Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 16(75): 51- 64

# Production and physicochemical evaluation of nano-sized Lamivudine loaded PEGylated Chitosan

**Hossein Heydari (M.Sc)[1], Mehdi Shafiee Ardestani (Ph.D)[2], Rezvan Zabihollahi (MD)[3], Seyed Mehdi Sadat (Ph.D)[2], Shiva Irani (Ph.D)[4], Seyed Nezameddin Hoseini (Ph.D)[5], Safiyeh Amini (Ph.D)[6], Seyed Davar Siadat (Ph.D)[7], Mohammad Sadegh Khosravi (Ph.D)[8], Alireza Azizi Saraji[9], Pooneh Rahimi (MD)[2], Soheila Hekmat[10], Mohammad Reza Aghasadeghi (Ph.D)[*6]**

1- Department of Biology, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute, Tehran, Iran
3- General Practitioner, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute, Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Tehran, Iran
5- Assistant Professor, Department of Research and Production, Pasteur Institute, Tehran, Iran
6- Associate Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute, Tehran, Iran
7- Associate Professor, Department of Bacteriology, Pasteur Institute, Tehran, Iran
8- Technician, Department of Rabidity, Pasteur Institute, Tehran, Iran
9- Student of Microbiology M.Sc, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute, Tehran, Iran
10- DVM, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute, Tehran, Iran

Received: 24 Jun 2013, Accepted: 19 Jun 2013

**Abstract**

**Background**: Due to the lack of efficient anti-HIV vaccine, anti-HIV pharmaceuticals play an important role in controlling HIV infection. Also significant rise in drug resistance and drug toxicity has caused increased interest in finding new anti-HIV agents. In this study, a nano-sized version of lamivudine based on PEGylated chitosan was synthesized.

**Materials and Methods**: In this research, nanoparticles of chitosan were efficiently PEGylated for increasing their stability in water and then the anti-HIV drug, lamivudine, was loaded on these PEGylated nanoparticles. After purification and lyophilization of new synthesized nanoparticle, the raw materials and final product were sampled and FTIR, HNMR and CHN analyses were done.

**Results**: Results of HNMR spectroscopy showed that chitosan nanoparticle was successfully PEGylated. HNMR data confirmed FTIR results and indicated that lamivudine was conjugated on chitosan nanoparticle. In addition, CHN analysis data also confirmed both HNMR and FTIR data, and demonstrated that a high yield of chitosan nanoparticle PEGylation (approximately 97% ) was done and illustrated a high capacity of lamivudine conjugation on nano-sized PEGylated chitosan (30% $_{w/w}$ chitosan).

**Conclusion**: In this study, lamivudine drug was successfully synthesized, based on PEGylated chitosan nanoparticle.

**Keyword:** anti-HIVagent, Chitosan, Lamivudine, Polyethylene Glycols

*Corresponding Author:
Address: Department of hepatitis and AIDS, Pasteur Institute, Pasteur Ave, Tehran, Iran
Email: mrasadeghi@pasteur.ac.ir

مقاله پژوهشی
مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 16، شماره 6 (شماره پیاپی 75)، شهریور 1392، 64-51

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

**حسین حیدری[1]، مهدی شفیعی اردستانی[2]، رضوان ذبیح الهی[3]، سید مهدی سادات[2]، شیوا ایرانی[4]، سید نظام الدین حسینی[5]، صفیه امینی[6]، سید داور سیادت[7]، محمد صادق خسروی[8]، علیرضا عزیزی سراجی[9]، پونه رحیمی[2]، سهیلا حکمت[10]، محمدرضا آقا صادقی[6*]**

1. کارشناسی ارشد سلولی ومولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران.
2. استادیار، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
3. پزشک، بخش هپاتیت 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 هپاتیت 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 هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
10. مربی، بخش هپاتیت 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 مهمّی در کنترل این بیماری دارند. همچنین ایجاد مقاومت‌های دارویی روز افزون و سمیّت داروهای موجود، علاقه برای انجام پژوهش با هدف یافتن ترکیبات جدید ضد ویروسHIV را افزایش داده است. در این مطالعه نانو داروی لامی وودین بر پایه نانو ذرّه کیتوزان پگیله شده، سنتز شد.

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

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از تست HNMR نشان داد که نانو ذرّه کیتوزان با موفقیّت 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 ذرّه کیتوزان کنژوگه شده است. نتایج آزمون آنالیز CHN هر دو تست بالا را تایید کرد و مشخص نمود که پگیلاسیون نانو ذرّه کیتوزان با راندمان بسیار بالا و در حدود 97 درصد صورت گرفته و داروی لامی وودین در حدود 30 درصد وزن نانو ذرّه کیتوزان بر روی آن کنژوگه شده است.

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه نشان داده شد که نانو داروی لامی وودین بر پایه نانو ذرّه کیتوزان پگیله شده، با موفقیّت 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 هپاتیت و ایدز

Email:mrasadeghi@pasteur.ac.ir

**مقدمه**

ویروس نقص ایمنی انسان (Human immunodeficiency virus- HIV) یک RNA ویروس و از گروه رتروویروس‌ها می‌باشد. این ویروس عامل سندرم نقص ایمنی اکتسابی( Acquired Immunodeficiency Syndrome- AIDS) می‌باشد(1) که یک بیماری عفونی مزمن، با کاهش پیشرونده تعداد سلول‌های $CD4^+$ T است. سلول‌های $CD4^+$، میزبان اصلی این ویروس بوده و با کاهش پیش‌رونده گنجینه این سلول‌ها، عفونت‌های فرصت طلب و تومورها منجر به مرگ میزبان می‌گردند(2). این ویروس پس از اتصال به سلول هدف و ادغام پوشش لیپیدی 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 پرووریروسی رونوشت برداری و سپس پرووریروس را با استفاده از آنزیم اینتگراز(Integrase) به DNA میزبان وارد می‌کند.

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 می‌باشد(3). از یک طرف، داروهای موجود قادر به درمان قطعی این بیماری نیستند و از طرف دیگر، سمیّت داروهای موجود و نیز استفاده طولانی مدت از این داروها سبب ایجاد مقاومت‌های دارویی گشته است(4). این عوامل، باعث شده‌اند تا پژوهشگران به شدت دنبال یافتن داروهای جدید و موثر بر روی ویروس HIV باشند. یکی از این استراتژی‌ها استفاده از دانش نانو تکنولوژی در صنعت داروسازی و سنتز نانو داروهای جدید و موثرتر نسبت به داروهای سنتی می‌باشد.

در تحقیق حاضر، تلاش شده تا نانو ذرّه کیتوزان پگیله بارگذاری شده توسط داروی کاملا سنتتیک لامی وودین به عنوان یک ترکیب جدید ضد ویروس HIV، ساخته شود. داروی لامی وودین آنالوگ نوکلئوتید سیتوزین می‌باشد و با قرار گرفتن در رشته در حال همانند سازی ژنوم ویروس HIV، به دلیل نداشتن OH ´3، در روند تکثیر ویروس وقفه ایجاد کرده و از تکثیر ویروس در سلول‌های میزبان جلوگیری به عمل می‌آورد.

نانو ذرّه کیتوزان مشتق داستیله شده پلی ساکارید کیتین می‌باشد که در زمینه‌های گوناکونی از جمله پزشکی، داروسازی و بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این نانو ذرّه دارای خصوصیات مهم از جمله فراوانی بالا، عدم سمّیت، ایمونوژنیسیته بسیار کم و زیست تخریب می‌باشد(5).

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی، نانو ذرّه کیتوزان با وزن مولکولی 3 کیلو دالتون و میانگین اندازه 108 نانومتر، به صورت پودر از شرکت سیگما و پلی اتیلن گلایکول(Polyethylene glycol- PEG) با نام تجاری Methoxy PEG Maleimide، با وزن مولکولی30 کیلو دالتون از شرکت BOC Sciences خریداری شدند.

مقدار 300 میلی‌گرم از نانو ذرّه کیتوزان با وزن مولکولی3 کیلودالتون در یک بشر حاوی مقدار دلخواه ازحلال DMF (به دلیل نامحلول بودن نانوذرّه کیتوزان در آب)، اضافه شد. نانو ذرّه کیتوزان دارای دو گروه عامل OH و NH2 در ساختمان خود می‌باشد و برای انجام عمل پگیلاسیون و همچنین کونژوگاسیون دارو، از این دو گروه عامل استفاده می‌شود. چون به گروه عامل OH در کنژوگه کردن دارو نیاز بود، بنابر این باید از اتصال مولکول‌های PEG به گروه عامل‌های OH نانو ذرّه کیتوزان جلوگیری شود. از این رو مقدار کمی از ماده $CaCl_2$ به عنوان مستتر کننده گروه عامل OH نانو ذرّه کیتوزان به محلول کیتوزان

اضافه گردید کلیه واکنش‌ها در پکیلاسیون، یک مول بر یک مول صورت گرفت بنابر این 30 میلی‌گرم ازPEG با وزن مولکول30 کیلو دالتون به محلول کیتوزان اضافه شد. لازم به ذکر می‌باشد گروه عاملPEG نیز OH می‌باشد و گروه‌های عامل NH2 آزاد نانو ذرّه 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 ایمید، استفاده می‌شود و ما نیز مقدار کمی از آن را به محلول کیتوزان و PEG اضافه کردیم.

کلیه گروه‌های عامل NH2 نانو ذرّه کیتوزان با گروه عامل OH مولکول‌های PEG وارد واکنش می‌شوند و به دلیل بزرگی و کثرت مولکول‌های نانو ذرّه 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 آلدریچ 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 ذرّه کیتوزان بر روی استیرر در حدود دو ساعت به طول انجامید. بعد از دو ساعت، واکنش متوقف شده و محتوای بشر داخل فالکون 15 میلی‌لیتری در سانتریفیوژی با 15000 دور در دقیقه به مدت 45 دقیقه قرار داده شد تا فرایند خالص سازی انجام گیرد. کیتوزان پگیله شده به دلیل سنگینی تمایل به رسوب شدن دارد لذا پس از سانتریفیوژ محلول‌رویی را دور ریخته و رسوب حاصل لیوفیلیزه گردید.

از نانوذرّه کیتوزان و PEG و نیز از محصول پگیلاسیون لیوفیلیزه شده جهت انجام تست HNMR نمونه‌برداری شد.

نانو ذرّه کیتوزان توان حمل دارو به میزان 30 درصد وزن خود را دارد لذا 100 میلی‌گرم از ماده موثره داروی لامی وودین که از شرکت سیگما خریداری شده بود به حلال حاوی نانو ذرّه کیتوزان پگیله شده، اضافه و به مدت یک ساعت ورتکس گردید تا نانو ذرّه کیتوزان با داروی لامی وودین کنژوگه شود. برای بالا بردن راندمان فرایندکونژوگاسیون به حلال،0/5 میلی‌لیتر 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 ذرّه 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 نانوذرّه کیتوزان، PEG، کیتوزان پگیله شده و نیز کیتوزان پگیله بار گذاری شده توسط داروی لامی وودین، جهت انجام تست‌های FTIR و CHN Analysis نمونه‌برداری شد.

## یافته‌ها

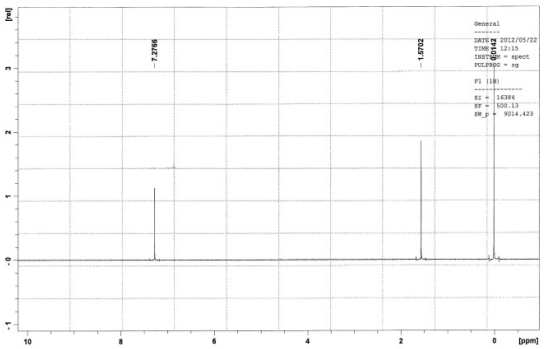
HNMR یا طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای برای شناسایی مواد، تشخیص نوع مولکول‌ها، تعیین جرم مولکولی و فرمول مولکولی به کار می‌رود. تکنیک NMR یک تکنیک جذبی و مولکولی است که در ناحیه فرکانس رادیویی MHz 60-4 قرار دارد. در این تکنیک هسته‌ها مسئول جذب تابش می‌باشند و اختلاف انرژی بین دو حالت هسته اندازه‌گیری 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

بالایی برانگیخته می‌شوند. این هسته‌های برانگیخته، انرژی خود را که برابر اختلاف سطوح انرژی است به صورت تابش نشر می‌کنند و به سطح با انرژی پایین بر می‌گردند(8).

در NMR، نمونه باید به صورت محلول و در عین حال حلال باید فاقد پروتون باشد تا جذبی نداشته باشد. برای NMR از حلال‌های $CDCl_3$(کلروفرم دوتریوم‌دار)، $CD_3OD$(متانول دوتریوم دار)،$D_2O$و$DMSO$(دی متیل سولفوکساید) استفاده می‌شود(8).

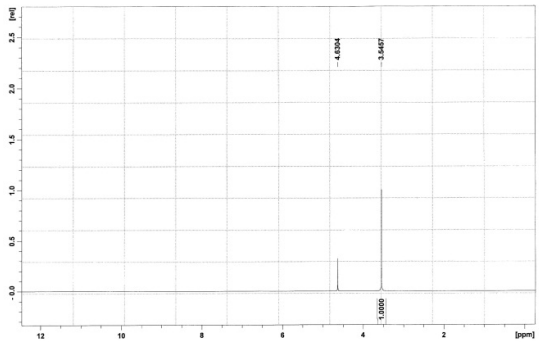
در این تحقیق نیز برای تعیین نوع مولکول و تائید پگیلاسیون از مواد اولیه و کیتوزان پگیله شده در حلال های کلروفرم دوتریوم دار و $D_2O$ توسط دستگاه Bruker گراف‌های HNMR تهیه شد.

در نمودار HNMR نانو ذرّه کیتوزان، در حلال کلروفرم دوتریوم دار، دو پیک شارپ مشاهده می‌شود که در ناحیه 0/0142 و 1/5702 قسمت بر میلیون (ppm) قرار دارند. حضور این پیک‌ها معیار حضور نانو ذرّه کیتوزان می‌باشد(شکل 1).



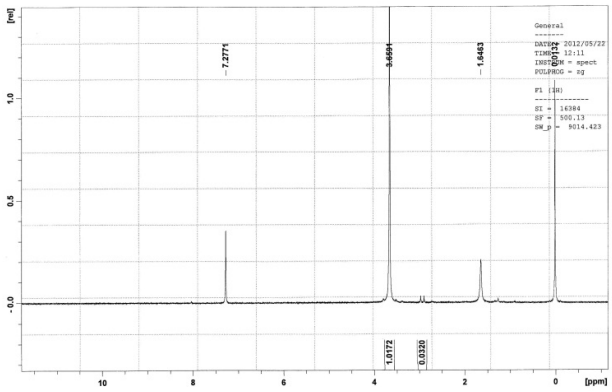
**شکل 1 .گراف HNMR از نانو ذرّه کیتوزان محلول در کلروفرم دوتریوم دار**

در گراف HNMR مولکول‌های PEG در حلال$D_2O$ یک پیک شارپ در ناحیه 3/5457 قسمت بر میلیون مشاهده می‌شود که حضور این پیک معیار حضور PEG می‌باشد(شکل 2).



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

در نمودار HNMR نانو ذره کیتوزان پگیله شده در حلال کلروفرم دوتریوم دار، سه پیک شارپ مشاهده شد که دو عدد از پیک‌ها در نواحی 0/0132 و 1/6483 قسمت بر میلیون قرار داشتند و در مقایسه با پیک‌های به دست آمده در نمودار HNMR نانو ذرّه کیتوزان، مشاهده شد که حضور این پیک‌ها معیار حضور نانو ذرّه کیتوزان می‌باشد و هم‌چنین یک پیک هم در ناحیه 3/6591 قسمت بر میلیون قرار داشت که درمقایسه با پیک حاصله در نمودار HNMR مولکول‌هایPEG مشاهده شد که وجود این پیک معیار حضور PEG در ترکیب می‌باشد(شکل 3).




**شکل 3. گراف HNMR نانو ذرّه کیتوزان پگیله شده در حلال کلروفرم دوتریوم دار**

FTIR یا طیف‌سنجی تبدیل فوریه یکی دیگر از تکنیک اندازه‌گیری می‌باشد که به وسیله آن، بر اساس اندازه‌گیری هم دوستی منبع تابشی، طیف به دست می‌آید. در این تکنیک از اندازه‌گیری‌های قلمروی زمانی و فضایی تابش‌های الکترو مغناطیسی استفاده می‌شود.

عبارت طیف سنجی تبدیل فوریه نشان دهنده آن است که در این روش برای تبدیل داده‌های خام به طیف واقعی تبدیل فوریه لازم است. طیف‌سنجی تبدیل فوریه یک روش تقریبا غیر مستقیم برای به دست آوردن اطلاعاتی مشابه است. این روش به کل نور، شامل طول موج‌های مختلف، در یک زمان اجازه عبور می‌دهد تا شدت کل نور اندازه گیری شود. سپس داده‌های دیگری مبنی بر این که موج شامل چه طول موج‌هایی است به رایانه داده می‌شود. این روند چندین بار تکرار و سپس کل داده‌ها به رایانه داده می‌شود و بعد از آنالیز داده‌ها اطلاعاتی که هر طول موج شامل چه مقدار نور است، به دست می‌آید.

برای اندازه‌گیری دقیق‌تر، بین نور و آشکارساز یک چیدمان از چند آینه قرار می‌دهند که به بعضی از طول موج‌ها اجازه عبور می‌دهد و بقیه را مسدود می‌کند. با تغییر و جابجایی یکی از آینه‌ها به دسته‌ای دیگر از طول موج‌ها اجازه عبور می‌دهند و در نتیجه داده‌های دیگری به دست می‌آید.

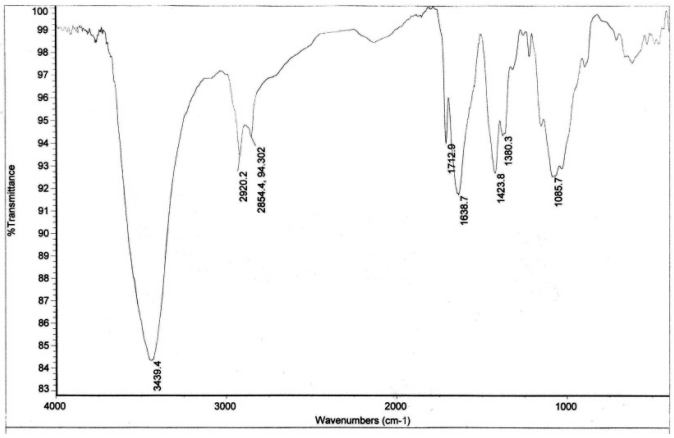
همان طور که قبلا ذکر شد یک آنالیز رایانه‌ای نیاز است تا داده‌های خام (شدت نور برای هر مکان از آینه) به نتایج مورد نیاز (شدت نور در هر طول موج) تبدیل شود. فرایند مورد نیاز یک الگوریتم خیلی متداول به نام تبدیل فوریه است(به همین علت طیف سنجی تبدیل فوریه نامیده می‌شود)(9).

در این تحقیق نیز ما برای تعیین ساختار مولکولی مواد اولیّه، کیتوزان پگیله شده و نانو داروی سنتز شده و همچنین تایید صحت پگیلاسیون و کونژوگاسیون داروی لامی وودین، توسط دستگاه Bruker گراف‌های FTIR را تهیه کردیم.

در اثر بررسی گراف FTIR نانو ذرّه کیتوزان مشخص شد که:

پیک‌های مشاهده شده در نواحی1085/7cm-1، نشان‌دهنده پیوندهای اتری ما بین قندهای گلوکز آمین، پیک 1638/7cm-1 ، نشان‌دهنده گروه NH گلوکز آمین، پیک1712/9cm-1، نشان‌دهنده گروه کربونیل، پیک‌های 2854/4cm-1و 2920/2، نشان‌دهنده گروه‌های CH قندی و پیک3439/4cm-1، نشان‌دهنده گروه‌های OH موجود در ساختمان نانو ذرّه کیتوزان می‌باشند(شکل 4).

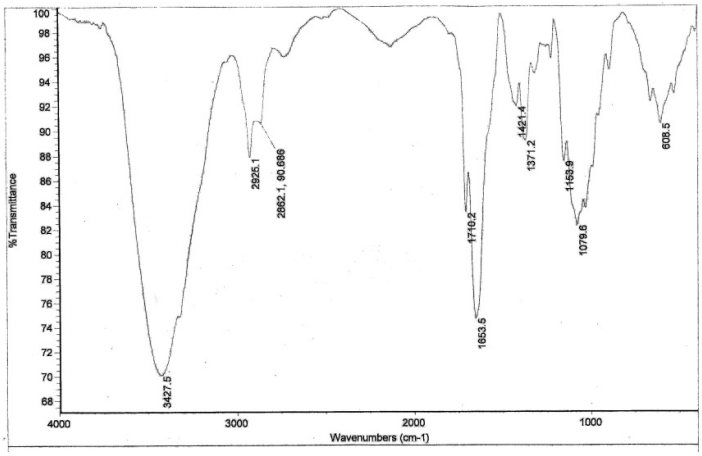
ظاهر شدن پیک مربوط به این دو گروه عامل موجود در نانو ذرّه کیتوزان، تایید کننده وجود قند گلوکز آمین و همچنین تاییدکننده اتصال قندهای گلوکز آمین به همدیگر و ایجاد ساختمان پلیمری است.




**شکل 4. گراف FTIR نانو ذرّه کیتوزان**

هم‌چنین در اثر بررسی گراف FTIR مولکول‌ها PEG مشخص شد که:

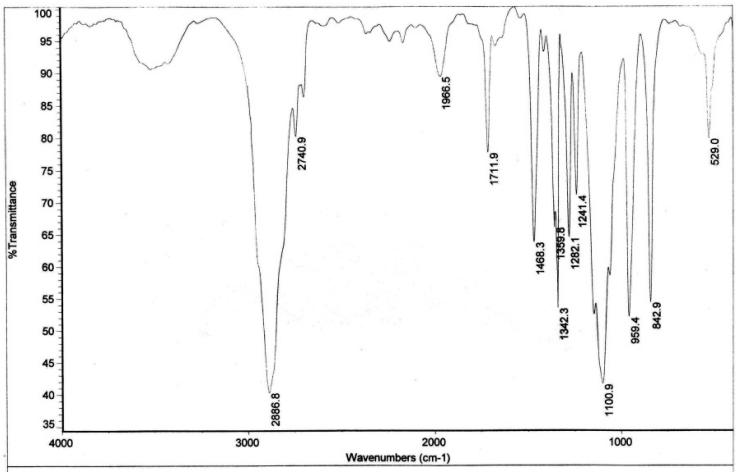
پیک‌های مشاهده شده درنواحی1079/6cm-1، نشان دهنده پیوندهای اتری، پیک1710/2cm-1، نشان‌دهنده گروه‌های کربوکسیلی، پیک3427/5cm-1، نشان‌دهنده گروه‌های OH و پیک‌های2862/1cm-1و 2925/1 نشان‌دهنده گروه CH موجود در ساختمان PEG می‌باشند(شکل 5).




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

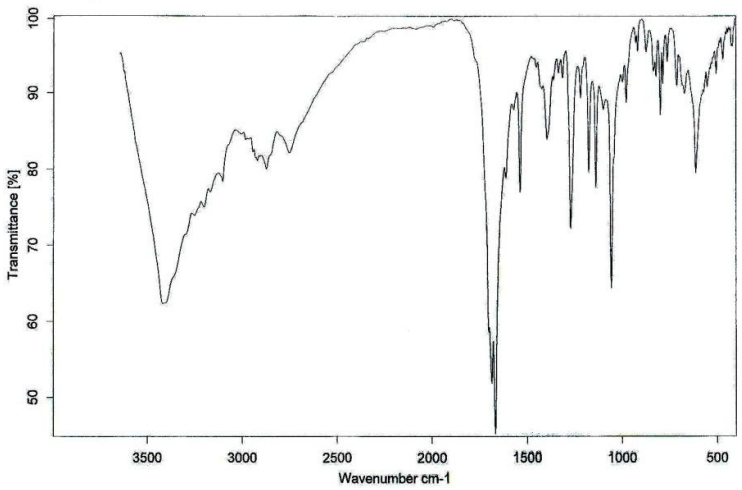
در اثر بررسی گراف FTIR نانو ذرّه کیتوزان پگیله شده مشخص شد:

پیک‌های مشاهده شده درنواحی 2886/8cm-1، نشان دهنده گروه‌های CH قندی و پیک3427/5cm-1، نشان‌دهنده گروه‌های OH موجود در ساختمان نانو ذرّه کیتوزان پگیله شده می‌باشند(شکل 6).




**شکل 6. گراف FTIR نانو ذرّه کیتوزان پگیله شده**

در اثر بررسی گراف FTIR نانو ذرّه کیتوزان پگیله بارگذاری شده با داروی لامی وودین مشخص شد: پیک‌های مشاهده شده درنواحی1710/2 cm-1، نشان‌دهنده گروه کربوکسیلیکی، پیک 2885/8cm-1، نشان‌دهنده گروه‌های CH قندی و پیک3437/5cm-1، نشان‌دهنده گروه‌های OH موجود در ساختمان نانو ذرّه کیتوزان پگیله بار گذاری شده با داروی لامی وودین می‌باشند(شکل 7).




**شکل 7. گراف FTIR نانو ذرّه کیتوزان پگیله شده بارگذاری شده با داروی لامی وودین**

آنالیزCHN، رایج‌ترین شکل تجزیه وتحلیل عناصرمی‌باشد 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 می‌کنند وتله‌های مختلفی جهت جمع آوری محصولات احتراق مانند دی اکسید کربن، آب و اکسید نیتریک قرار می‌دهند و از توده‌های جمع‌آوری شده برای شناسایی عناصر

و محاسبه میزان و درجه خلوص نمونه‌های ناشناخته استفاده می‌کنند.

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 می‌شود. به عنوان مثال درصد حضور نیتروژن از فرمول زیر استفاده می‌شود:

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

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

این فرایند جهت تعیین و تایید خلوص و صحت ترکیب مورد نظر، بسیار مفید می‌باشد. 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 نیتروژن مواد اولیه و کیتوزان پگیله شده و کیتوزان پگیله برگذاری 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 نیتروژن نانو ذرّه کیتوزان با وزن 2/134 میلی‌گرم به قرار زیر به دست آمد.

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

نتایج مربوط به تست آنالیز کربن، هیدروژن و نیتروژن PEG با وزن 2 /092 میلی‌گرم به قرار زیر است.

ZR 7549
کربن ..... % 54/69 .... CR 24831
هیدروژن ..... % 9/55 ..... HR 31665
نیتروژن ..... % 0/30 ..... NR 7480

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

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

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

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

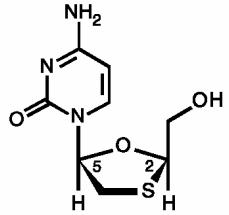
## بحث

پگیلاسیون موفق نانو ذرّه 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 اوّلین بار در کشور در حد آزمایشگاهی، نوید این را می‌دهد که در آینده بتوان با ادامه این روند و انجام تست‌های تکمیلی بر روی سلول‌ها و موجودات آزمایشگاهی آلوده به ویروس HIV گام‌های موثرتری را در جهت ارائه داروهای نوین برای مهار بهتر ویروس HIV برداشت.

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

آنالوگ‌های نوکلئوزیدی قادر به ایجاد اختلال در همانندسازی ویروس HIV و نیز به عنوان داروهای بازدارنده تکثیر ویروس HIV مطرح می‌باشند. داروی لامی وودین یک داروی کاملا سنتتیک و آنالوگ نوکلئوزید سیتیدین می‌باشد که در سال 1988 توسط دکتر برنارد بلاوو

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 7 -5 ساعت و دسترسی بیولوژیکی آن برای بدن در حدود 86 درصد می‌باشد و سپس به سرعت در حدود 70 درصد دارو از طریق سیستم کلیه از بدن پاکسازی می‌شود(15). متاسفانه در کنار مزایایی که مصرف این دارو برای بیماران دارد، عوارض جانبی زیادی را از قبیل واکنش‌های آلرژیک، اختلالات تنفسی، اختلالات روانی و بروز حالت افسردگی، درد عضلانی، درد و آشفتگی 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 معنی‌داری افزایش دهد، میزان سمیّت دارو را به طور چشمگیری کاهش دهد و در آخر عوارض جانبی این دارو را به حداقل برساند لازم و ضروری به نظر می‌رسد.

در این راستا در سال 2004، گوناسلان و همکارانش، پیش داروی Saquinavie (داروی مهارکننده آنزیم پروتئاز ویروسHIV) را با مولکول‌های PEG با وزن مولکولی متفاوت، پگیله کردند و بر روی سلول‌های 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 سمیّت 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 اولیگومرکیتوزان، علاوه بر این که میزان جذب این دارو در اندام‌های بدن تا 10 برابر افزایش نشان داد، نیمه عمر دارو نیز در بدن به میزان معنی‌داری(بیش از دو برابر) افزایش می‌یابد. همچنین میزان آزاد سازی دارو هم 24 - 18ساعت افزایش پیدا کرد(17).

هم‌چنین در سال 2012، لی و همکارانش داوری زاید وودین را با مولکول‌های PEG با وزن‌های مولکولی متفاوت کونژوگه کردند و با روش طیف‌سنجی FTIR و HNMR صحت گنژوگاسیون را اثبات کردند. تاثیر داروی پگیله شده بر روی سلول‌های MT- 4 آلوده به ویروس HIV تیپ وحشی، نشان داد که داروی پگیله شده دارای توانایی بالاتر ضد HIV و میزان سمیّت پایین‌تری 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).

ما نیز در این تحقیق، با توجه به تاثیر داروی لامی وودین در روند جلوگیری از تکثیر و همانندسازی 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 ذرّه کیتوزان پرداختیم. نانو ذرّه کیتوزان مشتق داستیله شده پلی ساکارید کیتین می‌باشد که در زمینه‌های گوناگونی از جمله پزشکی، داروسازی و بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این نانو ذرّه دارای خصوصیات مهم از جمله فراوانی بالا، عدم سمّیت، ایمونوژنیسیته بسیار کم و زیست تخریب می‌باشد. امّا یکی از مشکلات کار با نانو ذرّه کیتوزان نامحلول بودن این ملکول در محیط‌های آبی است(5). برای حل این معضل، نانو ذرّه کیتوزان را با اتصال مولکول‌های پلی اتیلن گلیکول آمین(PEG) پگیله کردیم. پلی اتیلن گلیکول آمین‌ها پلیمرهای طبیعی با گروه‌های انتهایی هیدروکسیلی‌اند که با اتصال ضعیف هیدروژنی به

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

پس از پگیلاسیون نانو ذرّه کیتوزان با مولکول‌های PEG، از مواد اولیّه و کیتوزان پگیله شده تست HNMR انجام دادیم، با مقایسه گراف‌های مواد اولیه با گراف کیتوزان پگیله شده، مشاهده شد که پیک‌های نمونه نانو ذرّه کیتوزان که در نواحیه 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 نواحیه 0/0132، 1/6463 و 3/6591 قسمت بر میلیون ایجاد شدند که این امر نشان دهنده صحت انجام پگیلاسیون نانو ذرّه کیتوزان می‌باشد.

پس از کونژوگه کردن داروی لامی وودین و انجام لیوفیلیزاسیون محصول، جهت اثبات صحت کونژوگاسیون و همچنین تایید نتایج HNMR از مواد اولیّه ، نانو ذرّه 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 ذرّه کیتوزان پگیله شده در مقایسه با گراف‌های نانو ذرّه کیتوزان و مولکول‌های PEG شدیداً مهار شده است که این امر به دلیل پوشانده شدن گروه‌های OH نانو ذرّه کیتوزان و شرکت کردن گروه‌های OH مولکول‌های PEG در پیوند با گروه‌های $NH_2$ نانو ذرّه کیتوزان می‌باشد، به خاطر همین امر شدت پیک مربوطه کم شده است. این فرایند بزرگترین دلیل پگیلاسیون موفق نانو ذرّه کیتوزان می‌باشد.

هم‌چنین پیک ایجاد شده در ناحیه 2886/8که مربوط به گروه‌هایCH موجود در نانو ذرّه کیتوزان و مولکول‌های PEG می‌باشد، در اثر پگیلاسیون و اثر هم افزایی گروه‌های CH شاهد افزایش شدت این پیک در گراف نانو ذرّه کیتوزان پگیله شده هستیم که این امر نیز دلیلی قاطع برای پگیلاسیون موفق نانو ذرّه کیتوزان می‌باشد.

در گراف FTIR مربوط به نانو ذرّه 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 می‌باشد به دلیل کنژوگاسیون و وجود گروه کربوکسیلیکی در داروی لامی وودین افزایش شدت پیک را شاهد بودیم و همچنین تراکم پیک‌ها در انتهای گراف مذکور همگی دلیل محکمی بر کونژوگاسیون موفق نانو ذرّه کیتوزان پگیله بارگذاری شده با داروی لامی وودین می‌باشد.

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

$$\%X = \frac{\text{تعداد اتمهای X در مولکول} \times \text{عدد اتمی} X}{\text{وزن مولکولی کل مولکول}} \times ۱۰۰$$

به عنوان مثال: در مولکول کیتوزان، پس از جاگذاری داده‌ها 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 می‌باشد، لذا نتایج این تست نشان‌دهنده صحت و درستی واکنش پگیلاسیون نانو ذرّه کیتوزان می‌باشد.

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

می‌باشد و از آن جایی که نانو ذرّه 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 کاملا 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 هپاتیت 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 فیزیکوشیمیایی ترکیب نانو ذرّه 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 کیفیّت و کمیّت مورد انتظار و برای اولین بار در کشور با موفقیّت 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 داروهایی با میزان دوز مصرفی و نیز سمیّت 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 فیزیکوشیمیایی نانو ذرّه کیتوزان پگیله بارگذاری شده با داروی لامی وودین بوده که با 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 edicine interne/fondée par la Société nationale francaise de edicine 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, Mitrevej A. Characterization of drug–chitosan interaction by 1 H 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

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.