

ساخت و ارزیابی فیزیکو شیمیایی ترکیب نانو ذره کیتوزان پگیله بارگذاری شده با داروی لامی وودین

حسین حیدری¹، مهدی شفیع اردستانی²، رضوان ذبیح الهی³، سید مهدی سادات²، شیوا ایرانی⁴، سید نظام الدین حسینی⁵، صفیه امینی⁶، سید داور سیادت⁷، محمد صادق خسروی⁸، علیرضا عزیزی سراجی⁹، پونه رحیمی²، سهیلا حکمت¹⁰، محمدرضا آقا صادقی^{6*}

1. کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران.
2. استادیار، بخش هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
3. پزشک، بخش هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
4. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
5. استادیار، بخش تولید فرآورده‌های نو ترکیب، واحد تولیدی و تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
6. دانشیار، بخش هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
7. دانشیار، بخش باکتری شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
8. کارشناس، دکترای دام پزشکی، بخش هاری، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
9. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، بخش هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
10. مربی، بخش هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: 91/11/5 تاریخ پذیرش: 92/3/29

چکیده

زمینه و هدف: به دلیل عدم وجود واکسن موثر برای بیماری ایدز، داروهای ضد HIV نقش مهمی در کنترل این بیماری دارند. همچنین ایجاد مقاومت‌های دارویی روز افزون و سمیت داروهای موجود، علاقه برای انجام پژوهش با هدف یافتن ترکیبات جدید ضد ویروس HIV را افزایش داده است. در این مطالعه نانو داروی لامی وودین بر پایه نانو ذره کیتوزان پگیله شده، سنتز شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، نانو ذرات کیتوزان را با مولکول‌های پلی اتیلن گلیکول (PEG)، جهت افزایش حلالیت آنها، پگیله کرده و سپس داروی ضد ویروس لامی وودین بر روی این نانو ذرات پگیله شده، لود گردید. پس از خالص‌سازی و لیوفیلیزه کردن نانو داروی تازه سنتز شده، از مواد اولیه و محصول نهایی جهت بررسی فیزیکو شیمیایی آنها و انجام تست‌های FTIR, HNMR و CHN Analysis نمونه‌برداری شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تست HNMR نشان داد که نانو ذره کیتوزان با موفقیت پگیله شده است. نتایج حاصل از تست FTIR، از طرفی نتیجه HNMR را تایید نمود و از طرف دیگر نشان داد که لامی وودین بر روی نانو ذره کیتوزان کنژوگه شده است. نتایج آنالیز CHN هر دو تست بالا را تایید کرد و مشخص نمود که پگیلاسیون نانو ذره کیتوزان با راندمان بسیار بالا و در حدود 97 درصد صورت گرفته و داروی لامی وودین در حدود 30 درصد وزن نانو ذره کیتوزان بر روی آن کنژوگه شده است.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه نشان داده شد که نانو داروی لامی وودین بر پایه نانو ذره کیتوزان پگیله شده، با موفقیت سنتز شد.

کلید واژگان: ضد ویروس نقص سیستم ایمنی انسان، کیتوزان، لامی وودین، پلی اتیلن گلیکول

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، بخش هیاتیت و ایدز

Email: mrasadeghi@pasteur.ac.ir

مقدمه

ویروس نقص ایمنی انسان (Human immunodeficiency virus- HIV) یک RNA ویروس و از گروه رتروویروسها می باشد. این ویروس عامل سندرم نقص ایمنی اکتسابی (Acquired Immunodeficiency Syndrome- AIDS) می باشد (1) که یک بیماری عفونی مزمن، با کاهش پیشرونده تعداد سلولهای $T CD4^+$ است. سلولهای $CD4^+$ میزان اصلی این ویروس بوده و با کاهش پیشرونده گنجینه این سلولها، عفونت های فرصت طلب و تومورها منجر به مرگ می گردند (2). این ویروس پس از اتصال به سلول هدف و ادغام پوشش لپیدی خود با غشا سلول میزبان و وارد کردن کپسید حاوی ماده ژنتیکی خود به درون سلول میزبان، RNA ژنومی خود را توسط آنزیم رو نوشت بردار معکوس (Reverse Transcriptase) به DNA پروویروسی رونوشت برداری و سپس پروویروس را با استفاده از آنزیم اینتگرز (Integrase) به DNA میزبان وارد می کند. بیماری ایدز اولین بار در سال 1981 در ایالات متحده آمریکا گزارش شده و پس از آن، به سرعت در جهان گسترش یافته و به یک معضل بهداشت جهانی تبدیل شده است و بار بهداشتی و اقتصادی سنگینی به نظام سلامت جهانی وارد کرده است (1). متاسفانه تاکنون واکسن موثری برای این بیماری در دنیا کشف نشده است و پیشگیری و دارو درمانی بهترین راه درمان بیماری ایدز می باشد (3). از یک طرف، داروهای موجود قادر به درمان قطعی این بیماری نیستند و از طرف دیگر، سمیت داروهای موجود و نیز استفاده طولانی مدت از این داروها سبب ایجاد مقاومت های دارویی گشته است (4). این عوامل، باعث شده اند تا پژوهشگران به شدت دنبال یافتن داروهای جدید و موثر بر روی ویروس HIV باشند. یکی از این استراتژی ها استفاده از دانش نانو تکنولوژی در صنعت داروسازی و سنتز نانو داروهای جدید و موثرتر نسبت به داروهای سنتی می باشد.

در تحقیق حاضر، تلاش شده تا نانو ذره کیتوزان پگیده بارگذاری شده توسط داروی کاملاً سنتتیک لایمی وودین به عنوان یک ترکیب جدید ضد ویروس HIV، ساخته شود. داروی لایمی وودین آنالوگ نوکلئوتید ستوزین می باشد و با قرار گرفتن در رشته در حال همانند سازی ژنوم ویروس HIV، به دلیل نداشتن $3' OH$ ، در روند تکثیر ویروس وقفه ایجاد کرده و از تکثیر ویروس در سلول های میزبان جلوگیری به عمل می آورد.

نانو ذره کیتوزان مشتق داستیله شده پلی ساکارید کیتین می باشد که در زمینه های گوناگونی از جمله پزشکی، داروسازی و بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار می گیرد. این نانو ذره دارای خصوصیات مهم از جمله فراوانی بالا، عدم سمیت، ایمونوژنیسیته بسیار کم و زیست تخریب می باشد (5).

مواد و روش ها

در این تحقیق تجربی، نانو ذره کیتوزان با وزن مولکولی 3 کیلو دالتون و میانگین اندازه 108 نانومتر، به صورت پودر از شرکت سیگما و پلی اتیلن گلیکول (Polyethylene glycol- PEG) با نام تجاری Methoxy PEG Maleimide، با وزن مولکولی 30 کیلو دالتون از شرکت BOC Sciences خریداری شدند.

مقدار 300 میلی گرم از نانو ذره کیتوزان با وزن مولکولی 3 کیلودالتون در یک بشر حاوی مقدار دلخواه از حلال DMF (به دلیل نامحلول بودن نانو ذره کیتوزان در آب)، اضافه شد. نانو ذره کیتوزان دارای دو گروه عامل NH_2 و OH در ساختمان خود می باشد و برای انجام عمل پگیلاسیون و همچنین کونژوگاسیون دارو، از این دو گروه عامل استفاده می شود. چون به گروه عامل OH در کونژوگه کردن دارو نیاز بود، بنابر این باید از اتصال مولکول های PEG به گروه عامل های OH نانو ذره کیتوزان جلوگیری شود. از این رو مقدار کمی از ماده $CaCl_2$ به عنوان مستتر کننده گروه عامل OH نانو ذره کیتوزان به محلول کیتوزان

گردد. کیتوزان پگیله شده به دلیل سنگینی تمایل به رسوب شدن دارد لذا پس از سانتریفیوژ محلول رویی را دور ریخته و رسوب حاصل لیوفیلیزه گردید.

از نانوذره کیتوزان و PEG و نیز از محصول پگیلاسیون لیوفیلیزه شده جهت انجام تست HNMR نمونه برداری شد.

نانو ذره کیتوزان توان حمل دارو به میزان 30 درصد وزن خود را دارد لذا 100 میلی گرم از ماده موثره داروی لامی وودین که از شرکت سیگما خریداری شده بود به حلال حاوی نانو ذره کیتوزان پگیله شده، اضافه و به مدت یک ساعت ورتکس گردید تا نانو ذره کیتوزان با داروی لامی وودین کنژوگه شود. برای بالا بردن راندمان فرایند کنژوگاسیون به حلال، 0/5 میلی لیتر اسید کلریدریک با غلظت 35 درصد اضافه و pH محیط عمل اسیدی گردید.

پس از پایان کنژوگاسیون و لود کردن داروی لامی وودین بر روی نانو ذره کیتوزان پگیله شده، فرایند متوقف و محصول با استفاده از کاغذ صافی استریل، فیلتر گردید تا ناخالصی‌های موجود گرفته شود. محلول حاصل از فیلتراسیون در چندین ویال پخش و لیوفیلیزه گردید. از نانوذره کیتوزان، PEG، کیتوزان پگیله شده و نیز کیتوزان پگیله بار گذاری شده توسط داروی لامی وودین، جهت انجام تست‌های FTIR و CHN Analysis نمونه برداری شد.

یافته‌ها

HNMR یا طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای برای شناسایی مواد، تشخیص نوع مولکول‌ها، تعیین جرم مولکولی و فرمول مولکولی به کار می‌رود. تکنیک NMR یک تکنیک جذبی و مولکولی است که در ناحیه فرکانس رادیویی 4-60 MHz قرار دارد. در این تکنیک هسته‌ها مسئول جذب تابش می‌باشند و اختلاف انرژی بین دو حالت هسته اندازه‌گیری می‌شود. در این تکنیک ابتدا هسته‌ها در یک میدان مغناطیسی خارجی قوی قرار می‌گیرند تا حالت‌های انرژی آنها از یکدیگر جدا شوند. در اثر فرایند جذب انرژی، هسته‌ها از سطح انرژی پایین به سطح انرژی

اضافه گردید کلیه واکنش‌ها در پگیلاسیون، یک مول بر یک مول صورت گرفت بنابر این 30 میلی گرم از PEG با وزن مولکول 30 کیلو دالتون به محلول کیتوزان اضافه شد.

لازم به ذکر می‌باشد گروه عامل PEG نیز OH می‌باشد و گروه‌های عامل NH₂ آزاد نانو ذره کیتوزان تمایل خیلی زیادی به اتصال با گروه‌های عامل OH مولکول‌های PEG دارند (6). پیوند ایجاد شده بین دو گروه عامل ذکر شده از نوع پیوند آمیدی است. از آن جایی که واکنش آمیداسیون در شرایط عادی یک واکنش خیلی کند می‌باشد لذا برای سرعت بخشیدن به واکنش آمیداسیون در خارج از بدن از کاتالیزور اتیل دی متیل کربودی امید، استفاده می‌شود و ما نیز مقدار کمی از آن را به محلول کیتوزان و PEG اضافه کردیم.

کلیه گروه‌های عامل NH₂ نانو ذره کیتوزان با گروه عامل OH مولکول‌های PEG وارد واکنش می‌شوند و به دلیل بزرگی و کثرت مولکول‌های نانو ذره کیتوزان و PEG، راندمان پگیلاسیون بسیار بالا و در حدود 97 درصد می‌باشد (7).

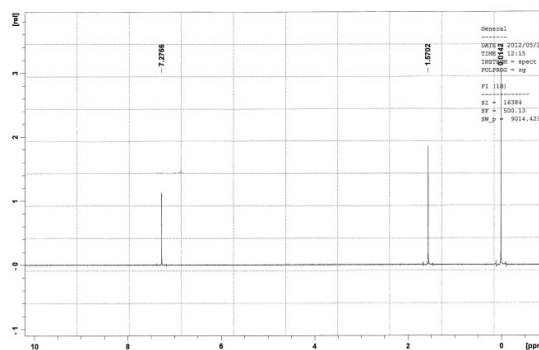
یکی از محصولات جانبی ایجاد شده در طی واکنش آمیداسیون، مولکول‌های آب می‌باشند که در صورت عدم حذف آنها از محیط عمل، این مولکول‌های آب به مرور زمان وارد واکنش ضد آمیداسیون شده و واکنش را در جهت شکستن پیوندهای آمیدی پیش می‌برند. لذا برای حذف عمل ضد آمیداسیون آب و افزایش راندمان واکنش آمیداسیون، از ماده جاذب آب به نام نمک ان-هیدروکسی سولفو سوکسینامید سدیم که از شرکت آلد ریچ خریداری شده بود، استفاده گردید و مقدار کمی از آن به کل محلول اضافه شد. سپس بشر حاوی مواد ذکر شده، بر روی استیرر قرار داده شد.

انجام واکنش پگیلاسیون نانو ذره کیتوزان بر روی استیرر در حدود دو ساعت به طول انجامید. بعد از دو ساعت، واکنش متوقف شده و محتوای بشر داخل فالدکون 15 میلی‌لیتری در سانتریفیوژی با 15000 دور در دقیقه به مدت 45 دقیقه قرار داده شد تا فرایند خالص سازی انجام

در این تحقیق نیز برای تعیین نوع مولکول و تائید پگیلاسیون از مواد اولیه و کیتوزان پگیله شده در حلال های کلروفرم دوتریوم دار و D_2O توسط دستگاه Bruker گراف های HNMR تهیه شد.

در نمودار HNMR نانو ذره کیتوزان، در حلال کلروفرم دوتریوم دار، دو پیک شارپ مشاهده می شود که در ناحیه 0/0142 و 1/5702 قسمت بر میلیون (ppm) قرار دارند. حضور این پیک ها معیار حضور نانو ذره کیتوزان می باشد (شکل 1).

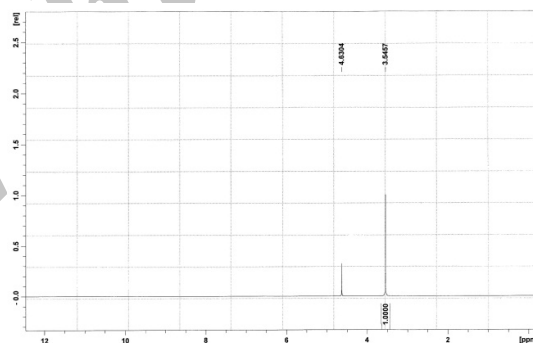
بالایی برانگیخته می شوند. این هسته های برانگیخته، انرژی خود را که برابر اختلاف سطوح انرژی است به صورت تابش نشر می کنند و به سطح با انرژی پایین بر می گردند (8). در NMR، نمونه باید به صورت محلول و در عین حال حلال باید فاقد پروتون باشد تا جذبی نداشته باشد. برای NMR از حلال های $CDCl_3$ (کلروفرم دوتریوم دار)، CD_3OD (متانول دوتریوم دار)، D_2O و DMSO (دی متیل سولفو کساید) استفاده می شود (8).



شکل 1. گراف HNMR از نانو ذره کیتوزان محلول در کلروفرم دوتریوم دار

میلیون مشاهده می شود که حضور این پیک معیار حضور PEG می باشد (شکل 2).

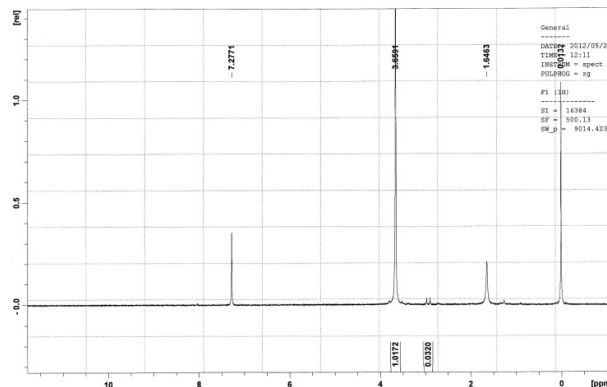
در گراف HNMR مولکول های PEG در حلال D_2O یک پیک شارپ در ناحیه 3/5457 قسمت بر



شکل 2. گراف HNMR پلی اتیلن گلیکول آمین (PEG) در حلال D_2O

حضور این پیک ها معیار حضور نانو ذره کیتوزان می باشد و هم چنین یک پیک هم در ناحیه 3/6591 قسمت بر میلیون قرار داشت که در مقایسه با پیک حاصله در نمودار HNMR مولکول های PEG مشاهده شد که وجود این پیک معیار حضور PEG در ترکیب می باشد (شکل 3).

در نمودار HNMR نانو ذره کیتوزان پگیله شده در حلال کلروفرم دوتریوم دار، سه پیک شارپ مشاهده شد که دو عدد از پیک ها در نواحی 0/0132 و 1/6483 قسمت بر میلیون قرار داشتند و در مقایسه با پیک های به دست آمده در نمودار HNMR نانو ذره کیتوزان، مشاهده شد که



شکل 3. گراف ^1H NMR نانو ذره کیتوزان پگیله شده در حلال کلروفرم دوتریوم دار

به نتایج مورد نیاز (شدت نور در هر طول موج) تبدیل شود. فرایند مورد نیاز یک الگوریتم خیلی متداول به نام تبدیل فوریه است (به همین علت طیف سنجی تبدیل فوریه نامیده می شود) (9).

در این تحقیق نیز ما برای تعیین ساختار مولکولی مواد اولیه، کیتوزان پگیله شده و نانو داروی سنتز شده و همچنین تایید صحت پگیلاسیون و کونژوگاسیون داروی لامی وودین، توسط دستگاه Bruker گراف های FTIR را تهیه کردیم. در اثر بررسی گراف FTIR نانو ذره کیتوزان مشخص شد که:

پیک های مشاهده شده در نواحی $1085/7\text{cm}^{-1}$ ، نشان دهنده پیوندهای اتری ما بین قندهای گلوکز آمین، پیک $1638/7\text{cm}^{-1}$ ، نشان دهنده گروه NH گلوکز آمین، پیک $1712/9\text{cm}^{-1}$ ، نشان دهنده گروه کربونیل، پیک های $2854/4\text{cm}^{-1}$ و $2920/2$ ، نشان دهنده گروه های CH قندی و پیک $3439/4\text{cm}^{-1}$ ، نشان دهنده گروه های OH موجود در ساختمان نانو ذره کیتوزان می باشد (شکل 4).

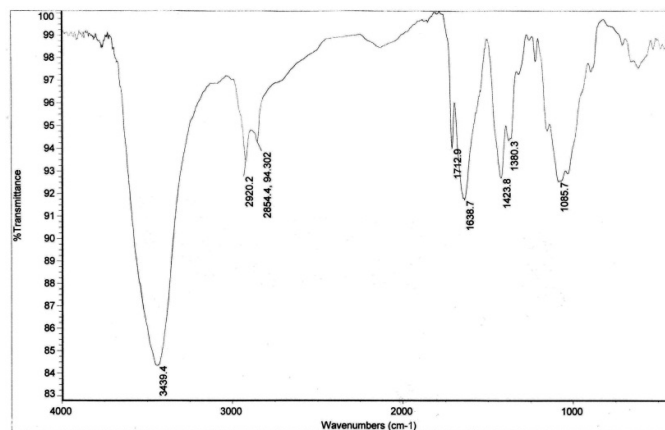
ظاهر شدن پیک مربوط به این دو گروه عامل موجود در نانو ذره کیتوزان، تایید کننده وجود قند گلوکز آمین و همچنین تایید کننده اتصال قندهای گلوکز آمین به همدیگر و ایجاد ساختمان پلیمری است.

FTIR یا طیف سنجی تبدیل فوریه یکی دیگر از تکنیک اندازه گیری می باشد که به وسیله آن، بر اساس اندازه گیری هم دوستی منبع تابشی، طیف به دست می آید. در این تکنیک از اندازه گیری های قلمروی زمانی و فضایی تابش های الکترو مغناطیسی استفاده می شود.

عبارت طیف سنجی تبدیل فوریه نشان دهنده آن است که در این روش برای تبدیل داده های خام به طیف واقعی تبدیل فوریه لازم است. طیف سنجی تبدیل فوریه یک روش تقریباً غیر مستقیم برای به دست آوردن اطلاعاتی مشابه است. این روش به کل نور، شامل طول موج های مختلف، در یک زمان اجازه عبور می دهد تا شدت کل نور اندازه گیری شود. سپس داده های دیگری مبنی بر این که موج شامل چه طول موج هایی است به رایانه داده می شود. این روند چندین بار تکرار و سپس کل داده ها به رایانه داده می شود و بعد از آنالیز داده ها اطلاعاتی که هر طول موج شامل چه مقدار نور است، به دست می آید.

برای اندازه گیری دقیق تر، بین نور و آشکارساز یک چیدمان از چند آینه قرار می دهند که به بعضی از طول موج ها اجازه عبور می دهد و بقیه را مسدود می کند. با تغییر و جابجایی یکی از آینه ها به دسته ای دیگر از طول موج ها اجازه عبور می دهند و در نتیجه داده های دیگری به دست می آید.

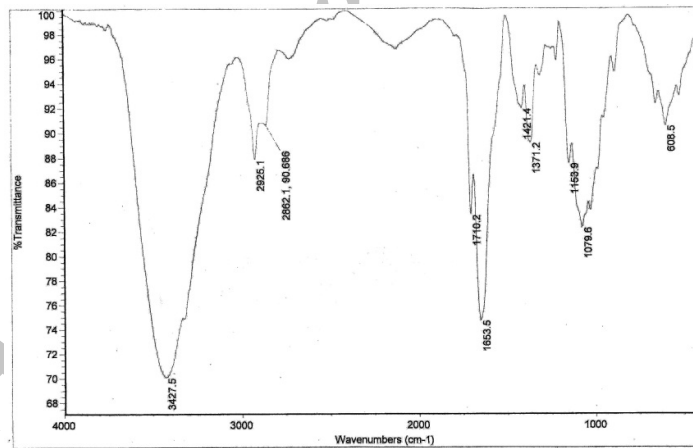
همان طور که قبلاً ذکر شد یک آنالیز رایانه ای نیاز است تا داده های خام (شدت نور برای هر مکان از آینه)



شکل 4. گراف FTIR نانو ذره کیتوزان

نشان دهنده گروه‌های کربوکسیلی، پیک $3427/5\text{cm}^{-1}$ ،
 نشان دهنده گروه‌های OH و پیک‌های $2862/1\text{cm}^{-1}$ و
 $2925/1$ نشان دهنده گروه CH موجود در ساختمان PEG
 می‌باشند (شکل 5).

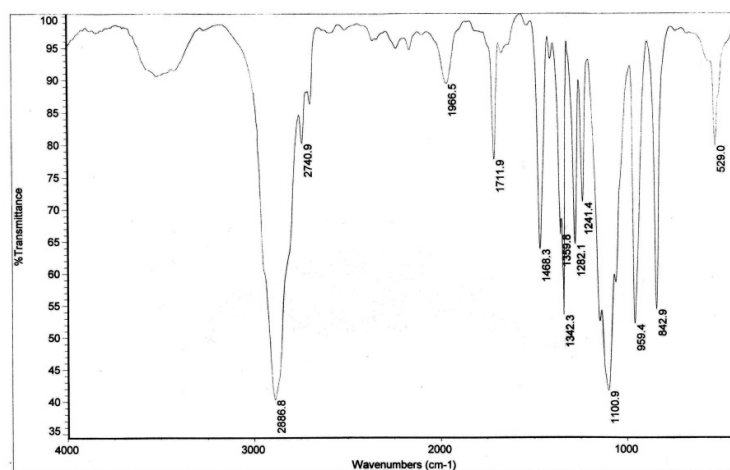
هم‌چنین در اثر بررسی گراف FTIR مولکول‌ها
 PEG مشخص شد که:
 پیک‌های مشاهده شده در نواحی $1079/6\text{cm}^{-1}$ ،
 نشان دهنده پیوندهای اتری، پیک $1710/2\text{cm}^{-1}$



شکل 5. گراف FTIR پلی اتیلن گلایکول آمین (PEG)

نشان دهنده گروه‌های OH موجود در ساختمان نانو ذره
 کیتوزان پگیله شده می‌باشند (شکل 6).

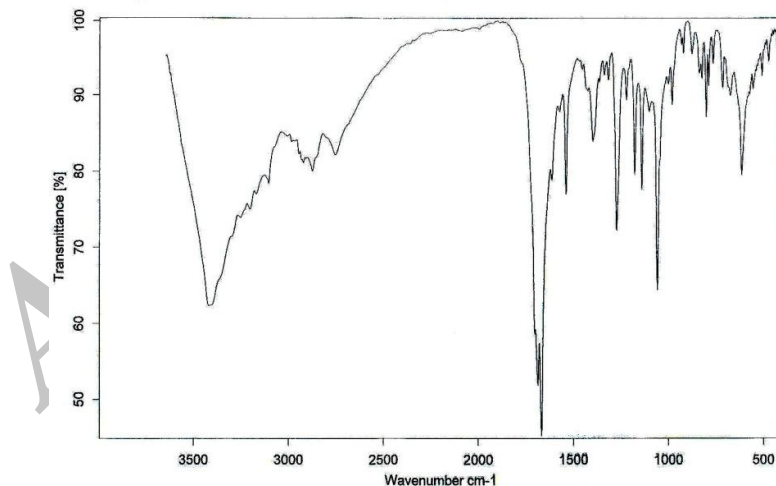
در اثر بررسی گراف FTIR نانو ذره کیتوزان
 پگیله شده مشخص شد:
 پیک‌های مشاهده شده در نواحی $2886/8\text{cm}^{-1}$ ،
 نشان دهنده گروه‌های CH قندی و پیک $3427/5\text{cm}^{-1}$



شکل 6. گراف FTIR نانو ذره کیتوزان پگیله شده

نشان دهنده گروه‌های CH قندی و پیک $3437/5\text{cm}^{-1}$ ،
نشان دهنده گروه‌های OH موجود در ساختمان نانو ذره
کیتوزان پگیله بار گذاری شده با داروی لامی وودین
می‌باشند (شکل 7).

در اثر بررسی گراف FTIR نانو ذره کیتوزان
پگیله بار گذاری شده با داروی لامی وودین مشخص شد:
پیک‌های مشاهده شده در نواحی $1710/2\text{ cm}^{-1}$ ،
نشان دهنده گروه کربوکسیلیکی، پیک $2885/8\text{cm}^{-1}$.



شکل 7. گراف FTIR نانو ذره کیتوزان پگیله شده بار گذاری شده با داروی لامی وودین

می‌کنند و تله‌های مختلفی جهت جمع آوری محصولات
احتراق مانند دی اکسید کربن، آب و اکسید نیتریک قرار
می‌دهند و از توده‌های جمع آوری شده برای شناسایی عناصر

آنالیز CHN، رایج‌ترین شکل تجزیه و تحلیل
عناصر می‌باشد که درصد حضور کربن، هیدروژن و نیتروژن
در یک ترکیب را تعیین می‌کند. جهت انجام این تست،
نمونه مجهول را در حضور اکسیژن فراوان، احتراق کامل

CR 24831 % 54/69	کربن
HR 31665 % 9/55	هیدروژن
NR 7480 % 0/30	نیترژن

نتایج مربوط به تست آنالیز کربن، هیدروژن و نیترژن کیتوزان پگیله شده با وزن 2/014 میلی گرم به قرار زیر است.

ZR 7545		
CR 21879 % 45/39	کربن
HR 27466% 8/05	هیدروژن
NR 8034 % 5/37	نیترژن

نتایج مربوط به تست آنالیز کربن، هیدروژن و نیترژن کیتوزان پگیله بارگذاری شده با داروی لامی وودین با وزن 2/134 میلی گرم به قرار زیر است.

ZR 7555		
CR 16007 % 46/02	کربن
HR 18759 % 7/04	هیدروژن
NR 8466 % 17/02	نیترژن

بحث

پگیلاسیون موفق نانو ذره کیتوزان و تبدیل آن از فرم نامحلول به فرم محلول در آب و همچنین سنتز موفق نانو داروی لامی وودین در تحقیق حاضر و برای اولین بار در کشور در حد آزمایشگاهی، نوید این را می دهد که در آینده بتوان با ادامه این روند و انجام تست های تکمیلی بر روی سلول ها و موجودات آزمایشگاهی آلوده به ویروس HIV گام های موثرتری را در جهت ارائه داروهای نوین برای مهار بهتر ویروس HIV برداشت.

یکی از این استراتژی ها، یافتن ترکیباتی با توان بازدارندگی همانند سازی ویروس HIV از طریق مهار مسیرهای سلولی مورد استفاده ویروس می باشد (10-14).

آنالوگ های نوکلئوزیدی قادر به ایجاد اختلال در همانند سازی ویروس HIV و نیز به عنوان داروهای بازدارنده تکثیر ویروس HIV مطرح می باشند. داروی لامی وودین یک داروی کاملاً سنتتیک و آنالوگ نوکلئوزید سیتیدین می باشد که در سال 1988 توسط دکتر برنارد بلاوو

و محاسبه میزان و درجه خلوص نمونه های ناشناخته استفاده می کنند.

تجزیه و تحلیل نتایج با تعیین نسبت عناصر موجود در نمونه و یا بر اساس فرمول شیمیایی آن که متناسب با نتایج به دست آمده است، انجام می شود. به عنوان مثال درصد حضور نیترژن از فرمول زیر استفاده می شود:

$$\% N = \frac{[(NR - ZR) - NB] \times 100}{(SW \times NKF)}$$

NB = Nitrogen Blank
SW = Sample Weight
NKF (Nitrogen K Factor) = 5.751
ZR و NR داده های خام هستند که در انجام تست CHN به دست می آیند.

این فرایند جهت تعیین و تایید خلوص و صحت ترکیب مورد نظر، بسیار مفید می باشد. انحراف قابل قبول در نتایج تجزیه و تحلیل عناصر مورد نظر، 0/3 درصد از مقدار محاسبه شده است.

در این تحقیق نیز برای به دست آوردن میزان حضور عناصر کربن، هیدروژن و نیترژن مواد اولیه و کیتوزان پگیله شده و کیتوزان پگیله بارگذاری شده با داروی لامی وودین جهت اثبات صحت پگیلاسیون و کونژوگاسیون دارو و تایید نتایج حاصل از HNMR و FTIR، توسط دستگاه Perkin Elmer co سری II آنالیز CHN انجام دادیم.

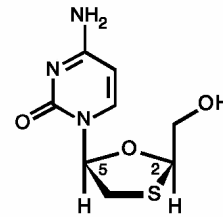
نتایج مربوط به تست آنالیز کربن، هیدروژن و نیترژن نانو ذره کیتوزان با وزن 2/134 میلی گرم به قرار زیر به دست آمد.

ZR 7546		
CR 21791 % 41/73	کربن
HR 27164% 7/28	هیدروژن
NR 8317% 7/49	نیترژن

نتایج مربوط به تست آنالیز کربن، هیدروژن و نیترژن PEG با وزن 2/092 میلی گرم به قرار زیر است.

ZR 7549

تهیه و در 17 نوامبر 1995 مورد تایید FDA قرار گرفت (15) (شکل 8).



2', 3'-dideoxy-3'-thia cytidine

شکل 8. نام و ساختمان شیمیایی Lamivudine

نیم عمر این دارو در بدن در حدود 5-7 ساعت و دسترسی بیولوژیکی آن برای بدن در حدود 86 درصد می باشد و سپس به سرعت در حدود 70 درصد دارو از طریق سیستم کلیه از بدن پاکسازی می شود (15). متاسفانه در کنار مزایایی که مصرف این دارو برای بیماران دارد، عوارض جانبی زیادی را از قبیل واکنش های آلرژیک، اختلالات تنفسی، اختلالات روانی و بروز حالت افسردگی، درد عضلانی، درد و آشفته گی غیر معمول معده را برای بیمار در پی خواهد داشت (15). با در نظر گرفتن مسائل و مشکلات ذکر شده در بالا، ساخت نانو داروی لامی وودین که بتواند میزان دوز مصرفی دارو را پایین بیاورد، عملکرد و نیم عمر این دارو را به طور معنی داری افزایش دهد، میزان سمیت دارو را به طور چشمگیری کاهش دهد و در آخر عوارض جانبی این دارو را به حداقل برساند لازم و ضروری به نظر می رسد.

در این راستا در سال 2004، گوناسلان و همکارانش، پیش داروی Saquinavie (داروی مهارکننده آنزیم پروتئاز ویروس HIV) را با مولکول های PEG با وزن مولکولی متفاوت، پگیله کردند و بر روی سلول های MT-2 آلوده به ویروس تاثیر دادند. نتایج نشان داد که میزان توانایی ضد ویروسی داروی پگیله شده بالاتر از خود دارو بوده و نیز میزان سمیت سلولی داروی پگیله شده به مراتب کمتر از خود دارو بوده است (16).

نایاک و همکاران نیز نشان دادند که با اتصال داروی زایدوودین (داروی مهارکننده آنزیم رونویسی

معکوس ویروس HIV) به اولیگومر کیتوزان، علاوه بر این که میزان جذب این دارو در اندام های بدن تا 10 برابر افزایش نشان داد، نیمه عمر دارو نیز در بدن به میزان معنی داری (بیش از دو برابر) افزایش می یابد. همچنین میزان آزاد سازی دارو هم 24 - 18 ساعت افزایش پیدا کرد (17).

هم چنین در سال 2012، لی و همکارانش داوری زاید وودین را با مولکول های PEG با وزن های مولکولی متفاوت کونژوگه کردند و با روش طیف سنجی FTIR و HNMR صحت گنژوگاسیون را اثبات کردند. تاثیر داروی پگیله شده بر روی سلول های MT-4 آلوده به ویروس HIV تپ وحشی، نشان داد که داروی پگیله شده دارای توانایی بالاتر ضد HIV و میزان سمیت پایین تری نسبت به داروی زاید وودین دارد و نیز تجویز خوراکی داروی پگیله شده به رت نشان داد که در مقایسه با داروی زاید وودین آزاد، داروی پگیله شده 3/2 برابر نیمه عمر بیشتری دارد و میزان دسترسی زیستی آن در حدود 224 درصد افزایش پیدا کرد (18).

مانیز در این تحقیق، با توجه به تاثیر داروی لامی وودین در روند جلوگیری از تکثیر و همانند سازی ویروس HIV و با در نظر گرفتن این موضوع که تحقیقات زیادی در زمینه ساخت نانو داروی لامی وودین در جهان صورت نگرفته است به بررسی و سنتز این نانو دارو بر اساس نانو ذره کیتوزان پرداختیم. نانو ذره کیتوزان مشتق داستیله شده پلی ساکارید کیتین می باشد که در زمینه های گوناگونی از جمله پزشکی، داروسازی و بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار می گیرد. این نانو ذره دارای خصوصیات مهم از جمله فراوانی بالا، عدم سمیت، ایمونوژنیسیته بسیار کم و زیست تخریب می باشد. اما یکی از مشکلات کار با نانو ذره کیتوزان نامحلول بودن این ملکول در محیط های آبی است (5). برای حل این معضل، نانو ذره کیتوزان را با اتصال مولکول های پلی اتیلن گلیکول آمین (PEG) پگیله کردیم. پلی اتیلن گلیکول آمین ها پلیمرهای طبیعی با گروه های انتهایی هیدروکسیلی اند که با اتصال ضعیف هیدروژنی به

در گراف FTIR مربوط به نانو ذره پگیله بارگذاری شده با داروی لامی وودین عکس وضعیت فوق مشاهده شد یعنی پیک مربوط به گروه OH افزایش شدت پیک و پیک مربوط به گروه CH کاهش در شدت پیک از خودشان نشان دادند و همچنین در ناحیه 1710/2 که مربوط به گروه کربوکسیلیکی می باشد به دلیل کنژوگاسیون و وجود گروه کربوکسیلیکی در داروی لامی وودین افزایش شدت پیک را شاهد بودیم و همچنین تراکم پیک ها در انتهای گراف مذکور همگی دلیل محکمی بر کنژوگاسیون موفق نانو ذره کیتوزان پگیله بارگذاری شده با داروی لامی وودین می باشد.

در تست آنالیز CHN یا سنجش عناصر کربن، هیدروژن و نیتروژن نتایج به صورت درصدی اعلام می شود و برای این که بتوانیم تعداد این عناصر را در مولکول های مورد سنجش به دست بیاوریم، نتایج به دست آمده را در فرمول زیر قرار دادیم.

$$\% X = \frac{\text{تعداد اتمی X در مولکول} \times \text{عدد اتمی X}}{\text{وزن مولکولی کل مولکول}} \times 100$$

به عنوان مثال: در مولکول کیتوزان، پس از جاگذاری داده ها و اعداد در فرمول فوق تعداد 1825 عدد کربن، 3822 عدد هیدروژن و 280 عدد نیتروژن محاسبه شد.

در مولکول PEG، تعداد 1367 کربن، 2865 عدد هیدروژن و 7 عدد نیتروژن محاسبه گردید. انتظاری که ما در این تحقیق داشتیم این بود که پس از پگیلاسیون کیتوزان تعداد کربن این ترکیب در حدود 3192 عدد باشد که مطابق محاسبات ما بر اساس فرمول فوق تعداد کربن این ترکیب 3120 عدد شد و از آن جایی که در آنالیز CHN بروز 2/25 درصد خطا قابل قبول می باشد، لذا نتایج این تست نشان دهنده صحت و درستی واکنش پگیلاسیون نانو ذره کیتوزان می باشد.

از طرف دیگر، نتایج حاصل از تست آنالیز CHN، ترکیب کیتوزان پگیله لود شده با داروی لامی وودین، نشان داد که تعداد کربن این ترکیب 4218 عدد

اسیدها و با اتصال ضعیف اتری به backbone متصل می شوند (10).

پس از پگیلاسیون نانو ذره کیتوزان با مولکول های PEG، از مواد اولیه و کیتوزان پگیله شده تست HNMR انجام دادیم، با مقایسه گراف های مواد اولیه با گراف کیتوزان پگیله شده، مشاهده شد که پیک های نمونه نانو ذره کیتوزان که در ناحیه 0/0142 و 1/5702 قسمت بر میلیون ایجاد شده بودند و همچنین پیک نمونه PEG که در ناحیه 3/5457 قسمت بر میلیون ایجاد شده بود. در نمونه کیتوزان پگیله شده نیز در ناحیه 0/0132، 1/6463 و 3/6591 قسمت بر میلیون ایجاد شدند که این امر نشان دهنده صحت انجام پگیلاسیون نانو ذره کیتوزان می باشد.

پس از کنژوگه کردن داروی لامی وودین و انجام لیوفیلیزاسیون محصول، جهت اثبات صحت کنژوگاسیون و همچنین تایید نتایج HNMR از مواد اولیه ، نانو ذره کیتوزان پگیله شده و همچنین کیتوزان پگیله بارگذاری شده با داروی لامی وودین تست FTIR انجام دادیم. با مطالعه گراف کیتوزان پگیله شده متوجه شدیم که پیک ایجاد شده در ناحیه 3427/5cm-1 مربوط به گروه OH نانو ذره کیتوزان پگیله شده در مقایسه با گراف های نانو ذره کیتوزان و مولکول های PEG شدیداً مهار شده است که این امر به دلیل پوشانده شدن گروه های OH نانو ذره کیتوزان و شرکت کردن گروه های OH مولکول های PEG در پیوند با گروه های NH₂ نانو ذره کیتوزان می باشد، به خاطر همین امر شدت پیک مربوطه کم شده است. این فرایند بزرگترین دلیل پگیلاسیون موفق نانو ذره کیتوزان می باشد.

هم چنین پیک ایجاد شده در ناحیه 2886/8 که مربوط به گروه های CH موجود در نانو ذره کیتوزان و مولکول های PEG می باشد، در اثر پگیلاسیون و اثر هم افزایی گروه های CH شاهد افزایش شدت این پیک در گراف نانو ذره کیتوزان پگیله شده هستیم که این امر نیز دلیلی قاطع برای پگیلاسیون موفق نانو ذره کیتوزان می باشد.

حمایت مالی مشترک انستیتو پاستور ایران (طرح‌های به شماره قرارداد 527 و 619) و وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی انجام یافته است که بدین وسیله از کلیه عوامل فعال در این طرح تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM. Principles of virology. 2009.
2. Anglaret X. Global AIDS epidemic: from epidemiology to universal treatment]. La Revue de médecine interne/fondée par la Société nationale française de médecine interne. 2008;29:S269.
3. Otero M, Calarota SA, Felber B, Laddy D, Pavlakis G, Boyer JD, et al. Resiquimod is a modest adjuvant for HIV-1 gag-based genetic immunization in a mouse model. Vaccine. 2004;22(13):1782-90.
4. Boyer JD, Kim J, Ugen K, Cohen AD, Ahn L, Schumann K, et al. HIV-1 DNA vaccines and chemokines. Vaccine. 1999;17:S53-S64.
5. Ravi Kumar MN. A review of chitin and chitosan applications. Reactive and functional polymers. 2000;46(1):1-27.
6. Zhu S, Qian F, Zhang Y, Tang C, Yin C. Synthesis and characterization of PEG modified N-trimethylaminoethylmethacrylate chitosan nanoparticles. European polymer journal. 2007;43(6):2244-53.
7. Boonsongrit Y, Mueller BW, Mitrejev A. Characterization of drug-chitosan interaction by ¹H NMR, FTIR and isothermal titration calorimetry. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2008;69(1):388-95.
8. Keeler J. Understanding NMR spectroscopy: Wiley. Com; 2011.
9. Griffiths P, De Haseth JA. Fourier transform infrared spectrometry: John Wiley & Sons; 2007.
10. Jain N, Nahar M. PEGylated nanocarriers for systemic delivery. Cancer Nanotechnology: Springer; 2010. p. 221-34.
11. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. Nature medicine. 2003;9(6):727-8.
12. Emerman M, Malim MH. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling

می‌باشد و از آن جایی که نانو ذره کیتوزان تا 30 درصد وزن خود توان حمل دارو را دارد، انتظار ما این بود که تعداد کربن این ترکیب در حدود 4056 عدد باشد که باز با در نظر گرفتن درصد خطای قابل قبول در این تست، نتایج کاملاً نزدیک به انتظارات ما در این تحقیق بوده و نشان دهنده این موضوع می‌باشد که نانو داروی لامی وودین برای اولین بار در این پروژه و در بخش هیاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران سنتز شد. خوش‌بختانه در انجام این تحقیق هیچ محدودیتی وجود نداشت و کل تحقیق با موفقیت به انجام رسید.

نتیجه‌گیری

هدف از انجام این تحقیق ساخت و ارزیابی فیزیکی شیمیایی ترکیب نانو ذره کیتوزان پگیله بار گذاری شده با داروی لامی وودین بود که با توجه به بررسی‌های صورت گرفته و آزمایشات انجام شده ثابت گردید که نانو داروی لامی وودین با کیفیت و کمیت مورد انتظار و برای اولین بار در کشور با موفقیت در این تحقیق سنتز شده است. با توجه به این که نانو داروها ترکیبات بسیار موثرتری نسبت به داروهای مشابه سنتی، از نظر عملکردی می‌باشند، لذا مطالعه و بررسی بیشتر این ترکیبات بر روی سلول‌ها و موجودات آلوده به ویروس و استفاده هم زمان چندین نانو دارو با همدیگر و با سیستم دارو رسانی نوین به جای داروهای سنتی با عملکردهای پایین، از طرفی گام بلندی در جهت ارتقای سیستم درمانی و تولید داروهای موثرتر و از نظر اقتصادی مرقون به صرفه‌تر، خواهد بود و از طرف دیگر استفاده از داروهای با میزان دوز مصرفی و نیز سمیت پایین باعث جلوگیری از ایجاد سوش‌های مقاوم به دارو می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد با عنوان ساخت و ارزیابی فیزیکی شیمیایی نانو ذره کیتوزان پگیله بارگذاری شده با داروی لامی وودین بوده که با

- viral and host cell biology. Science. 1998;280(5371):1880-4.
13. Lau A, Swinbank KM, Ahmed PS, Taylor DL, Jackson SP, Smith GC, et al. Suppression of HIV-1 infection by a small molecule inhibitor of the ATM kinase. Nature cell biology. 2005;7(5):493-500.
14. Baba M. Recent status of HIV-1 gene expression inhibitors. Antiviral research. 2006;71(2):301-6.
15. Perry CM, Faulds D. Lamivudine. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV infection. Drugs. 1997;53(4):657-80.
16. Gunaseelan S, Debrah O, Wan L, Leibowitz MJ, Rabson AB, Stein S, et al. Synthesis of poly (ethylene glycol)-based saquinavir prodrug conjugates and assessment of release and anti-HIV-1 bioactivity using a novel protease inhibition assay. Bioconjugate chemistry. 2004;15(6):1322-33.
17. Nayak UY, Gopal S, Mutalik S, Ranjith AK, Reddy MS, Gupta P, et al. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of Zidovudine. Journal of microencapsulation. 2009;26(3):214-22.
18. Li W, Wu J, Zhan P, Chang Y, Pannecouque C, De Clercq E, et al. Synthesis, drug release and anti-HIV activity of a series of PEGylated zidovudine conjugates. International journal of biological macromolecules. 2012;50(4):974-80.

Archive