During this process, O-methylation also occurs, reducing the water solubility of the product. The purpose of this study is to evaluate the toxicity of trimethyl chitosan with high molecular weight and high degree of quaternary amine. Thus, high molecular weight chitosan was used for the synthesis of dimethyl chitosan through the Eschweiler-Clarke methylation method. Then, to avoid the O-methylation, methylation was continued by Menshutkin reaction using iodomethane as alkylating agent in NMP solvent. The quaternized chitosan was characterized by NMR and FTIR spectroscopy methods. The cytotoxicity of the product was investigated on Caco-2 cells via MTT assay. Hemolytic activity of the synthesized polymer was evaluated using haemoglobin release test. The data were statistically analyzed by ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. The results showed that the synthesized polymer had no toxicity on Caco2 cells (up to the concentration of 1 mg/ml) ($p<0.001$). Haemoglobin release test further confirmed the lack of toxicity of the polymer up to the mentioned concentration. In conclusion, the polymer can be envisaged as a carrier in biomaterials delivery.

Keywords: Trimethyl Chitosan Chloride, O-methyl free, Cell Toxicity, Haemoglobin Release, Vaccine Delivery

*Corresponding Author E-mail: makbari@ihu.ac.ir

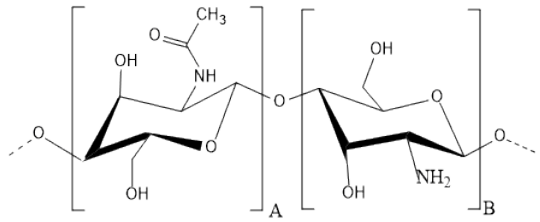
۱. مقدمه

با توجه به ظهور مداوم واکسن‌ها و داروهای جدید پپتیدی، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک تقاضاهای زیادی برای سامانه‌های تحویل دارویی جدید از راه خوراکی و سایر روش‌های غیر تزریقی وجود دارد. در اوایل دهه ۱۹۹۰، دو کلاس جدید از مواد تقویت‌کننده نفوذ پلیمری شناسایی شد. این پلیمرها در زمان طولانی و در حجم زیاد به‌عنوان مواد «خنثی[1]» همراه داروها استفاده شده‌اند. هردو کلاس از این پلیمرها به مخاط چسبندگی دارند. این کلاس‌های جدید، پلی آکریلات‌ها[2] و نمک‌های کیتوزان[3] هستند که توانایی باز کردن برگشت‌پذیر اتصالات محکم را داشته و اجازه نفوذ مواد هیدروفیلی در بافت‌های مخاطی را از مسیر کنار سلولی[4] می‌دهند و می‌توانند منجر به انتقال مجاور سلولی[4] داروها و پروتئین‌ها به سمت دیگر لایه سلولی و اپی‌تلیال شوند [۱].

از آنجا که این رده از تقویت‌کننده‌های نفوذ پلیمری تنها در اتصالات بین سلولی عمل کرده و مولکول‌های هیدروفیل را فقط از مسیر مجاور سلولی انتقال می‌دهند، لذا تداخل اضافی دیگری با سلول ندارند، درحالی‌که سایر مولکول‌های کوچک افزایش‌دهنده جذب با تداخل در مولکول‌های غشای سلولی، انتقال دارو را از طریق آسیب‌های غشایی انجام می‌دهند. از طرف دیگر چون این پلیمرها ماکرو مولکول‌هایی هیدروفیل هستند، جذب آن‌ها توسط سلول‌های انتروسیت ناچیز بوده و کمترین اثر را بر این سلول‌ها دارند [۲].

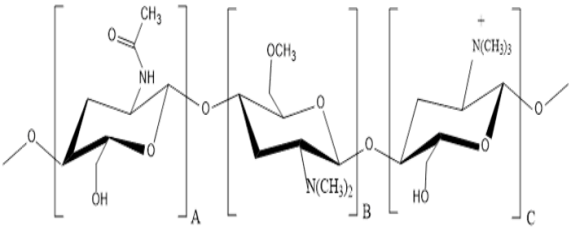
علی‌رغم استفاده از این پلیمر برای نفوذ از سدهای اپی‌تلیال، ازجمله انتقال خوراکی پپتیدها به داخل جریان گردش خون [۴- ۳]، تاکنون هیچ مطالعه‌ای درباره سمیت بر غشا گلبول‌های قرمز خون انجام نشده است. همچنین گزارش‌های مربوط به اثر این پلیمر با درجه کواترنیزاسیون بالا بر سلول‌های اپی‌تلیال ارائه نشده است.

کیتوزان پلی‌ساکاریدی با بار مثبت است و تنها در محیط‌هایی با pH اسیدی محلول است [۵]. چگالی بار الکتریکی کیتوزان که همان درجه پروتونه شدن گروه‌های آمینی کیتوزان است، به‌وسیله نوع ترکیب شیمیایی، وزن مولکولی (MW) کیتوزان و متغیرهای خارجی مانند pH و قدرت یونی تعیین می‌شود [۷-۶]. امروزه کیتوزان در وزن‌های مختلف مولکولی (پلیمرهای ۵۰ تا ۵۰۰ کیلو دالتون)، درجات مختلف گرانروی و با درجات مختلف استیل زدایی شده (۹۸-۴۰درصد) در دسترس است (شکل ۱).



شکل ۱. پلیمر کیتوزان، :A واحد استیله، :B واحد استیل زدایی شده

کیتوزان فقط در محیط اسیدی، که در آن گروه‌های آمینی کیتوزان در موقعیت C-2 پروتونه می‌شوند می‌تواند در آب حل شود، در pH خنثی بیشتر مولکول‌های کیتوزان شارژ الکتریکی را ازدست‌داده و در محیط رسوب می‌دهند [۱]. تری متیل کیتوزان مشتقی از کیتوزان حاوی یون آمونیوم نوع چهارم است که در pH محدوده فیزیولوژیک به شکل محلول است و می‌تواند برای انتقال مواد زیستی و داروها از سد اپی‌تلیال روده به‌کار گرفته شود. در این پلیمر گروه آمین در pH خنثی به‌صورت کاتیون کوات[1] است شکل (۲).



شکل ۲. شمای پلیمر TMC ، A: آمین استیله، B: أ- متیلاسیون، C: یون آمونیوم نوع چهارم (کوات)

سه کاربرد مهم برای تری متیل کیتوزان گزارش شده است. این کاربردها شامل ابزاری برای تحویل ژن[2]، به‌عنوان افزایش‌دهنده جذب برای انتقال مولکول‌های آب‌دوست مانند پروتئین‌های محلول در سراسر لایه اپی‌تلیوم و نیز برای کاربردهای آرایشی است [۸]. در حال حاضر تری متیل کیتوزان (TMC) برای استفاده در تحویل مواد به‌صورت خوراکی، مورد توجه قرارگرفته است [۹]. روش‌های متعددی برای سنتز TMC به کار گرفته‌شده است اما آنچه اهمیت دارد این است که TMC مورد استفاده در تحقیقات زیستی دارای درجات متغیر أ-متیلاسیون (DOM) و وزن مولکولی در زنجیره پلیمری هستند شکل (۲).

فرایندهای مورد استفاده برای سنتز تری متیل کیتوزان، دارای شرایط دشوار، شامل دمای بالا و محیط اسیدی است و ممکن است موجب تجزیه پلیمر و یا ایجاد محصولات جانبی شود. بنابراین در مطالعات و ارزیابی‌های زیستی افزایش سمیت مشاهده می‌شود. بعضی از محققین ادعا می‌کنند تری‌متیل

[1] Quaternary Ammonium Cations, also known as Quats
[2] Gene Delivery

کیتوزان سنتز شده تا غلظت ۱ درصد در سلول‌های Caco-2 سمیت ندارد [۱۰]، ولی برخی دیگر برای TMC (با درجات بالای آمونیوم نوع چهارم) در غلظت‌های کمتر از ۱ درصد نیز سمیت مشاهده کرده‌اند [۱۱]. این تفاوت در نتایج قضاوت برای کاربردهای تجاری را با مشکل مواجه نموده است [۱۲].

سنتز تری متیل کیتوزان با روش‌های مختلف باعث تنوع ساختاری پلیمر شده است. در سال ۲۰۱۰ برای اولین بار ورهیول[1] در رساله دکتری پیشنهاد استفاده از روش دومرحله‌ای برای سنتز تری متیل کیتوزان را مطرح کرد. در این روش ابتدا دی متیل کیتوزان سنتز شده و سپس به تری متیل کیتوزان تبدیل می‌شود. در این روش اُ- متیلاسیون[2] اتفاق نمی‌افتد [۱۳]. حذف این عامل جانبی از تری متیل کیتوزان به معنی حذف یک متغیر مهم بوده و متغیرهای مربوط به بررسی سمیت این ماده را کاهش می‌دهد.

۲. روش تحقیق

۲-۱. مواد و دستگاه ها

فرمیک اسید، دی اتیل اتر، فرمالدئید، متیل یدید، NMP[3]، گلیسرول، استون، اتانول، استیک اسید، اسیدکلریدریک، تری فلورو استیک اسید، سدیم هیدروکسید، سدیم کلرید و MTT[4] از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند. کیتوزان با وزن مولکولی ۳۱۰ تا ۳۷۵ کیلو دالتون از شرکت سیگما (آلمان) خریداری شد. سلول *Caco-2* برای مطالعه اثر سمیت به‌عنوان الگوی سلول‌های اپی‌تلیال، از بانک سلول‌های انسانی و جانوری مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران *IBRC* خریداری گردید. طیف سنجی ^{1}H-NMR پلیمرهای سنتزی با دستگاه اسپکترومتر ۵۰۰ مگاهرتزی Varian ساخت کشور آمریکا، در حلال D_2O و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس انجام شد. برای نمونه‌سازی و حل کردن پلیمر در D_2O از DCl (دوتریوم کلرید) استفاده شد. آنالیز حرارتی[5] با دستگاه Netzsch ساخت کشور آمریکا، با نرخ تغییر دمایی ۱۰ درجه سلسیوس بر دقیقه و تحت جریان گاز نیتروژن با سرعت ۲۰ میلی‌لیتر بر دقیقه و در محدوده دمایی ۲۵ تا ۴۰۰ درجه سلسیوس انجام شد. طیف جذب مادون‌قرمز با استفاده از دستگاه PerkinElmer به‌صورت قرص KBr بررسی شد. خشک کردن نمونه‌ها در حالت منجمد در دمای ۹۰- درجه سلسیوس توسط فریزدرایر Christ ساخت کشور آلمان در فشار ۰/۰۵ میلی‌بار انجام شد. برای بررسی حلالیت جذب محلول‌های تری متیل کیتوزان در طول‌موج ۵۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر Cecill, 1011 ساخت کشور انگلستان اندازه‌گیری شد.

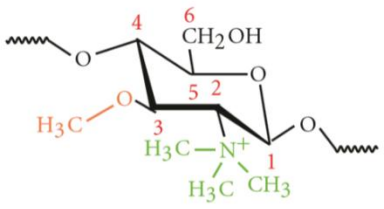
۲-۲. سنتز و مشخصه یابی تری متیل کیتوزان کلرید

برای سنتز تری متیل کیتوزان، روش دو مرحله‌ای ورهیول مورد استفاده قرار گرفت [۱۳]. کیتوزان در ابتدا طی واکنش Eschweiler-Clarke با فرمالدئید و فرمیک اسید به دی متیل کیتوزان (DMC) تبدیل شد. DMC سنتزشده توسط سدیم هیدروکسید ۱ مولار به pH حدود ۱۲ رسانده شد تا تبدیل به ژل شود. ژل حاصل توسط آب مقطر دیونیزه شستشو و توسط اسید کلریدریک ۱ مولار در pH حدود ۴ در آب مقطر حل گردید. محلول حاصل به مدت ۴۸ ساعت علیه آب مقطر دیونیزه دیالیز شد و در نهایت با روش فریزدرای خشک گردید. محصول سفید رنگ به‌دست‌آمده برای طیف‌سنجی‌های ^{1}H-NMR و FTIR مورد استفاده قرار گرفت.

در طیف سنجی ^{1}H-NMR، درجه دی متیلاسیون از طریق معادله (۱) محاسبه گردید

$$DDM\% = \left[\frac{[(CH_3)_2]}{[H]}\frac{1}{6}\right] \times 100 \qquad (۱)$$

مطالعات قبلی نشان داده در صورت استفاده از اسید برای حل کردن مشتقات کیتوزان پیک‌های مربوط به استخلاف متیل به خاطر پروتونه شدن گروه آمین به جابجایی‌های شیمیایی بالاتر تغییر مکان می‌دهند [۱۴-۱۵]. در این معادله [H1] سطح زیر منحنی در جابجایی شیمیایی ۴/۷ ppm تا ۵/۷ ppm بوده و مربوط به هیدروژن کربن شماره ۱ است شکل (۳). [$(CH_3)_2$] سطح زیر منحنی در جابجایی شیمیایی ۳ ppm بوده و مربوط به هیدروژن‌های گروه‌های آمینو دی‌متیله شده است [۱۶].



شکل ۳. راهنمای شماتیک محل هیدروژن‌های پیوندی در TMC

واکنش برای سنتز TMC بر اساس روش موزارلی و تانفانی با برخی اصلاحات ادامه داده شد. محصول DMC در NMP حل‌شد و با اضافه کردن یدومتان در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به TMC تبدیل شد. زمان واکنش تعیین کننده درصد تری متیلاسیون در نظر گرفته شد. نمونه سنتز شده در سدیم کلرید ۱۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت در کیسه دیالیز با منافذ کمتر از ۱۲ کیلودالتون

[1] Verheul
[2] O-methylation
[3] N-methyl-2-pyrrolidone
[4] Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
[5] Thermogravimetric Analysis

دیالیز گردید تا یون کلرید جایگزین یدید شود. در نهایت تری‌متیل کیتوزان کلرید سنتزشده به مدت سه روز با آب مقطر دیونیزه، دیالیز و خالص‌سازی شد (روزی دو مرتبه تعویض گردید) و پس از عبور از فیلتر ۰/۸ میکرونی، توسط فریزدرایر خشک شد. محصول سفید رنگ حاصل برای طیف‌سنجی‌های ^{1}H-NMR و FTIR مورد استفاده قرار گرفت.

در طیف‌سنجی ^{1}H-NMR، درجه تری‌متیلاسیون از طریق معادله (۲) محاسبه گردید:

$$DQ\% = \left[\frac{[(CH_3)_3]}{[H]}\frac{1}{9}\right] \times 100 \qquad (۲)$$

در این معادله [H1] سطح زیر منحنی در جابجایی شیمیایی ۴/۹ ppm تا ۵/۷ ppm مربوط به هیدروژن کربن شماره ۱ است و [$(CH_3)_3$] سطح زیر منحنی در جابجایی شیمیایی ۳/۳ ppm مربوط به هیدروژن‌های تری‌متیل آمونیوم است.

درجه کواترنیزاسیون (DQ)، درجه اُ-متیلاسیون DOM در نمونه‌های TMC سنتزشده طبق منابع براساس معادلات (۳) و (۴) برحسب درصد محاسبه گردید.

$$DQ\% = \left[\frac{[(CH_3)_3]}{[H]}\frac{1}{9}\right] \times 100 \qquad (۳)$$

$$DOM\% = \left[\frac{[(OCH_3)]}{[H]}\frac{1}{3}\right] \times 100 \qquad (۴)$$

جابجایی شیمیایی گروه‌های هیدروکسی متیله شده در ۳/۴ ppm (DOM-6) و ۳/۵ ppm (DOM-3) است. عبارت [H] سطح زیر پیک‌های H-1 در ۴/۷ ppm و ۵/۷ ppm است؛ که مربوط به سیگنال پیوند اتم‌های هیدروژن با کربن C-1 مولکول TMC می‌باشد.

انحلال‌پذیری در آب برای پلیمرهای مختلف در pH معادل ۷ در دمای اتاق تعیین گردید. ابتدا پلیمرها با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در طول یک‌شب در محلول اسید استیک ۰/۵ درصد حل شدند. سپس با استفاده از محلول هیدروکسید سدیم ۱ مولار، pH به ۷ افزایش داده شد و جذب محلول در طول‌موج ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه‌های پلیمر سنتز شده با درصد عبور کمتر از ۹۰ درصد در مقایسه با محلول شاهد ۰/۵ درصد استیک اسید، نامحلول در نظر گرفته شدند و از مطالعه حذف شدند [۱۷].

۲-۳. بررسی سمیت با روش MTT

اثر پلیمرهای سنتزی در سه غلظت ۱۰، ۱ و ۰/۱ میلی‌گرم بر سلول‌های Caco-2 بررسی شد و مراحل انجام آزمایش در پلیت ۹۶ خانه به‌صورت زیر انجام شد.

سلول‌ها از بانک IBRC تهیه شد. سلول آماده‌شده در فلاسک کشت به آزمایشگاه منتقل و در فلاسک کشت پاساژ داده شد. پس از کندن سلول‌ها از ته فلاسک توسط تریپسین و شمارش سلول با لام نئوبار، سلول‌ها به تعداد ۴×۱۰^۴ در هر چاهک، در پلیت ۹۶ خانه کشت داده و حجم چاهک با محیط کشت به ۲۰۰ میکرو لیتر رسانده شد. سلول‌ها به مدت ۲ روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و اتمسفر ۵ درصد دی‌اکسید کربن در محیط کشت (DMEM، گلوکز بالا، ۱۰ درصد FCS، ال-گلوتامین، پیروات، آمینواسیدهای غیرضروری) گرمخانه گذاری شدند. سپس محیط کشت حذف شد و به مدت ۲/۵ ساعت در محلول‌های ۱۰۰ میکرو لیتری TMC در بافر HBSS که حاوی غلظت‌های مختلف پلیمر بودند گرمخانه گذاری شد (غلظت TMC ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود، pH به‌وسیله هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار بر روی ۷ تنظیم شد). به‌عنوان کنترل مثبت، SDS با غلظت (۱۰ mg/ml) مورد استفاده قرار گرفت. بافر HBSS به‌عنوان مرجع حیات‌پذیری صددرصدی سلول‌ها یا کنترل منفی استفاده شد. پس از آن HBSS حذف گردید و سلول‌ها با محلول PBS شستشو داده شدند. صد میکرو لیتر از محلول تازه آماده‌شده ۰/۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT در DMEM (بدون افزودنی)، اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۵ درصد دی‌اکسید کربن گرمخانه‌گذاری شدند. پس از آن چاهک‌ها تخلیه و با HBSS شستشو شد. سپس برای حل نمودن کریستال‌های فورمازون، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO به هر چاهک اضافه و بعد از تثبیت رنگ تحت شرایط تاریکی به مدت ۲ تا ۴ ساعت در دمای اتاق، جذب در ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. جذب توسط دستگاه (Micro plate reader, A biotek) اندازه‌گیری شد.

این آزمایش سه بار انجام و در هر مرتبه در پلیت از هر غلظت ۳ بار تکرار شد و با استفاده از میانگین داده‌ها، درصد زنده ماندن به روش زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد زنده ماندن} = \left(\frac{\text{جذب نوری سلول‌های تیمار شده}}{\text{جذب نوری کنترل}}\right) \times 100$$

درصد زنده ماندن محاسبه‌شده برای غلظت‌های مختلف پلیمر نسبت به سلول Caco-2 در آزمون MTT با نرم‌افزار « GraphPad Prism» مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت. غلظت‌های مختلف TM نسبت به گروه کنترل و همچنین نسبت به یکدیگر، با آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (Anova) بررسی گردید. $p<0.05$ به‌عنوان معنی‌دار بودن نتایج در نظر گرفته شد.

۲-۴. بررسی همولیز گلبول قرمز

فعالیت همولیز به‌وسیله روش یوشیهارا بررسی شد [۱۸]. در این مطالعه از خون داوطلب انسانی استفاده شد. در خون‌گیری

لوله‌های هپارینه مورد استفاده قرار گرفت تا از لخته شدن ممانعت شود. نمونه خون در بافر تریس سرد (بافر نگهداری شده در یخچال) دو بار شستشو شد. pH محلول بافر تریس مورد استفاده ۷/۲ تنظیم شد و حاوی کلرید سدیم (۱۴۷ میلی مولار)، گلوکز (۶ میلی مولار) و Tris-HCl (۲۰ میلی مولار) بود. برای جداسازی و شستشوی گلبول‌ها سانتریفوژ در g× ۷۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. درنهایت گلبول‌های قرمز با غلظت ۲۰ درصد حجمی در این بافر در ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. این گلبول‌ها برای چند روز قابل استفاده هستند. برای بررسی اثر پلیمرها بر آزادسازی هموگلوبین، غلظت نهایی ۳ درصد از این گلبول‌ها استفاده شد.

نمونه‌های پلیمر شامل مقادیر ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در ۱۲۰۰ میکرو لیتر بافر حاوی کلرید سدیم (۷۴ میلی مولار)، سوکروز (۱۴۷ میلی مولار)، گلوکز (۶ میلی مولار) و Tris-HCl با pH ۷/۲ (۲۰ میلی مولار) حل گردید و تا غلظت ۳ درصد به آن گلبول قرمز اضافه شد. سه نمونه گلبول قرمز ۳ درصد در بافر به‌عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. سوسپانسیون‌ها بلافاصله در حمام آب شیکردار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند و به مدت ۶۰ دقیقه در این دما به‌آرامی هم زده شدند. نمونه‌ها در g×۷۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و محلول رویی در ۵۴۰ نانومتر با اسپکتروفتومتری بررسی شد. از نمونه‌های شاهد برای صفر کردن دستگاه استفاده شد. همولیز کامل با استفاده از تریتون X100 با غلظت نهایی ۰/۲ درصد به‌عنوان کنترل مثبت انجام شد و اثر پلیمرها بر آزادسازی هموگلوبولین به‌صورت درصدی از این مقدار گزارش شد. کلیه مراحل به‌صورت سه تکرار انجام شد.

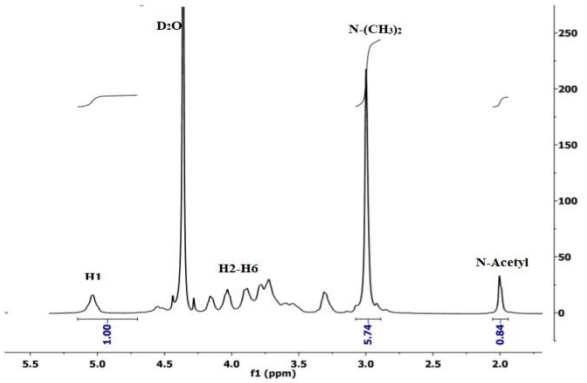
۳. نتایج و بحث

۳-۱. سنتز و مشخصه یابی TMC

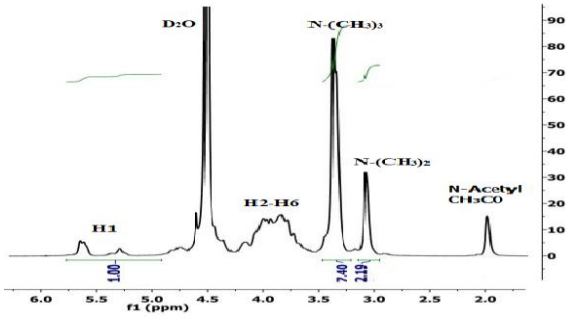
طیف‌سنجی ^{1}H-NMR برای تری‌متیل کیتوزان و دی متیل کیتوزان در شکل‌های (۵-۴) نشان داده شده است. در این مطالعه جابجایی پیک به خاطر استفاده از اسید برای پروتونه کردن محصول سنتزی و افزایش حلالیت آن در D_2O مشاهده می‌شود.

در مورد دی‌متیل کیتوزان طیف به‌دست‌آمده در شکل (۴) برای محاسبه درجه دی متیلاسیون استفاده شد و درصد آن با استفاده از سطوح زیر منحنی در فرمول (۱) محاسبه گردید. نتیجه نشان داد که ۹۵/۶درصد دی متیلاسیون انجام شده است و زمان انجام واکنش کافی بوده است.

درجه کواترنیزاسیون تری‌متیل کیتوزان نیز از طریق طیف به‌دست‌آمده در شکل (۵) و با استفاده از سطوح زیر منحنی در فرمول (۲) محاسبه گردید. نتیجه محاسبه ۸۲/۲ درصد و درجه ا-متیلاسیون گروه هیدروکسی صفر درصد محاسبه شد.



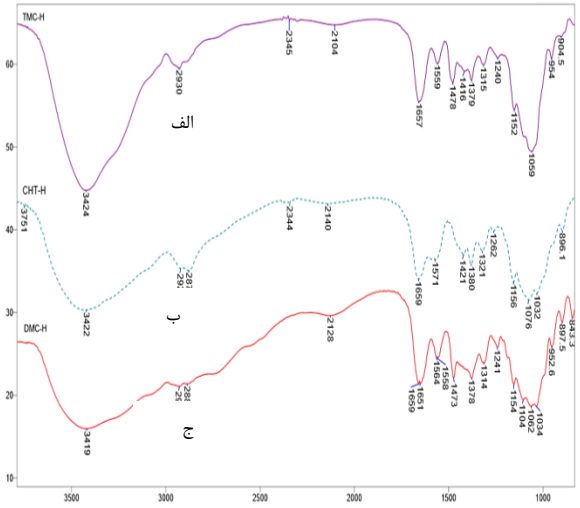
شکل ۴. طیف ^{1}H NMR دی‌متیل کیتوزان در دمای ۶۰ °C



شکل ۵. طیف ^{1}H NMR تری‌متیل کیتوزان در دمای ۶۰ °C

۳-۲. نتایج طیف FTIR

طیف FTIR کیتوزان، تری‌متیل کیتوزان و دی‌متیل کیتوزان در شکل (۶) نشان داده شده است. دی‌متیل کیتوزان و تری‌متیل کیتوزان با کیتوزان مقایسه شدند.

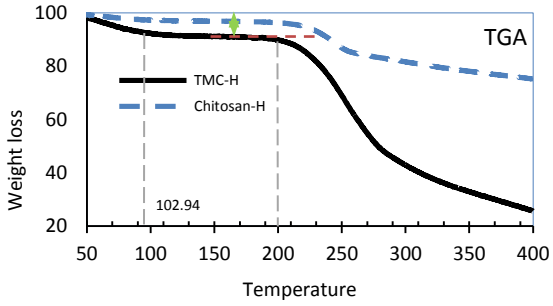


شکل ۶. نتایج FT-IR، الف) TMC ب) کیتوزان ج) DMC

برای کیتوزان جذب در ناحیه cm^{-1} ۱۵۷۰ به‌عنوان ارتعاش خمشی گروه آمین $R\text{-}NH_2$ شناسایی گردید ولی در TMC سنتز شده این پیک ناپدید شده است. همچنین پیک جدید ارتعاش خمشی نامتقارن در نواحی cm^{-1} ۱۴۷۳ و cm^{-1} ۱۴۷۸ به‌عنوان پیوند $N\text{-}CH_3$ به ترتیب برای دی‌متیل کیتوزان و تری‌متیل کیتوزان شناسایی شد. این پیک تولید TMC را تایید می‌کند [۱۹].

۳-۳. آنالیز حرارتی (TGA)

روش آنالیز توزین حرارتی یا TGA یک روش آنالیز حرارتی است که اساس آن بر اندازه‌گیری وزن نمونه در دما یا زمان‌های مختلف هنگام گرمایش استوار است. برای بررسی اثرات دمای بالا در فرآیند سنتز بر کیتوزان، همچنین پایداری دمایی محصول سنتز شده برای فرمولاسیون‌های دارویی و سترون‌سازی در دمای بالا، تغییر وزن نمونه در رنج دمایی ۲۵ تا ۴۰۰ درجه بررسی شد. نمودار آنالیز حرارتی در شکل (۷) نمایش داده شده است. خط ساده‌تری متیل کیتوزان و نقطه‌چین کیتوزان را نشان می‌دهد. میزان آب موجود در TMC با کیتوزان مقایسه شده است. ابتدا با افزایش دما تا ۱۰۳ درجه سلسیوس نمونه با شیب زیاد شروع به کاهش وزن می‌کند که ناشی از تبخیر آب باقی‌مانده بعد از خشک‌کردن است و در دمای ۱۰۲/۹ کل آب را از دست می‌دهد. میزان آب در کیتوزان کمتر از ۱ درصد و در تری متیل کیتوزان ۸/۲ درصد اندازه‌گیری شد. مقدار آب بیشتر در تری متیل کیتوزان نشان‌دهنده قطبیت بیشتر مولکول و آب‌دوست بودن آن است. در ادامه شرایط پایدار می‌شود و تا دمای ۱۹۸ درجه کاهش وزن ندارد و از این محدوده به بعد کاهش وزن با شیب زیاد مشاهده می‌شود. نتایج نشان می‌دهد حد مقاومت گرمایی TMC دمای ۱۹۸/۶ درجه سلسیوس است و درحالی‌که کیتوزان از دمای بالاتر از ۲۵۰ درجه سلسیوس شروع به کاهش وزن با شیب ملایم می‌کند. مقاومت دمایی محصول تا دمای ۲۰۰ درجه سلسیوس نشان‌دهنده کاربردی بودن محصول و قابل‌استفاده بودن محصول در فرمولاسیون‌های خشک‌کردن با دمای بالا است.

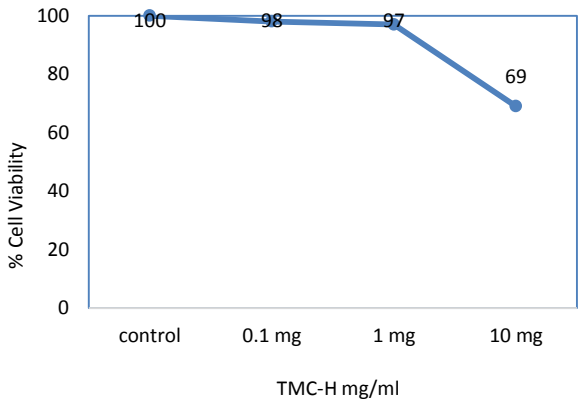


شکل ۷. نتیجه TGA ، Chitosan-H کیتوزان، TMC-H تری‌متیل کیتوزان

۴-۳. سمیت TMC در کشت سلول انسانی

برای بررسی سمیت بر روی سلول‌های انسانی از سلول Caco-2 و روش MTT استفاده شد. Caco-2 سلول انسان سرطانی به‌دست‌آمده از روده بزرگ است که مشخصات سلول‌های اپی‌تلیال روده‌ای را به‌طور کامل دارا بوده و به‌عنوان مدل در مطالعات سمیت بر روی سلول‌های اپی‌تلیال مورد استفاده قرار می‌گیرد. این سلول تمام مشخصات سلول اپی‌تلیال روده شامل میکرو ویلی، اتصالات سلول و جذب مواد را از خود بروز می‌دهد. ماده MTT نیز نمک تترازولیوم محلول در آب است. وقتی این ترکیب در محیط محلول نمکی فاقد فنل رد آماده‌سازی شود محلول زردرنگی می‌دهد. این ترکیب در میتوکندری سلول‌های زنده توسط آنزیم دهیدرژناز تبدیل به ترکیب نامحلولی به نام فورمازان می‌شود که این محصول توسط حلال‌هایی مانند ایزوپروپانول اسیدی یا DMSO حل‌شده و رنگ ارغوانی - بنفش را ظاهر می‌سازد. سمیت در مدل سلولی در سه غلظت ۰/۱ ، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بررسی شد. نتایج به‌دست‌آمده با آزمون آماری ANOVA بررسی شد.

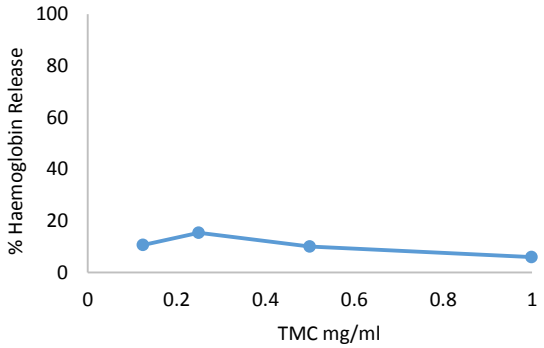
شکل (۸) درصد زنده ماندن سلول Caco-2 در غلظت‌های مختلف پلیمر H-TMC را در MTT نشان می‌دهد. این نتایج در نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۶/۰۷ به روش ANOVA یک‌طرفه و آزمون مقایسه‌ای چندگانه توکی تجزیه‌وتحلیل شد. نتایج بررسی نشان می‌دهد که افزایش ۱۰ برابری غلظت پلیمر تا ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیچ گونه اثر سمی بر حیات سلول‌ها حتی در سطح معنادار ۰/۰۰۰۱ در آزمون MTT ندارد. همچنین اختلافی معنادار بین گروه‌ها و بین گروه‌ها و کنترل وجود ندارد. اما با افزایش ۱۰ برابری غلظت پلیمر به ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در سطح آماری ۰/۰۵ اثر معنادار سمیت بر حیات سلول‌ها مشاهده شد. نرم‌افزار اختلاف مشاهده‌شده را ۴ ستاره ارزیابی می‌کند.



شکل ۸. آزمایش MTT: نمودار درصد زنده ماندن سلول‌های Caco2 در غلظت‌های مختلف TMC

۳-۵. اثر TMC در همولیز گلبول‌های انسانی

آزمایش همولیز گلبول‌های قرمز انسانی با استفاده از میزان رهایش هموگلوبین اندازه‌گیری شد. در شکل (۸) نتایج نسبت رهایش به کل هموگلوبین موجود در گلبول‌ها به‌صورت درصد نشان داده شده است. نتایج به‌دست‌آمده در نرم‌افزار GraphPad Prism بررسی شد و داده‌ها ارزیابی گردید. در روش ANOVA و آزمون توکی تا سطح معنا داری ۰/۰۰۰۱ اختلافی معنادار بین گروه‌ها مشاهده نشد. بنابراین، با افزایش مقدار پلیمر تفاوت معنادار در رهایش مشاهده نشد و پلیمر هیچ اثری بر آزادسازی هموگلوبین از سلول‌های خونی انسان ندارد. آزادسازی هموگلوبین به تعداد سلول‌هایی بستگی دارد که غشای آنها بر اثر یک عامل خارجی آسیب دیده‌اند و بنابراین، از آن به‌عنوان یک روش ارزیابی مناسب برای بررسی هر گونه آسیب ناشی از محرک‌های خارجی بر سلول‌های خونی استفاده می‌گردد. از طرفی تری‌متیل کیتوزان در pH فیزیولوژیک به‌صورت کاتیون بوده و تمایل به چسبیدن به غشاهای سلولی دارد و انتظار می‌رود در صورت سمی بودن اثر خود را به‌صورت افزایش نفوذپذیری این غشا نشان دهد. نتایج نشان داد افزایش غلظت این پلیمر هیچ اثری بر غشای سلولی گلبول قرمز ندارد.



شکل ۹. آزمایش رهایش هموگلوبین از گلبول‌های قرمز به‌صورت درصد کل هموگلوبین در گلبول‌های قرمز

۴. نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر روش‌های پیشگیری و درمانی قابل استفاده در شرایط عملیاتی و بدون نیاز به تخصص‌های ویژه در دسترس عموم قرار گرفته است. این روند برای انتقال داروها و واکسن‌ها به دلیل الزامات خاص و همچنین هزینه‌های بالا و مشکلات مربوط به سمیت مواد انتقال‌دهنده به کندی در حال پیشرفت است. تری‌متیل کیتوزان در کاربردهای انتقال واکسن و دارو از سدهای اپی تلیال دستگاه گوارش و سایر مخاط تنفسی، به‌عنوان یک ماده زیست سازگار برای انتقال مواد زیستی و داروهای با وزن مولکولی بالا از سدهای اپی تلیال می‌تواند به‌کار گرفته شود.

در این تحقیق تری‌متیل کیتوزان با وزن مولکولی بالا طی دو مرحله ساخته شد. به‌جای استفاده از سدیم بوروهیدرید به‌عنوان عامل کاهنده، از فرمیک اسید استفاده شد که اجازه می‌دهد کیتوزان بدون استفاده از بافر استاتی در محلول آبی حل شود.

در ادامه دی‌متیل کیتوزان بر طبق واکنش منشاتکین[1] برای سنتز تری‌متیل کیتوزان به‌کار گرفته شد. در این روش از متیل یدید که یک آلکیل یدید انتخابی و برتر برای این واکنش است استفاده شد [۲۰]. به‌وسیله تغییر زمان واکنش مادامی‌که دمای واکنش و نسبت DMC/CH3I ثابت هستند، می‌توان درجه کواترنیزاسیون را به‌دقت تنظیم نمود. ابتدا دی‌متیل کیتوزان سنتز گردید. درجه دی‌متیلاسیون محاسبه شده برای این محصول ۹۵/۶ درصد به‌دست آمد که نشان می‌دهد واکنش به‌طور موفق با درجه بالا انجام شده است. این محصول در مرحله دوم برای سنتز تری‌متیل کیتوزان استفاده شد. درجه کواترنیزاسیون محصول TMC به‌دست‌آمده ۸۲/۲ تعیین گردید. این پلیمر در pH خنثی بار مثبت دارد (کاتیون) و می‌توان از این پلیمر در کلیه مطالعات مربوط به انتقال پپتیدها، پروتئین‌ها و واکسن‌ها (مولکول‌های دارای بار منفی) استفاده کرد. با توجه به عدم وجود سمیت قابل توجه پلیمر تری متیل کیتوزان (به ویژه با درجه بالایی از آمونیوم تری‌متیله) در آینده برای بهبود چسبندگی مخاطی داروهای پپتیدی و واکسن‌ها می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد [۴، ۱۱و ۲۱] یکی از کاربردهای آن می‌تواند ساخت نانوذرات برای انتقال پروتئین‌های کاندید واکسن محلول در آب به‌صورت فرمولاسیون در ابعاد میکرو و نانو باشد [۲۲].

۵. مرجع‌ها

[1] Chaturvedi, M.; Kumar, M.; Pathak, K. “A Review on Mucoadhesive Polymer Used in Nasal Drug Delivery System”; J. Adv. Pharm. Technol. Res. 2011, 2, 215.

[2] Junginger, H. E.; Verhoef, J. C. “Macromolecules as Safe Penetration Enhancers for Hydrophilic Drugs—a Fiction?”; Pharm. Sci. Technol. 1998, 1, 370-376.

[3] Sahni, J. K.; Chopra, S.; Ahmad. F. J.; Khar, R. K. “Potential Prospects of Chitosan Derivative Trimethyl Chitosan Chloride (TMC) as a Polymeric Absorption Enhancer: Synthesis, Characterization and Applications”; J. Pharm. Pharmacol. 2008, 60, 1111-1119.

[4] Thanou, M.; Verhoef, J. C.; Marbach, P.; Junginger, H. E. “Intestinal Absorption of Octeriotide: N-trimethyl Chitosan Chloride (TMC) Ameliorates the Permeability and Absorption Properties of the Somatostatin Analogue *in-vitro* and *in-vivo*”; J. Pharm. Sci. 2000, 89, 951–7.

[1] Menshutkin Reaction

[5] Illum, L.; Jabbal-Gill, I.; Hinchcliffe, M.; Fisher, A. N.; Davis, S. S. “Chitosan as a Novel Nasal Delivery System for Vaccines”; Adv. Drug. Deliv. Rev. 2001, 51, 81-96.

[6] Strand, S. P.; Tømmeraas, K.; Vårum, K. M.; Østgaard, K. “Electrophoretic Light Scattering Studies of Chitosans with Different Degrees of N-acetylation”; Biomacromolecules 2001, 2, 1310-1314.

[7] Rinaudo, M.; Domard, A. “Solution Properties of Chitosan”; University Joseph Fourier - Grenoble, 1989.

[8] Werle, M.; Takeuchi, H.; Bernkop-Schnürch, A. “Modified Chitosans for Oral Drug Delivery”; J. Pharm. Soc. 2009, 98, 1643-1656.

[9] De Britto, D.; Celi Goy, R.; Campana Filho, S. P.; Assis, O. B. G. “Quaternary Salts of Chitosan: History, Antimicrobial Features, and Prospects”; Int. J. Carbohyd. Chem. 2011, 12 pages.

[10] Martins, A. F.; Facchi, S. P.; Monteiro, J. P.; Nocchi, S. R.; Silva, C. T.; Nakamura, C. V.; Girotto, E. M.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. “Preparation and Cytotoxicity of N, N, N-Trimethyl Chitosan/Alginate Beads Containing Gold Nanoparticles”; Int. J. Biol. Macromol. 2015, 72, 466-471.

[11] Thanou, M.; Kotzé, A. F.; Scharringhausen, T.; Luessen, H. L.; de Boer, A. G.; Verhoef, J. C.; Junginger, H. E. “Effect of Degree of Quaternization of N-trimethyl Chitosan Chloride for Enhanced Transport of Hydrophilic Compounds Across Intestinal Caco-2 Cell Monolayers”; J. Controlled Release 2000, 64, 15-25.

[12] Mourya, V.; Inamdar, N. N. “Trimethyl Chitosan and its Applications in Drug Delivery”; J. Mater. Sci. - Mater. Med. 2009, 20, 1057.

[13] Verheul, R., “Tailorable Trimethyl Chitosans as Adjuvant for Intranasal Immunization”; Utrecht University, 2010.

[14] Verheul, R. J.; Amidi, M.; Van Der Wal, S.; Van Riet, E.; Jiskoot, W.; Hennink, W. E. “Synthesis, Characterization and in Vitro Biological Properties of O-methyl Free N, N, N-Trimethylated Chitosan”; Biomaterials 2008, 29, 3642-3649.

[15] Sieval, A.; Thanou, M.; Kotze, A.; Verhoef, J.; Brussee, J.; Junginger, H. “Preparation and NMR Characterization of Highly Substituted N-Trimethyl Chitosan Chloride”; Carbohyd. Polym. 1998, 36, 157-165.

[16] Rúnarsson, Ö.V.; Holappa, J.; Nevalainen, T.; Hjálmarsdóttir, M.; Järvinen, T.; Loftsson, T.; Einarsson, J.M.; Jónsdóttir, S.; Valdimarsdóttir, M.; Másson, M. “Antibacterial Activity of Methylated Chitosan and Chitooligomer Derivatives: Synthesis and Structure Activity Relationships”; Eur. Polym. J. 2007, 43, 2660-2671.

[17] Boonyo, W.; Junginger, H. E.; Waranuch, N.; Polnok, A.; Pitaksuteepong, T. “Chitosan and Trimethyl Chitosan Chloride (TMC) as Adjuvants for Inducing Immune Responses to Ovalbumin in Mice Following Nasal Administration”; J. Controled Release 2007, 121, 168-175.

[18] Yoshihara, E.; Nakae, T. “Cytolytic Activity of Liposomes Containing Stearylamine”; BBA-Biomembranes 1986, 854, 93-101.

[19] Rúnarsson, Ö.V., Holappa, J.; Jónsdóttir, S.; Steinsson, H.; Másson, M. “N-Selective ‘One Pot’synthesis of Highly N-Substituted Trimethyl Chitosan (TMC)”; Carbohydr. Polym. 2008, 74, 740-744.

[20] Muzzarelli, R. A. A.; Tanfani, F. “The N-permethylation of Chitosan and the Preparation of N-trimethyl Chitosan Iodide”; Carbohyd. Polym. 1985, 5, 297-307.

[21] Thanou, M. M.; Verhoef, J. C.; Romeijn, S. G.; Nagelkerke, J. F. “Effects of N-Trimethyl Chitosan Chloride, a Novel Absorption Enhancer, on Caco-2 Intestinal Epithelia and the Ciliary Beat Frequency of Chicken Embryo Trachea”; Int. J. Pharm. 1999, 185, 73-82.

[22] Khademi, F.; Derakhshan, M.; Yousefi-Avarvand, A.; Tafaghodi, M. “Potential of Polymeric Particles as Future Vaccine Delivery Systems/Adjuvants for Parenteral and Non-Parenteral Immunization against Tuberculosis: A Systematic Review”; Iran J. Basic Med. Sci. 2018, 21, 116.