

## The design and preparation of fluorescent labeled chitosan nanoparticles for intestinal delivery

Golshan Karimi Zindashti<sup>1</sup>, Sepideh Khaleghi<sup>2</sup>, Fahimeh Nemati Mansur<sup>2</sup>, Fatemeh Rahbarizadeh<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc Student, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

### Abstract

**Background:** Chitosan is a biodegradable, biocompatible polymer regarded as safe for human dietary. Nanoparticles (NP) prepared with chitosan derivatives typically possess a positive surface charge and mucoadhesive properties such that can adhere to mucus membranes and release the drug payload in a sustained release manner. Current study is focused on preparation several kinds of chitosan formulations and different concentrations of cross linking agents in various conditions and characterization for achievement of most stable and biocompatible nanoparticle which labeled by FITC for in vitro tracking .

**Analysis method:** In order to better investigate, in addition to chitosan, carboxymethyl chitosan was used. Preparation of chitosan nanoparticles is done by Ionotropic gelation method using different concentration of sodium tripolyphosphate (TPP) as cross-linking agent. Moreover, the synthesis of FITC-labeled chitosan at a combination of time, pH, different concentrations of salt and enzyme was investigated to produce stable nanoparticles for intestinal drug delivery. Physical characterization of nanoparticles were estimated by DLS and TEM as well as conjugation and covalent links were confirmed by FITR.

**Results:** The size of the nanoparticles by transmission electron microscopy (TEM) was about 100±50. Hydrodynamic diameter was measured by DLS around 150± $\rho$ 0 nm. In FTIR, covalent conjugation to the chitosan nanoparticles with control samples was confirmed. UV spectroscopy was used to determine the efficiency of conjugation which was over 70%.

**Conclusion:** All of these findings favor the notion that the FITC conjugated chitosan nanoparticles produced in our work may offer promise for the development of an efficient therapeutic and diagnosis carrier for colon cancer in the future. However, further investigation is required to provide more evidence on different aspects of the targeting activity and stability of this nanoparticle in in vivo.

**Keywords:** Chitosan nanoparticle, FITC, Intestine, Colon cancer, Stability.

**Cited as:** Karimi Zindashti G, Khaleghi S, Nemati Mansur F, Rahbarizadeh F. The design and preparation of fluorescent labeled chitosan nanoparticles for intestinal delivery. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2020; 30(4): 352-362.

**Correspondence to:** Sepideh Khaleghi

**Tel:** +98 9102005098

**E-mail:** s.khaleghi@iautmu.ac.ir

**ORCID ID:** 0000-0002-1817-3116

**Received:** 29 Sep 2019; **Accepted:** 10 Dec 2020

## طراحی و سنتز نانوذرات کیتوزان نشاندار جهت انتقال هدفمند دارو به روده

گلشن کریمی زیندشتی<sup>۱</sup>، سپیده خالقی<sup>۲</sup>، فهیمه نعمتی منصور<sup>۲</sup>، فاطمه رهبری زاده<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران  
<sup>۲</sup> استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران  
<sup>۳</sup> دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

## چکیده

**سابقه و هدف:** کیتوزان نوعی پلیمر تجزیه پذیر و زیست سازگار است که برای رژیم غذایی انسان بی خطر محسوب می شود. نانوذرات (NP) تهیه شده با مشتقات کیتوزان معمولاً دارای بار سطحی مثبت و خاصیت چسبندگی مخاطی هستند، به گونه‌ای که می‌توانند به غشاهای مخاط پچسبند و محموله دارو را به روش آزاد سازی پایدار آزاد کنند. هدف از این مطالعه آماده‌سازی فرمولاسیون‌های مختلف از کیتوزان و غلظت‌های متفاوت از عوامل اتصال دهنده برای دستیابی به پایدارترین و زیست سازگارترین نانوذره بود که توسط FITC در شرایط *in vitro* نشان‌دار شده بود.

**روش بررسی:** به منظور بررسی بهتر علاوه بر کیتوزان از کربوکسی‌متیل کیتوزان استفاده شد. برای تهیه نانوذرات از روش ژل شدن یونی استفاده شد همچنین غلظت‌های مختلف تری پلی فسفات به عنوان عامل اتصال دهنده مورد استفاده قرار گرفت. به علاوه سنتز کیتوزان نشاندار شده با FITC در ترکیبی از زمان، pH غلظت‌های مختلف نمک و آنزیم به منظور تولید نانوذرات پایدار برای دارورسانی به روده مورد بررسی قرار گرفت. خصوصیات فیزیکی نانوذرات با استفاده از TEM، DLS و اتصالات کوالان توسط FTIR بررسی شد.

**یافته‌ها:** اندازه نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) حدود  $100 \pm 50$  بود. قطر هیدرودینامیکی توسط DLS حدود  $150 \pm 50$  نانومتر اندازه‌گیری شد. در FTIR/اتصال کوالان FITC به نانوذرات کیتوزان تایید شد، و از طیف سنجی UV به منظور تایید کونژوگاسیون استفاده شد که نتیجه اتصال بیش از ۷۰٪ بود.

**نتیجه‌گیری:** تمام یافته‌ها حاکی از آن است که نانوذرات کیتوزان نشاندار با FITC در آینده می‌تواند به عنوان یک عامل مفید برای تشخیص و درمان سرطان روده مورد استفاده قرار گیرد. با این حال تحقیقات بیشتری برای ارائه شواهد بیشتر در مورد پایداری این نانوذرات در شرایط *in vivo* لازم است.

**واژگان کلیدی:** نانوذرات کیتوزان، FITC، روده، سرطان روده، پایداری.

## مقدمه

کیتین از فراوانترین بیوپلیمرها بعد از سلولز است. کیتین نوعی پلی ساکارید طبیعی است و به طور برجسته در پوسته

سخت پوستانی مثل خرچنگ و میگو، کوتیکول حشرات و دیواره سلولی قارچ‌ها یافت می‌شود. تاریخچه کیتین و کیتوزان به قرن ۱۹ برمی‌گردد. برای اولین بار در سال ۱۸۱۱ یک دانشمند فرانسوی به نام براکونوت کیتین را از قارچ استخراج کرد. سپس روگت در سال ۱۸۵۹ کیتوزان را از فرآیند استیل زدایی بازی کیتین در حضور هیدروکسید پتاسیم به دست آورد و در نهایت در سال ۱۹۵۰ ساختار آن به طور کامل

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، سپیده خالقی (email: s.khaleghi@iautmu.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0002-1817-3116

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸۷۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۸۹/۱۹

شده است تا از میزان این گروه‌های آمین کم کنند و همچنین با استفاده از یک سری نمک‌ها اتصالات عرضی در داخل نانوذره کیتوزان ایجاد کنند تا در نهایت باعث مقاومت این نانوذره در محیط اسیدی و باز شدن آن در محیط بازی شوند (۹، ۱۰).

از این رو در این پژوهش سعی شد که از کیتوزان به عنوان یک پلیمر طبیعی برای سنتز نانوذرات کیتوزان مقاوم به محیط اسیدی استفاده شود تا با نشاندار کردن این نانوذرات با پروتئین FITC امکان ردیابی، انتقال و ماندگاری آن در تست‌های *in vitro* فراهم شود. در نهایت از این نانوذره به منظور انتقال موثر و هدفمند دارو به روده در پروژه‌های آینده استفاده خواهد شد.

## مواد و روشها

### مواد

کیتوزان با وزن مولکولی پایین و فلئوروسین ایزوتیوسیانات FITC از شرکت سیگما و سدیم تری پلی فسفات و منوکلرواستیک اسید از شرکت مرک خریداری شد. از فیلتر ۰٫۴۵ و ۰٫۲۲ برای حذف رسوبات و مواد حل نشده استفاده شد. از دستگاه پراکندگی نور دینامیکی (DLS) برای اندازه گیری متوسط اندازه نانوذرات، شاخص پراکندگی (poly dispersity index; PDI) و از میکروسکوپی الکترونی عبوری برای بررسی مورفولوژی نانوذرات به دست آمده کیتوزان استفاده شد. برای بررسی ساختار شیمیایی نانوذرات از روش طیف سنجی تبدیلی مادون قرمز (FTIR) استفاده شد و پیوندهای مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین درصد جذب نانو ذرات از فلورومتری استفاده شد.

### تولید کربوکسی متیل کیتوزان

برای تولید کربوکسی متیل کیتوزان، ۲ گرم کیتوزان به ۲۵ میلی لیتر محلول سدیم هیدروکسید ۵۰٪ اضافه شد و بعد از هم زدن به مدت ۲۴ ساعت به رسوب باقی مانده ۴ گرم منوکلرواستیک اسید حل شده در ۲۵ میلی لیتر ایزوپروپانول اضافه شد. با افزودن قطره قطره اتانول مطلق کیتوزان رسوب داده شد. عملیات تشکیل رسوب با اتانول دو بار تکرار شد تا تمام ناخالصی‌های احتمالی برطرف شود.

### تهیه نانوذرات کیتوزان و کربوکسی متیل کیتوزان

فرایند تهیه نانوذرات کیتوزان و کربوکسی متیل کیتوزان هر کدام به صورت مجزا بر اساس روش ژل شدن یونی در دمای آزمایشگاه صورت گرفت. بدین منظور پلی ساکارید کیتوزان با وزن مولکولی پایین در محلول استیک اسید حل شد. این عمل باعث می‌شود تا

کشف شد (۱). کیتین و کیتوزان به عنوان یک آمینو پلی ساکارید طبیعی که دارای ساختمان بی نظیر و خصوصیتی چند منظوره هستند، به طور وسیعی در پزشکی و صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرند. از جمله خصوصیات بارز آنها می‌توان به سازگاری زیستی بالا، زیست تخریب پذیری قابل قبول در کنار سمیت پایین، همچنین خواص آنتی باکتریال و ضد حساسیت آنها اشاره کرد (۲، ۳). علاوه بر این موارد، خصوصیات بیولوژیکی چون چسبندگی زیستی، ضد سرطان، ضد میکروب، کاهش دهنده التهاب و درد، آنتی اکسیدان، منعقد کننده خون و کاهش کلسترول، آنها را از دیگر پلیمرهای زیستی متمایز کرده است. کیتین، کیتوزان و مشتقات آنها آینده روشنی به عنوان یک عامل کمکی در انتقال و رهاسازی داروها دارند (۴). یکی از ویژگی‌های منحصر بفرد کیتوزان فعالیت ضد اسیدی آن است که مانع از کاهش اثر داروها در معده می‌شود (۵). انتقال دارو به روده از طریق دهان یکی از چالش‌های دارورسانی محسوب می‌شود. چندین موانع فیزیولوژیکی از جمله محیط بسیار اسیدی، آنزیم‌های مخرب و زمان اقامت کم در دستگاه گوارش می‌تواند به این نارسایی منجر شود. به همین دلیل افراد اغلب از انتشار ناقص دارو رنج می‌برند و باید با دوزهای بالاتر جبران شود. به همین دلیل امروزه حامل‌هایی که می‌توانند از تخریب دارو محافظت کنند و توانایی هدفگیری در بخش‌های مورد نظر را بهبود بخشند بسیار مورد توجه است. سیستم‌هایی که بر پایه پلیمر کیتوزان بنا شده‌اند در انتقال و رهاسازی پروتئین‌ها/پپتیدها، فاکتورهای رشد، داروهای ضد درد و التهاب، داروهای ضد سرطان، آنتی بیوتیک‌ها و همچنین در درمان نارسایی‌های ژنی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶). نانوذرات کیتوزان اولین بار در سال ۱۹۹۴ توسط اوهایا (Ohya) به منظور رهایش داروی ضد سرطانی فلورواوراسیل تهیه شد (۷).

به منظور طراحی نانوذره کیتوزان جهت دارورسانی هدفمند در روده باید در ساختار کیتوزان تغییراتی ایجاد شود تا بتوانند بدون تخریب و آزاد سازی دارو از محیط اسیدی معده بگذرند و تحت تخریب‌های آنزیمی لوله گوارشی قرار نگیرند و در نهایت به روده برسند و در محیط بازی روده تخریب شده و دارو را آزاد سازند (۸). همان طور که اشاره شد، سطح نانوذرات کیتوزان حاوی تعداد زیادی از گروه‌های آمین با بار مثبت است که امکان حل شدن در محیط اسیدی را فراهم می‌کند و به همین جهت بسیاری از تحقیقات بر پایه استفاده از این ذره در دارو رسانی معده استوار شده است، در حالی که بسیاری از تحقیقات درباره تغییر خصوصیات این نانوذره انجام

گروه‌های (NH<sub>2</sub>) در کیتوزان با ورود به محلول اسید استیک پروتونه شده و تبدیل به (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) می‌شود. در مرحله بعد محلول تری‌پلی فسفات با نسبت ۱:۳ به صورت قطره قطره به محلول کیتوزان در حال سونیکیت اضافه شد. محلول کلونیدی حاصل به مدت نیم ساعت با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتیفریوژ شد. مایع رویی توسط نمونه‌گیر به آرامی برداشته شد و از فیلتر ۰/۴ عبور داده شد تا تمام ذرات باقی مانده در آن نیز جدا شوند. سنتز نانوذرات کربوکسی متیل کیتوزان نیز طبق همین روش انجام شد.

#### کونژوگاسیون نانوذرات کیتوزان و کربوکسی متیل کیتوزان با فلونورسین ایزوتیوسیانات (FITC)

اتصال کیتوزان به FITC بر اساس واکنش بین گروه ایزوتیوسیانات FITC و گروه آمین اولیه کیتوزان ایجاد می‌شود. بدین منظور FITC حین هم‌زدن در استیر در تاریکی به متانول اضافه شد. در مرحله بعد به طور مجزا کیتوزان خالص و کربوکسی متیل کیتوزان در اسید حل شد و به صورت قطره قطره به محلول FITC در حال هم خوردن در تاریکی اضافه شد. پس از ۱ ساعت محلول ۰/۵ مولار سدیم هیدروکسید قطره قطره به محلول اضافه شد تا جایی که رسوب تشکیل شد. محلول به مدت نیم ساعت با دور ۴۰۰۰ rpm سانتیفریوژ شد. به رسوب باقی مانده در ته ظرف مقدار ۸ میلی لیتر اسید ۰/۵ مولار اضافه شد. برای جدا شدن تمام ذرات با مقیاس بزرگتر محلول باید سونیکیت شود. هنگام سونیکیت محلول ۰/۱٪ تری‌پلی فسفات قطره قطره به محلول کیتوزان-FITC اضافه شد. محلول به مدت یک روز درون کیسه دیالیز درون بافر PBS به منظور تعویض بافر TPP با بافر PBS قرار داده شد.

#### بررسی خصوصیات فیزیکی نانو ذرات حاوی پروتئین FITC

برای بررسی خواص فیزیکی نانوذرات کیتوزان و کربوکسی متیل کیتوزان نشاندار شده با FITC از جمله اندازه، پتانسیل سطح ذره، توزیع پراکندگی و مورفولوژی نانو ذرات به طور مجزا از روش‌های زیر استفاده شد:

پراکندگی نور دینامیکی (DLS): برای تعیین اندازه، میزان توزیع پراکندگی و اندازه گیری زتا پتانسیل نانو ذرات از روش پراکندگی نوری دینامیک (DLS) استفاده شد. بدین ترتیب که محلول نانو ذرات کیتوزان و کربوکسی متیل کیتوزان حاوی FITC بعد از سونیکیت شدن و عبور دادن از فیلتر ۰/۲، ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه، داخل سل دستگاه قرار گرفت و پتانسیل سطح و اندازه ذره توسط دستگاه تعیین شد و شدت پراکندگی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، با ضریب شکست 1.335 اندازه گیری شد.

آنالیز FTIR: برای بررسی ساختار شیمیایی نانوذرات همچنین تایید تولید کربوکسی متیل کیتوزان و اتصال نانوذرات با FITC از تست FTIR استفاده شد. برای آماده‌سازی نمونه‌های طیف سنجی، مقدار کمی از نانوذرات کیتوزان و کربوکسی متیل کیتوزان هر کدام مجزا به صورت مخلوط با پودر برمید پتاسیم سائیده و همگن شدند. پودر حاصله به صورت قرص نازکی درآمده و نمونه‌های آماده شده تحت آزمایش طیف‌سنجی قرار گرفتند.

میکروسکوپ الکترونی عبوری TEM: برای شکل‌شناسی نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد. نمونه‌های آماده شده برای TEM باید بسیار نازک باشند تا الکترون بتواند از آن‌ها عبور کند و از ساختار داخل آن‌ها تصویر ایجاد شود؛ در نتیجه آماده‌سازی نمونه نیازمند دقت بالایی است. نمونه‌های کیتوزان و کربوکسی متیل کیتوزان نشاندار شده با FITC توسط فسفوتنگستیک اسید ۲٪ رنگ آمیزی منفی شدند و روی گرید مسی قرار گرفتند، گرید روی کاغذ فیلتر و زیر لامپ مادون قرمز، خشک شد. این کار را تا جایی که مجموعه رضایت بخشی به دست آید، می‌توان تکرار کرد.

#### پایداری نانوذرات در شرایط متفاوت

**پایداری نانوذرات در pH های مختلف:** در این فرایند برای بررسی پایداری اندازه و شکل نانوذرات در pH های مختلف، ۵ نمونه از بافر PBS با pH های مختلف به منظور شبیه سازی با pH دستگاه گوارش تهیه شد. ذرات به عنوان مسیر معده تحت تماس با pH اسیدی ۳ و ۴ قرار گرفتند. سپس به منظور شبیه سازی مسیر ابتدایی روده در pH ۵ و ۷ منتقل شده و در انتها برای شبیه سازی روده بزرگ ذرات در محلول بافر با pH ۷ و ۹ قرار گرفتند، سپس به دلیل اینکه عبور و هضم مواد غذایی در سیستم گوارش ۳ تا ۶ ساعت طول می‌کشد حدود ۵ ساعت صبر کرده و بعد برای بررسی تغییر اندازه نانوذرات تست DLS گرفته می‌شود.

**پایداری نانوذرات در غلظت های مختلف نمک:** برای بررسی پایداری نانوذرات کیتوزان و کربوکسی متیل کیتوزان نشاندار شده در غلظت‌های مختلف نمک، از نمک سدیم کلرید استفاده شد. بدین منظور به طور مجزا ۳ نمونه از غلظت های ۱۰۰-۱۵۰-۲۵۰ میلی‌مولار نمک تهیه گردید. بعد از ۵ ساعت تغییرات اندازه نانوذرات توسط دستگاه DLS آنالیز شد.

#### پایداری نانوذرات کیتوزان در غلظت های مختلف از آنزیم

**گوارشی:** برای انجام این آزمایش از آنزیم تریپسین استفاده شد. تریپسین، آنزیمی است پروتئینی که از سلول‌های لوزالمعده به صورت پروآنزیم و غیرفعال ترشح می‌شود و به هضم پروتئین‌ها کمک می‌کند. هنگام ترشح به داخل روده درون روده باریک،

نسبت ۱:۱ نشان داده شده است. باند  $3439/19 \text{ cm}^{-1}$  ارتعاش گروه‌های OH را نشان می‌دهد که به دلیل ساختارهای باز بیشتر در نتیجه کراس لینک کیتوزان با سدیم تری پلی فسفات است. نواحی  $1250-1014/59 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به TPP است و دو پیک در  $1573/97 \text{ cm}^{-1}$  -  $1415/8 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه خمشی  $\text{NH}_4^+$  است که نشان دهنده میان‌کنش بین گروه‌های فسفات و گروه‌های آمین کیتوزان است. انتقال باند  $2877/89 \text{ cm}^{-1}$  از گروه H-C مربوط به کیتوزان به باند  $2918 \text{ cm}^{-1}$  نانوذره کیتوزان، نشان‌دهنده تبدیل کیتوزان به نانو ذره است.

### طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه کربوکسی متیل کیتوزان (FTIR)

برای مشخص کردن میزان و محل جانشینی گروه‌های کربوکسیل روی کیتوزان از تکنیک FTIR استفاده شد. طیف FTIR کربوکسی متیل کیتوزان و تری‌پلی‌فسفات با نسبت ۱:۱ در شکل ۳ آورده شده است. در مقایسه با طیف‌های کیتوزان، در طیف‌های کربوکسی متیل کیتوزان پیک‌های  $1639/5 \text{ cm}^{-1}$  و  $1422 \text{ cm}^{-1}$  ظاهر شده است که نشان می‌دهد کربوکسی متیله شدن بر روی هر دو گروه آمین و هیدروکسیل کیتوزان اتفاق افتاده است؛ پس کربوکسی متیل کیتوزان موجود از نوع N,O-CMCS است. پیک  $1051 \text{ cm}^{-1}$  ارتعاش کششی C-O را نشان می‌دهد. پیک پهن‌تر و کششی O-H و N-H در ناحیه  $3433 \text{ cm}^{-1}$  آب‌دوستی بیشتر کربوکسی متیل کیتوزان در مقایسه با کیتوزان را نشان می‌دهد.

فعال می‌شود. به دلیل تغییرات pH در لوله گوارش غلظت‌های مختلفی از آنزیم تریپسین برای انجام تست پایداری تهیه شد. آنزیم تریپسین در معده با کمترین غلظت و در ابتدای روده (دوازدهه) بیشترین غلظت را دارد. برای انجام تست پایداری ۶ نمونه از غلظت‌های 400-100-10-5-1-0.25 mg/ml از آنزیم تهیه شد، و بعد از انتقال نانوذرات کیتوزان و کربوکسی متیل کیتوزان نشاندار به طور مجزا به هر نمونه، بعد از ۵ ساعت تغییرات سایز نانوذرات توسط آنالیز DLS بررسی شد.

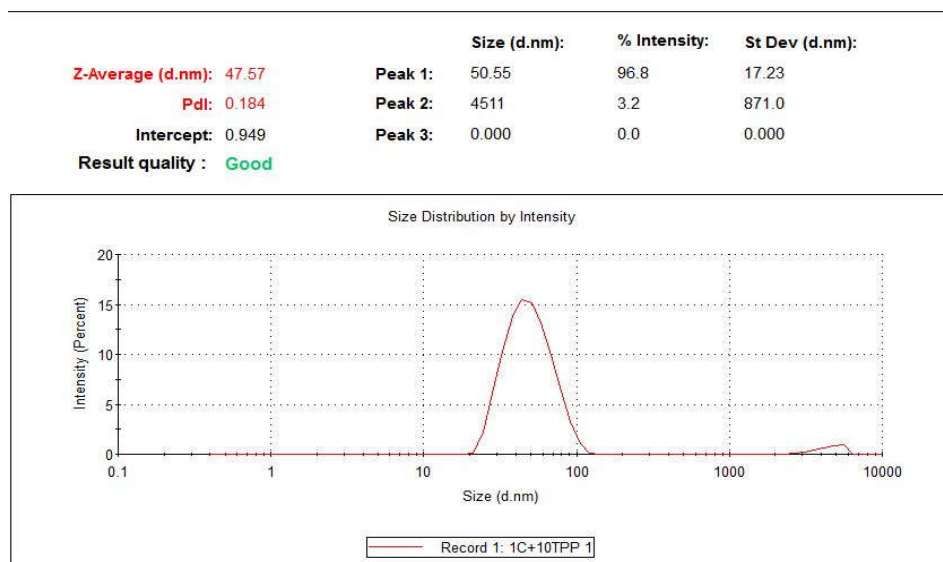
### یافته‌ها

#### نمودار بررسی اندازه نانوذرات کیتوزان

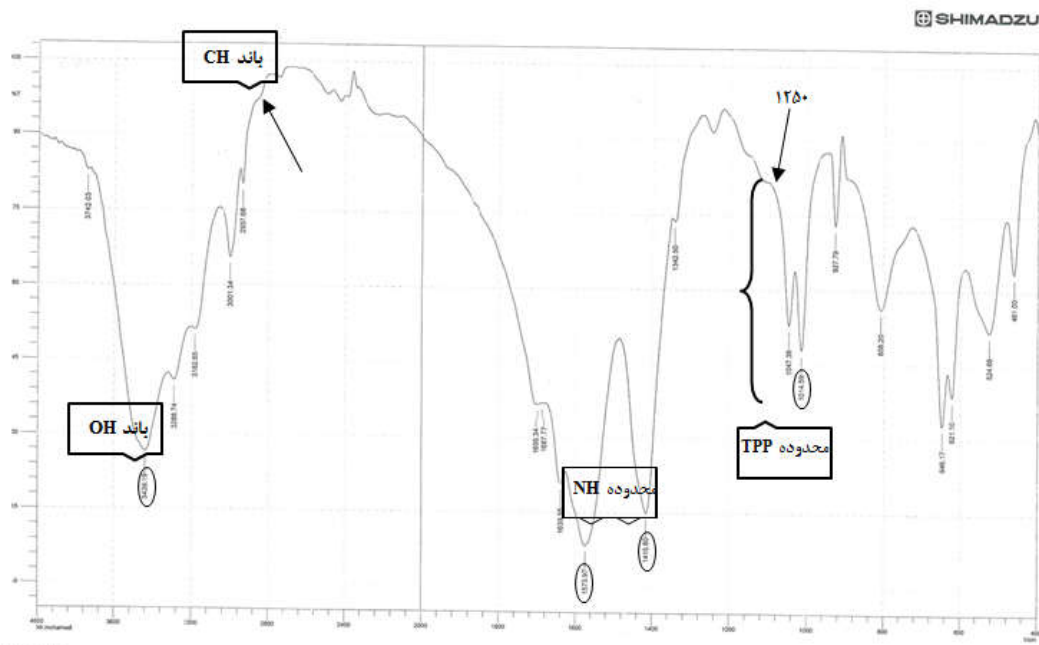
نتایج به دست آمده از بررسی اندازه نانوذرات به وسیله روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) بررسی شد و بهترین نتیجه در شکل ۱ آورده شده است. همان طور که از نتایج مشخص است، درصد بالایی از ذرات ایجاد شده در محدوده نانومتر است. ذرات دارای ابعاد میکرومتری به دلیل عدم جداسازی کامل ذرات ایجاد شده است. همچنین بازده فرایند تولید نانوذرات در حدود ۹۵٪ درصد است. نانوذرات تولیدی با استفاده از محلول کیتوزان با غلظت ۱ mg/ml، محلول TPP با غلظت ۱ mg/ml و نسبت CS/TPP برابر با ۱:۱ به دست آمد. متوسط اندازه به دست آمده نیز برابر با  $80 \pm 40$  بود.

#### طیف سنجی مادون قرمز تبدیل نانوذره کیتوزان (FTIR)

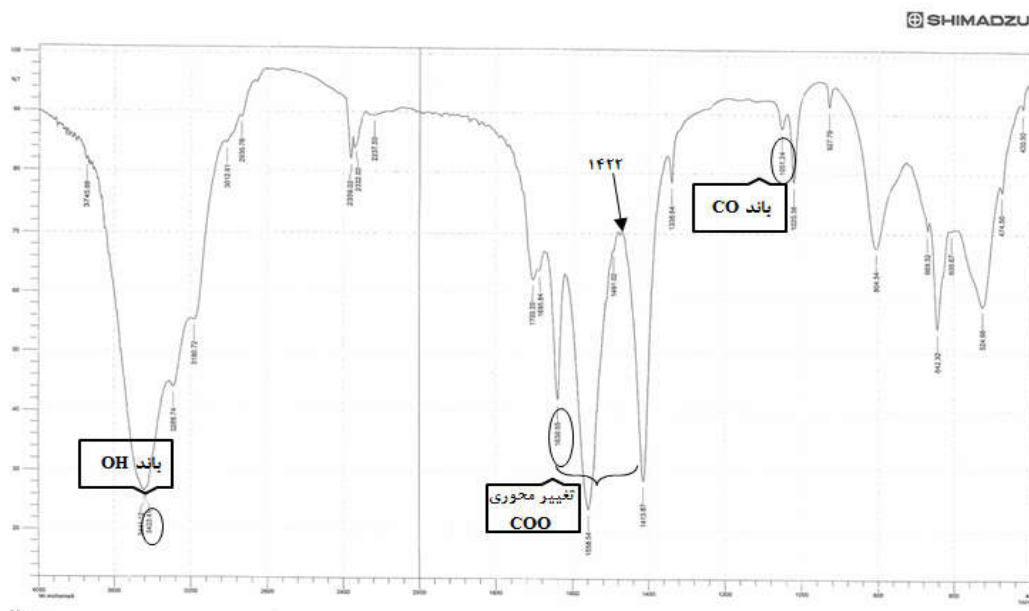
در شکل ۲ طیف نانوذرات کیتوزان/ تری‌پلی‌فسفات با



شکل ۱. نتایج حاصله از بررسی اندازه نانوذرات کیتوزان با نسبت ۱:۱ TPP



شکل ۲. اسپکتروفوتوگرام مادون قرمز نانوذره کیتوزان/TPP با نسبت ۱:۱

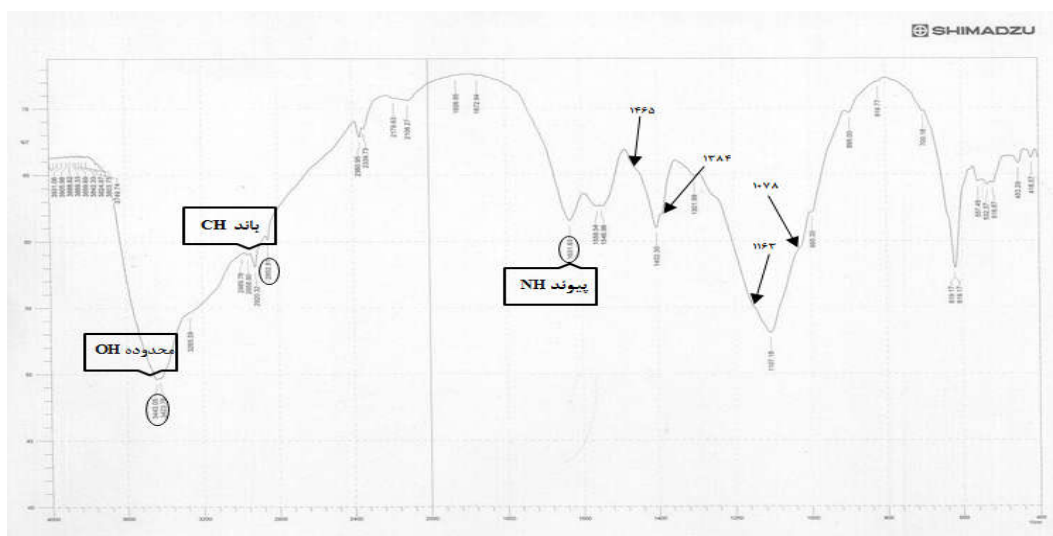


شکل ۳. اسپکتروفوتوگرام مادون قرمز کربوکسی متیل کیتوزان و تری پلی فسفات با نسبت ۱:۱

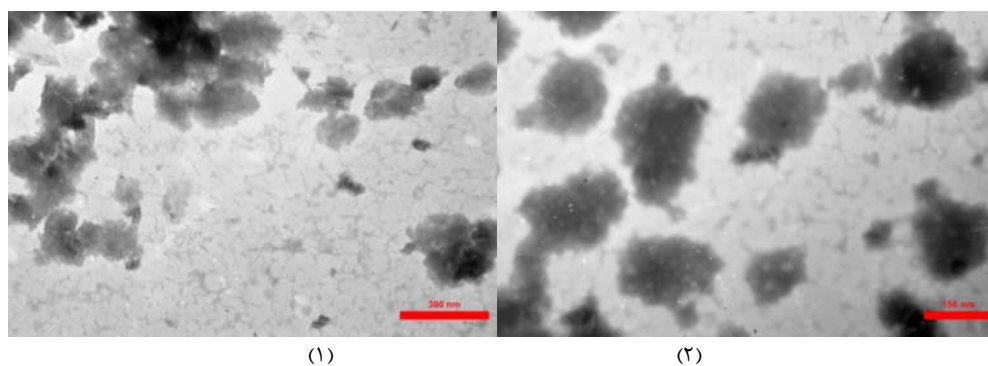
شکل ۴ طیف FTIR نمونه کیتوزان نشاندار شده با FITC را نشان می‌دهد. اتصال کووالان پروتئین به نانوذرات کیتوزان با نمونه کنترل تایید شد. این اتصال با ایجاد پیوندهای کووالان بین آمین‌های اولیه و گروه کربوکسیل فعال شده ایجاد می‌شود. پیک  $3423-3443\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش‌های کششی پیوند NH گروه‌های آمین نوع اول کیتوزان و OH گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل کیتوزان و FITC است.

پیک شدید در  $1639/5\text{ cm}^{-1}$  و پیک متوسط در  $1422\text{ cm}^{-1}$  به ترتیب به تغییر شکل محوری متقارن یا نامتقارن COO است که وجود گروه‌های کربوکسی متیل را در کیتوزان تایید می‌کند.

آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه نانوذرات کیتوزان نشاندار شده با FITC (FTIR)



شکل ۴. اسپکتروفوتوگرام مادون قرمز نانوذره کیتوزان نشاندار شده با FITC



شکل ۵. تصویر میکروسکوپ عبوری از نانوذرات. (۱) تصویر میکروسکوپ عبوری از نانوذره کیتوزان نشاندار شده با FITC؛ (۲) تصویر میکروسکوپ عبوری از نانوذره کربوکسی متیل کیتوزان نشاندار شده با FITC

### بررسی پایداری نانوذرات کیتوزان و کربوکسی متیل

#### کیتوزان نشاندار شده با FITC

#### بررسی پایداری در pHهای مختلف

طبق نتایج به دست آمده مشخص شد که نانوذرات کیتوزان در محیط اسیدی سایز کوچکتری نسبت به محیط بازی دارند و بیانگر این است که نانوذرات در محیط بازی متورم شده و می توانند محتویات خود را به محیط بیرون آزاد کنند، اما در محیط اسیدی فشرده بوده و از رهائش دارو ممانعت به عمل می آورند (شکل ۶). بر اساس این نتایج نانوذرات کیتوزان نشاندار شده با FITC در این پروژه می توانند گزینه مناسبی در جهت انتقال دارو به روده و افزایش جذب آن باشند. اما با توجه به نتایج نانوذرات کربوکسی متیل کیتوزان نشاندار شده با FITC سایز نانوذرات از محیط اسیدی تا محیط بازی کاهش چشمگیری دارند. این نتایج نشان دهنده این است که نانوذرات کربوکسی متیل کیتوزان در معده می تواند متورم

جذب در  $1163 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش کششی پیوند COC گروه اتری کیتوزان و FITC است. جذب در اعداد موجی  $1078$  و  $1465$  به ترتیب مربوط به ارتعاش کششی پیوندهای CO گروه هیدروکسیل کیتوزان با FITC و پیوند CN در گروه آمین نوع دوم ایجاد شده در اثر واکنش کیتوزان با FITC است.

#### میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

به منظور تایید اتصال نانوذرات کیتوزان و کربوکسی متیل کیتوزان با FITC و سایز مورد نظر نانوذرات این آزمایش انجام شد. تصاویر حاصل در شکل ۵ اندازه نانوذرات در بازه مورد نظر را تایید می کند، از نظر شکل شناسی نیز از یکنواختی و کروی بودن مناسبی برخوردار هستند.

است از محلول‌های آبی و فاقد نمک استفاده شود، و مانند هر ماده دارویی دیگری با سیستم گوارش نسبتاً خالی مورد استفاده قرار گیرد تا از تداخل با مواد غذایی حاوی نمک و ترشح نمک‌های صفراوی تا حد زیادی جلوگیری شود.

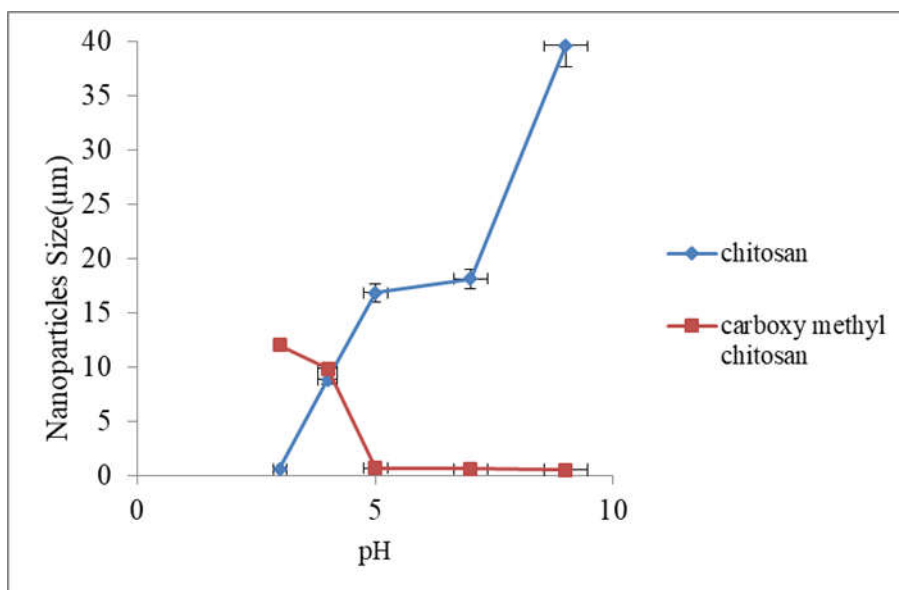
#### بررسی پایداری در غلظت‌های مختلف آنزیم

با توجه به شکل ۸ غلظت آنزیم تریپسین در ابتدای روده یا دوازدهه بالاترین میزان را دارد و به تدریج که به سمت روده بزرگ پیش می‌رویم غلظت به شدت کاهش می‌یابد. با توجه به نتایج حاصله متوجه می‌شویم که نانوذرات کیتوزان نشاندار شده با FITC در غلظت بالای تریپسین (mg/ml)

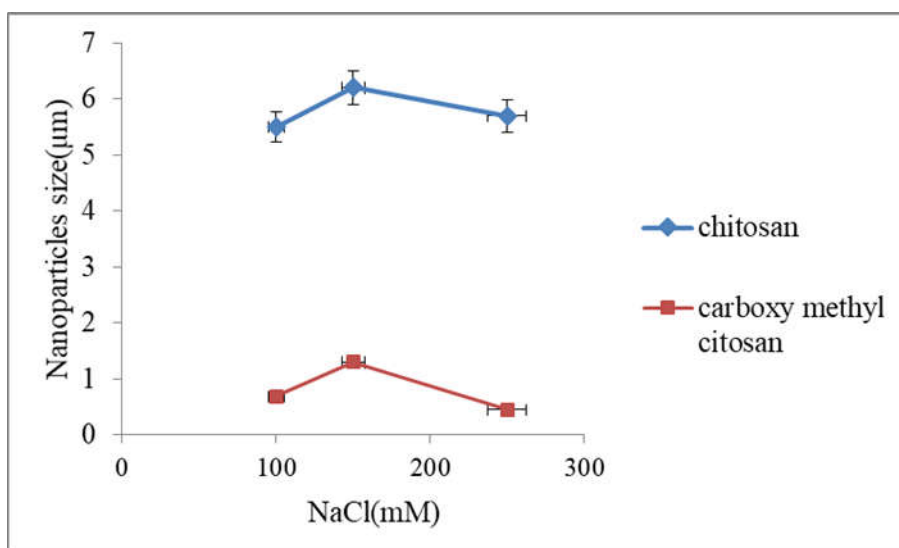
شوند و محتویات دارویی خود را آزاد کنند. اما برای دارورسانی در روده گزینه مناسبی محسوب نمی‌شوند.

#### بررسی پایداری در غلظت‌های مختلف نمک

نتایج نشان داده شده در شکل ۷ حاکی از آن است که نانوذرات وضعیت ساختاری پایداری در محیط‌های نمکی با غلظت‌های مختلف ندارند و در محدوده میکرومتر و نانومتر در حال تغییر هستند. محلول NaCl به واسطه وجود بارهای Na مثبت و Cl منفی باعث تجمع و پلیمریزاسیون نانوذرات می‌شوند و کیفیت و پایداری آن را به شدت تحت تاثیر قرار می‌دهند. به منظور نگهداری این نانوذرات بهتر

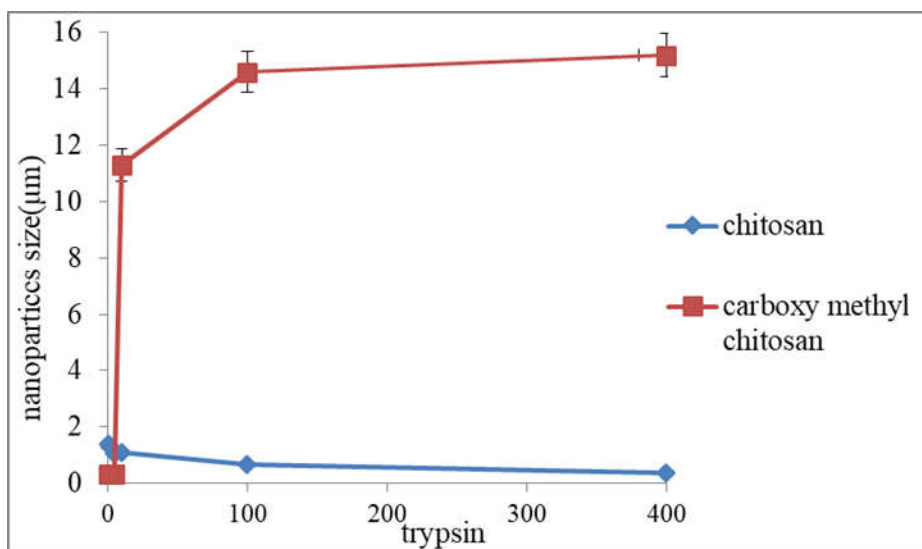


شکل ۶. نمودار بررسی پایداری نانوذرات کیتوزان و کربوکسی متیل کیتوزان نشاندار شده با FITC در pH های مختلف



شکل ۷. نمودار بررسی پایداری نانوذرات کیتوزان و کربوکسی متیل کیتوزان نشاندار شده با FITC در غلظت‌های مختلف نمک





شکل ۸. نمودار بررسی پایداری نانوذرات کیتوزان و کربوکسی متیل کیتوزان نشاندار شده با FITC در غلظت‌های مختلف آنزیم تریپسین

چسبندگی به مخاط و بافت‌های زنده و فعالیت ضد اسیدی خود و کاهش اثرات جانبی دارو در سیستم گوارش می‌تواند به عنوان حامل دارویی در بیماری‌های کولون مورد استفاده قرار گیرد (۱۲). به منظور بررسی بهتر و بهبود وضعیت پیشین از کربوکسی متیل کیتوزان که یکی از مهم‌ترین مشتقات کیتوزان است هم استفاده شد. برای تهیه نانوذرات روش ژل شدن یونی با استفاده از مولکول تری‌پلی‌فسفات استفاده شد که با ایجاد حدواسط منفی باعث پایداری نانوذرات می‌شود (۱۳). بر اساس نتایج به دست آمده بهترین نسبت‌های تست شده از TPP و نانوذره کیتوزان ۱:۱، TPP و کربوکسی متیل کیتوزان نیز ۱:۱ است، که در شرایط بهینه فوق‌الذکر دارای میانگین اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر هستند. این در حالی است که در مطالعه انجام شده توسط yumin و همکارانش (۱۴) از غلظت ۱-۳ mg/ml کیتوزان و ۱ mg/ml تری‌پلی فسفات برای تهیه نانوذرات توسط روش ژل شدن یونی استفاده شد و نتیجه آن تشکیل ذراتی با اندازه  $100 \pm 30$  nm است. بنابراین مشاهده می‌شود که نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج انجام شده توسط yumin و همکارانش مطابقت دارد. در گزارش Huang و همکارانش که برای اولین بار در سال ۲۰۰۲ به تهیه این نانوذرات موفق شده بودند، بهترین نانوذرات نشان‌دار کیتوزان با سایز ۲۳۱nm بود (۱۵). تفاوت اندازه نانوذرات در مطالعه ما با مطالعات Huang و همکارانش را این طور می‌توان تفسیر کرد که با افزایش غلظت محلول کیتوزان، گرانیروی محلول افزایش یافته و مقاوت فاز مایع در برابر پراکنده شدن افزایش می‌یابد، در نتیجه ذرات بزرگتر تشکیل می‌شوند. با

کاهش غلظت تریپسین متورم شده و در محدوده سایز میکرومتر قرار می‌گیرند، که این حاکی از این است که نانوذرات کیتوزان باعث تسهیل رهایش دارو در روده می‌شوند. این نتایج در راستای نتایج پایداری در pHهای مختلف است و در هر دو موارد رفتار مشابه از نانوذرات کیتوزان مشاهده می‌شود. اما نانوذرات کربوکسی متیل کیتوزان در غلظت بالای تریپسین، بالاترین سایز در حدود ۱۵ میکرومتر را دارند و در غلظت‌های کمتر از ۵ mg/ml تریپسین، در محدوده سایز  $30 \pm 30$  نانومتر هستند. این نتایج نشان می‌دهد نانوذرات کربوکسی متیل کیتوزان در ابتدای روده به صورت متورم و در انتهای روده به صورت فشرده می‌باشند. پس این نانوذرات برای دارورسانی از طریق روده گزینه مناسبی محسوب نمی‌شوند. در عوض به منظور دارورسانی هدفمند به معده و ابتدای روده گزینه مناسبی است. این نتایج در راستای نتایج حاصل از پایداری در pHهای مختلف است.

## بحث

برای دستیابی موفق به آزادسازی دارو در روده، دارو باید از جذب یا محیط فیزیولوژیکی دستگاه گوارش در امان باشد و سپس به سرعت در بخش ابتدایی روده که بهترین مکان برای رهاسازی دارو است، آزاد شود (۱۱). نانوذرات کیتوزان نوعی از نانوذرات مورد استفاده در این زمینه است. به دلیل خاصیت

اندازه  $194 \pm 1/6$  نانومتر بود که با آزمایشات انجام شده مطابقت دارد (۱۹). به منظور شبیه سازی مسیر رهایش دارو در دستگاه گوارش، ترکیبی از زمان، pH و غلظت نمک و سیستم کنترل آنزیم تریپسین به منظور ساختن یک نانوذره کیتوزان ویژه و کامل برای دارو رسانی به ویژه در روده مورد بررسی قرار گرفت (۲۰). نتایج حاصل از DLS نشان دهنده این است که نانوذرات کیتوزان نشاندار اندازه کوچکتری نسبت به نانو ذرات در محیط بازی دارند و از رهایش دارو در محیط اسیدی معده جلوگیری می کنند؛ از این رو می توانند گزینه مناسبی برای انتقال دارو به روده و افزایش جذب آن باشد. اما اندازه نانوذرات کربوکسی متیل کیتوزان نشاندار شده در محیط اسیدی تا محیط بازی کاهش یافت و نشان دهنده این است که ذرات در محیط اسیدی معده می توانند متورم شوند و محتویات دارویی را آزاد کنند؛ اما برای دارورسانی به محیط بازی روده گزینه مناسبی نیستند. در تست پایداری با نمک NaCl مشخص شد که پایداری نانوذرات در نمک کم است، زیرا بارهای مثبت و منفی باعث پلیمریزاسیون نانوذرات می شود. بهتر است از محلول های آبی فاقد نمک استفاده شود. در تست پایداری آنزیم تریپسین، نتایج حاصل از DLS نشان می دهد که نانوذرات کیتوزان نشاندار شده در غلظت بالای تریپسین در محدوده نانو و دارای کوچکترین اندازه هستند. با کاهش غلظت تریپسین، اندازه ذرات بزرگتر شده و در محدوده میکرو قرار می گیرند که باعث تورم و تسهیل در آزاد سازی محتویات دارویی خود در روده می شود.

اما نتایج مشاهده شده از نانوذرات کربوکسی متیل کیتوزان نشاندار شده نشان می دهد که در غلظت بالای تریپسین اندازه ذرات در بالاترین حد خود یعنی در محدوده میکرو است و با کاهش غلظت از اندازه نانوذرات کاسته شده و در محدوده نانو قرار می گیرد که گزینه مناسبی برای دارورسانی به محیط اسیدی مثل معده است.

افزایش غلظت کیتوزان، مولکول های کیتوزان به هم نزدیک تر شده و شروع به پیچیده شدن و به هم پیوستن می کنند که در نتیجه پراکندگی مولکول های تری پلی فسفات در مولکول کیتوزان مشکل و ناهمگن است که منجر به تشکیل ذرات بزرگتر می شود. افزایش اندازه نانو ذرات با افزایش غلظت محلول کیتوزان توسط گان و همکارانش نیز گزارش شده است (۱۶).

پتانسیل زتا نانوذرات کیتوزان، مثبت و حدود ۴۷ میلی ولت بود که نشانگر پایداری نانو ذرات و امکان نگهداری طولانی مدت ذرات است. مطالعات ین و همکارانش نشان می دهد که نانو ذرات با بار سطحی بالای ۳۱ میلی ولت پایدارتر هستند و این مسئله از بهم چسبیدن ذرات جلوگیری می کند و منجر به افزایش پایداری نانوذرات می شود (۱۷).

به منظور شناسایی و رصد کردن نانوذرات حامل دارو در لوله گوارش در فاز *in vivo* از پروتئین FITC استفاده شد (۱۸). کیتوزان و کربوکسی متیل کیتوزان هر کدام به طور مجزا با FITC متصل شدند. درصد اتصال با فلورومتری مورد بررسی قرار گرفت که نتیجه اتصال، ۷۹٪ بود که این درصد از اتصال مورد قبول است. جهت بررسی اتصالات از تست FTIR استفاده شد. طی فرایند انجام شده با تست FTIR اتصال مولکول پروتئینی FITC به نانوذرات با ایجاد گروه CN جدید میان FITC و کیتوزان ثابت شد. برای بررسی اندازه نانوذرات تشکیل شده از تست DLS استفاده شد. نتایج حاکی از ایجاد نانوذراتی با اندازه حدود ۱۰۰ تا ۱۵۰ نانومتر بود. به وسیله تصویرهای به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی عبوری تشکیل نانوذرات در اندازه  $50 \pm 10$  تصویب شد. در مطالعه ای که توسط Min Huang و همکارانش بر روی جذب سلولی نانوذره کیتوزان نشاندار شده با FITC صورت گرفت، مشاهده شد که کائوگاسیون کیتوزان-FITC با TPP توسط روش ژل شدن یونی با موفقیت انجام شده و نتیجه حاصل نانوذراتی با

## REFERENCES

1. Teng WL, Khor E, Tan TK, Lim LY, Tan SC. Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydr Res* 2001; 332:305-16.
2. Jayakumar R, Nwe N, Tokura S, Tamura H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *Int J Biol Macromol* 2007; 40:175-81.
3. Hirano S. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polym Int* 1999; 48:732-4.
4. Felt O, Buri P, Gurny R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 1998; 24:979-93.
5. Grenha A, Seijo B, Remunán-Lopez C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur J Pharm Sci* 2005; 25:427-37.
6. Prabakaran M. Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *Int J Biol Macromol* 2015; 72:1313-22.

7. Ohya Y, Shiratani M, Kobayashi H, Ouchi T. Release behavior of 5-fluorouracil from chitosan-gel nanospheres immobilizing 5-fluorouracil coated with polysaccharides and their cell specific cytotoxicity. *J Macromol Sci A* 1994; 31:629-42.
8. Mukhopadhyay P, Chakraborty S, Bhattacharya S, Mishra R, Kundu P. pH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery. *Int J Biol Macromol* 2015; 72:640-8.
9. Chen C-K, Wang Q, Jones CH, Yu Y, Zhang H, Law W-C, et al. Synthesis of pH-responsive chitosan nanocapsules for the controlled delivery of doxorubicin. *Langmuir* 2014; 30:4111-9.
10. McNeil SE. Nanotechnology for the biologist. *J Leukoc Biol* 2005; 78:585-94.
11. Win KY, Feng S-S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 2005; 26:2713-22.
12. Chen S, Wu G, Zeng H. Preparation of high antimicrobial activity thiourea chitosan–Ag<sup>+</sup> complex. *J Carbpol* 2005; 60:33-8.
13. Yang C-H, Lin Y-S, Huang K-S, Huang Y-C, Wang E-C, Jhong J-Y, et al. Microfluidic emulsification and sorting assisted preparation of monodisperse chitosan microparticles. *Lab Chip* 2009; 9:145-50.
14. Xu Y, Du Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int J Pharm* 2003; 250:215-26.
15. Yang C-H, Lin Y-S, Huang K-S, Huang Y-C, Wang E-C, Jhong JY, et al. Microfluidic emulsification and sorting assisted preparation of monodisperse chitosan microparticles. *Lab Chip* 2009; 9:145-50.
16. Gan Q, Wang T, Cochrane C, McCarron P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids Surf* 2005; 44:65-73.
17. Yien L, Zin NM, Sarwar A, Katas H. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *Int J Biomater* 2012; 2012:1-9.
18. Zambito Y, Di Colo G. Preparation and in vitro evaluation of chitosan matrices for colonic controlled drug delivery. *J Pharm Pharm Sci* 2003; 6:274-81.
19. Huang M, Ma Z, Khor E, Lim LY. Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells. *Pharm Res* 2002; 19:1488-94.
20. Pridgen EM, Alexis F, Farokhzad OC. Polymeric nanoparticle drug delivery technologies for oral delivery applications. *Expert Opin Drug Deliv* 2015; 12:1459-73.