

Nanotıp 4. Ders

Kitosan Nanopartikülleri

Doç. Dr. Emrah Şefik Abamor

Kitosan

- Kitosan, β - (1,4)-bağlı N-asetil-glukozamin birimlerinden oluşan doğrusal bir homopolimerdir.
- Kabukluların ve böcek dış iskeletlerinin yanı sıra bazı bakteri ve mantar hücre duvarlarında yaygın olarak bulunan glikoz bazlı dallanmamış bir polisakkarit olan kitinin temel deasetilasyonundan elde edilen kısmen deasetillenmiş bir polimerdir.

Crabs
Shrimps

Chemical extraction



Biological extraction

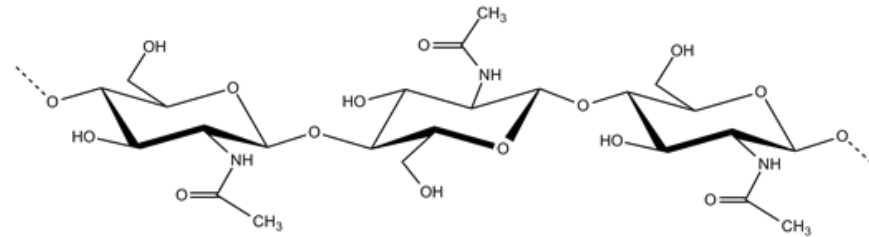
Dilute aqueous HCL solution

Decalcification

Deproteination

Proteases producing bacteria

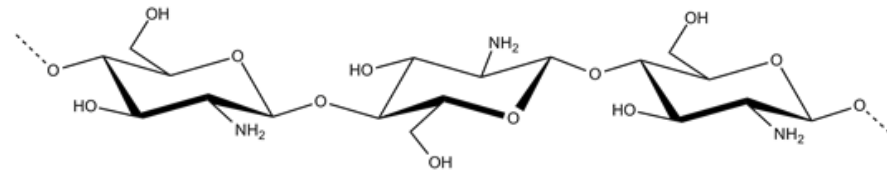
Decolorization



Deacetylation

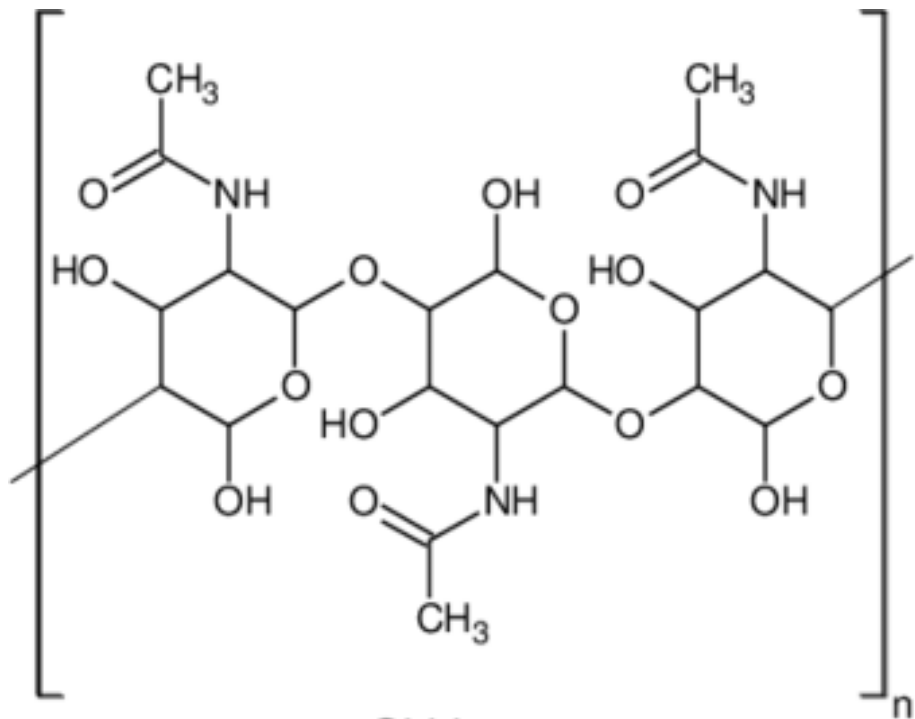
Hot concentrated
NaOH solution
(40-50%)

Chitin deacetylase



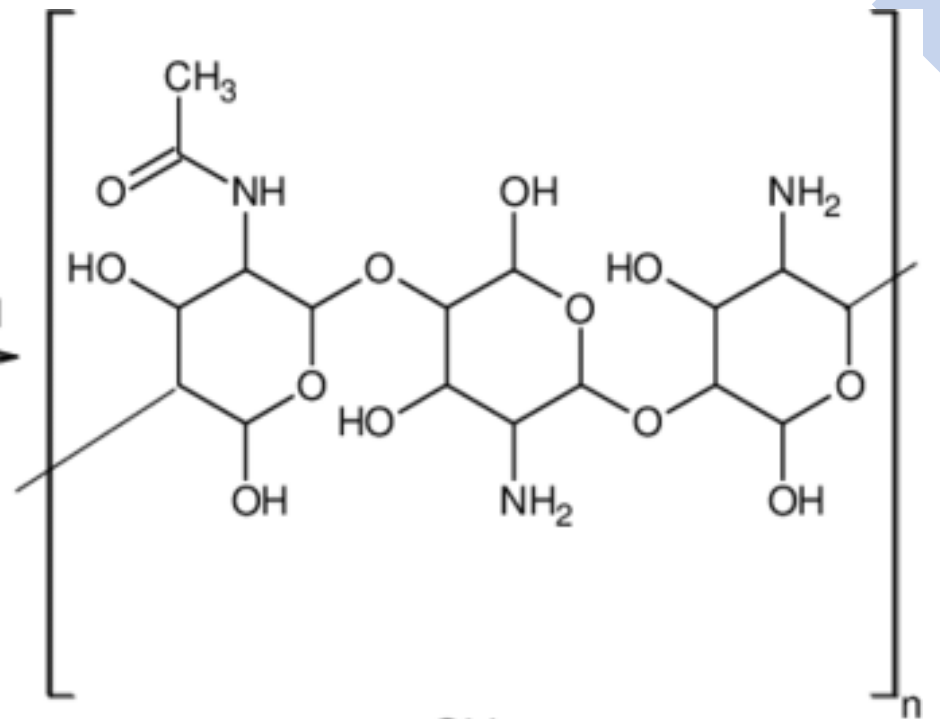
Chitin

Chitosan



Chitin

Concentrated NaOH



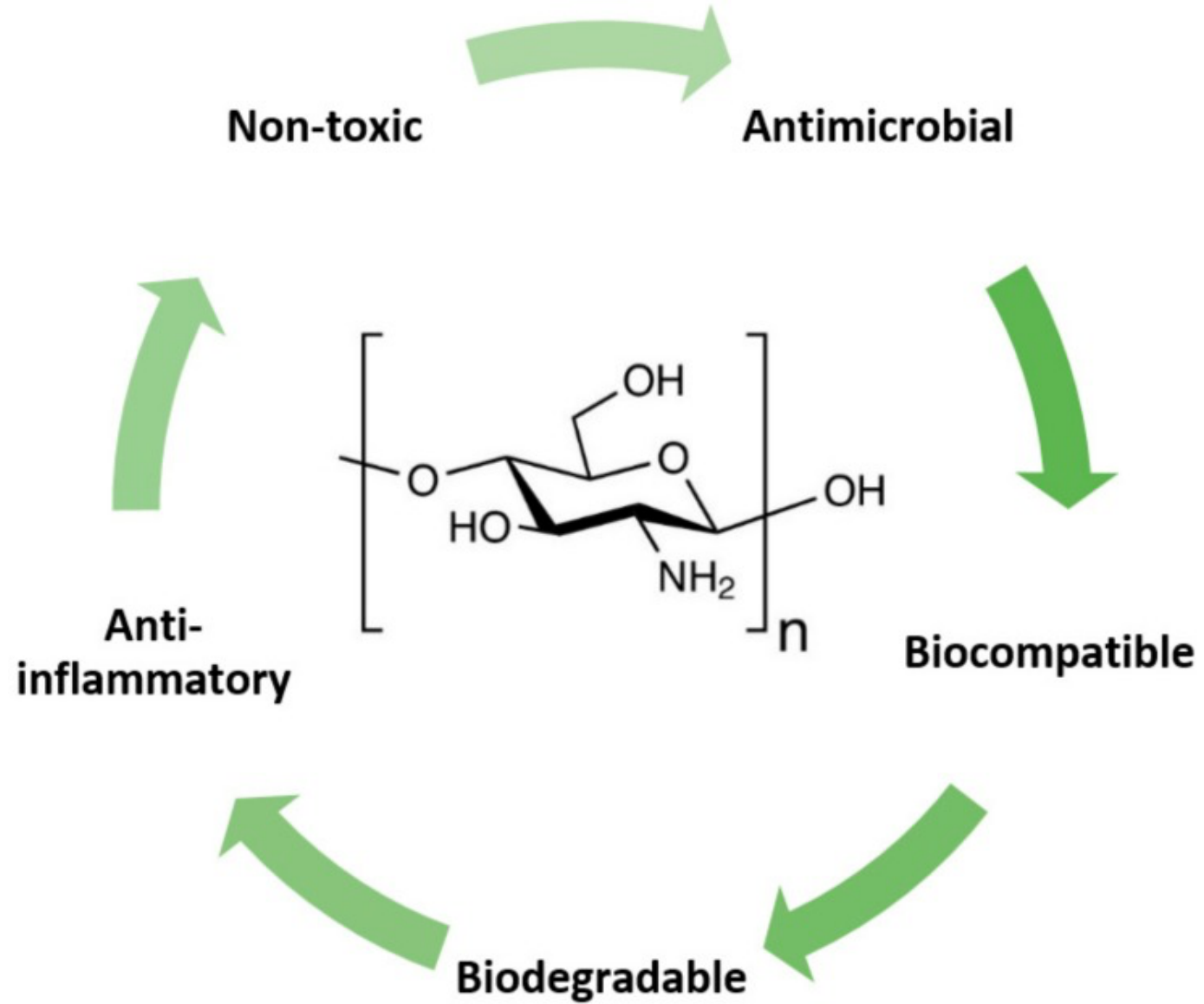
Chitosan

Kitosan

- Kitinden kitosan üretilmesi iki şekilde olabilir:
 1. Alkali ortamda deasetilasyon
 2. Kitin deasetilaz tarafından enzimatik hidroliz
- Kitin selülozun ardından doğada en çok bulunan yenilenebilir biyomalzemedir

Kitosan

- Kitosan pek çok önemli biyolojik özellik gösterebilen bir polimerdir
- Non-toksik
- Bozunabilir
- Biyouyumlu
- Muko-adeziv
- İmmünostimülan
- Antitümoral ve antimikrobial etkinlik



Biyobozunurluk

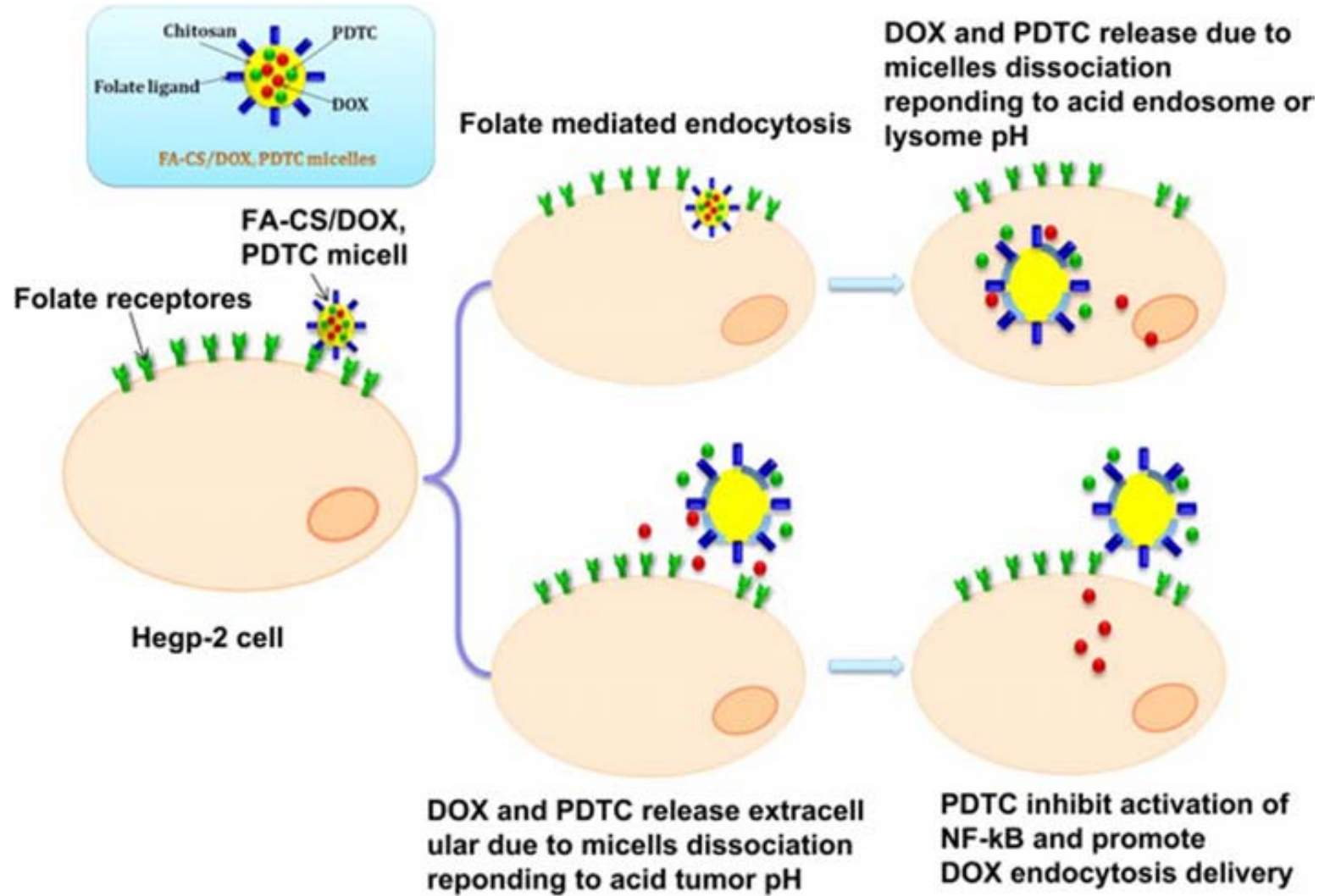
- Kitosanın biyobozunur yapısı yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarla kanıtlanmıştır.
- Bir polimer olan kitosan vücut içerisinde enzimatik reaksiyonlarla bir çok monomerine ayrılabilir.
- Kitosan polimerinin ve monomerlerin herhangi bir yan etkiye neden olmadan vücut hücreleriyle etkileşebildikleri gösterilmiştir.

Antimikrobiyal etkinlik

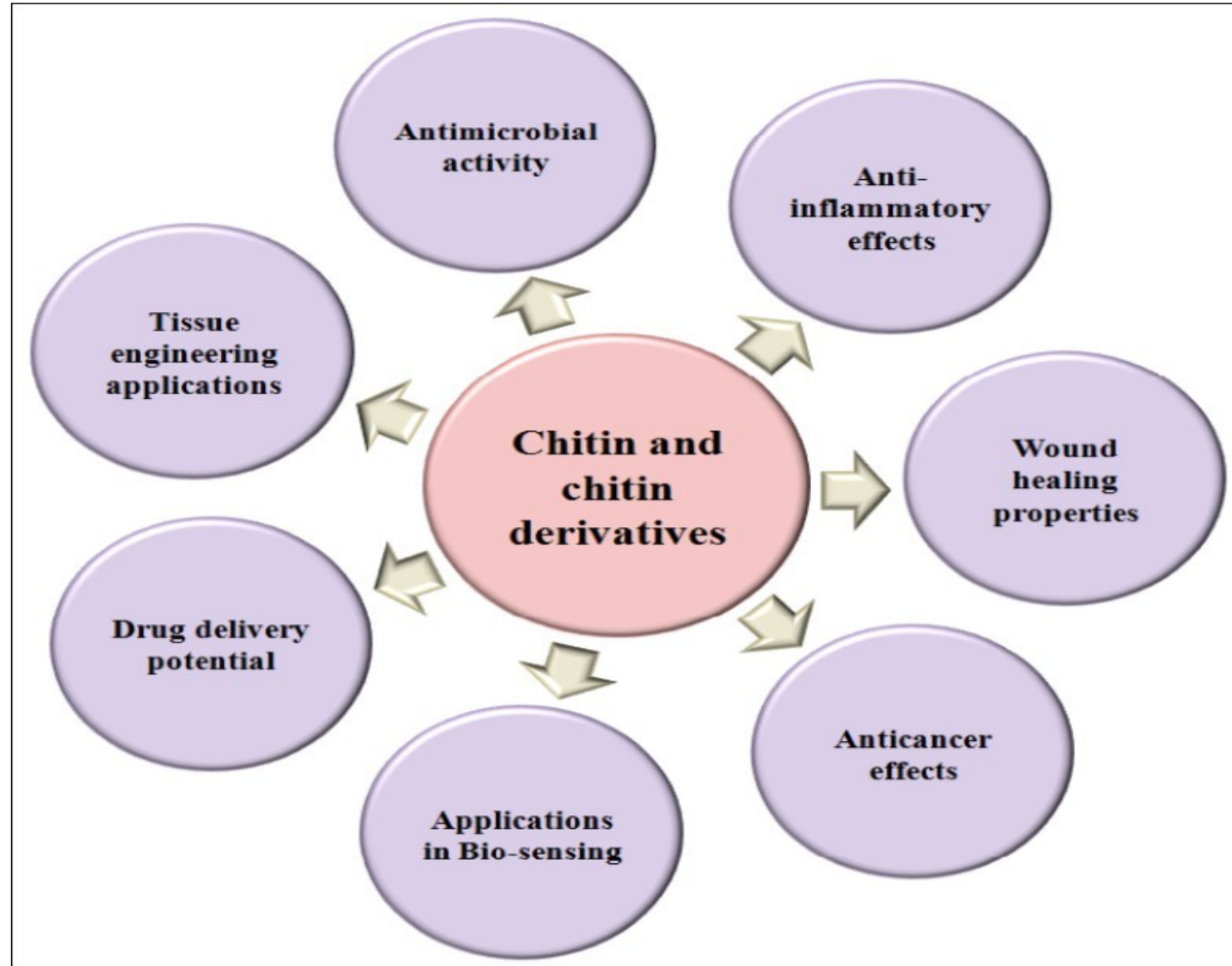
- Kitosan vücutta kolesterol absorpsiyonunu azaltarak ve zincir oksidasyon proseslerini bozup serbest radikallerin üretilmesine neden olarak antimikrobiyal özellik gösterir
- Kitosan ve kitosan türevi biyomalzemelerin antimikrobiyal ve antikanser etkileri pek çok faktöre bağlı olarak değişebilir:
 - **Deasetilasyon derecesi**
 - **Moleküler ağırlık**
 - **pH**
 - **Metal katyonların varlığı**
 - **Mikroorganizma türü**

Antikanser Etkinlik

- Kitosan temelli nanopartiküller apoptoz yoluyla tümör hücresi gelişimini inhibe edebilir
- Kitosan temelli nanopartiküller yüksek seviyede artmış geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisi gösterir
- 100–200 nm boyutundaki nanopartiküller reseptör aracılı **endositoz, yoluyla,**
- Daha büyük partiküller **fagositoz yoluyla** tümör hücrelerine giriş yapar



Drug release and combination with cells scheme



Kitosanın Antimikrobiyal Etki Mekanizmaları

- En çok kabul gören hipotez glukozaminin pozitif yüklü amin gruplarının bakterinin negatif yüklü yüzeyi etkileşime girmesi,
- İntraselüler bileşenlerin hücre dışına çıkması ile hücre ölümünün gerçekleşmesidir.

Kitosanın Antimikrobiyal Etki Mekanizmaları

- Bir diğer ihtimal kitosan nanopartiküllerinin DNA'ya bağlanıp mRNA sentezini inhibe etmesidir.
- *Echerichia coli* ile yapılan bir çalışmada, konfokal mikroskop altında bakteri içerisinde kito-oligomerlerin oluştuğu ve bunun DNA transkripsiyonunu engellediği gösterilmiştir

Kitosanın Antimikrobiyal Etki Mekanizmaları

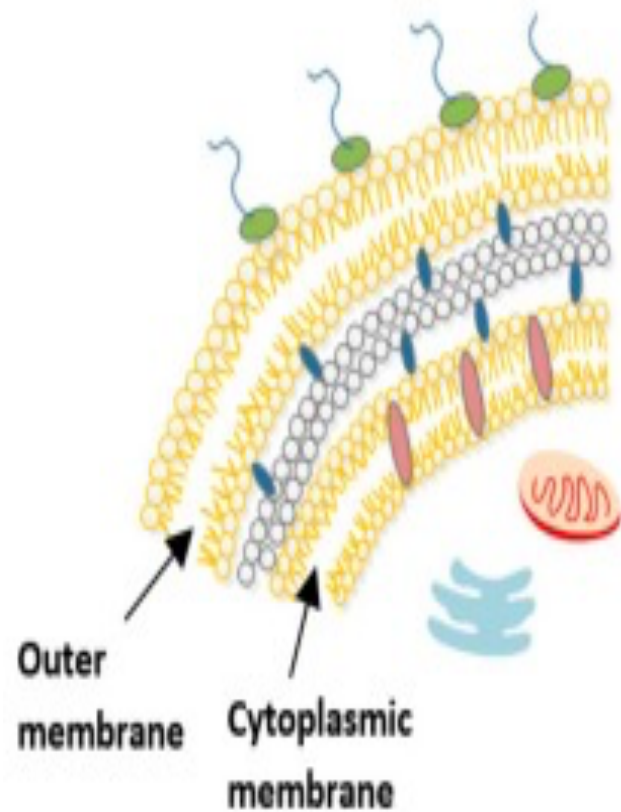
- Bir diğer alternatif; kitosan nanopartiküllerinin bakteriler için hayati öneme sahip metallere tutunarak mikrobiyal büyümeyi durdurma olasılığıdır.
- Kitosan çok güçlü bir metal bağlayıcıdır. Özellikle amino grupları metallerle etkileşime girer
- Amino grupların Ca^{2+} ve Mg^{2+} gibi divalent iyonlarla bağlantı kurması mikroorganizmanın hücre duvarı sentezini engellerken toksinlerin oluşmasına da neden olarak hücre büyümesini durdurur.



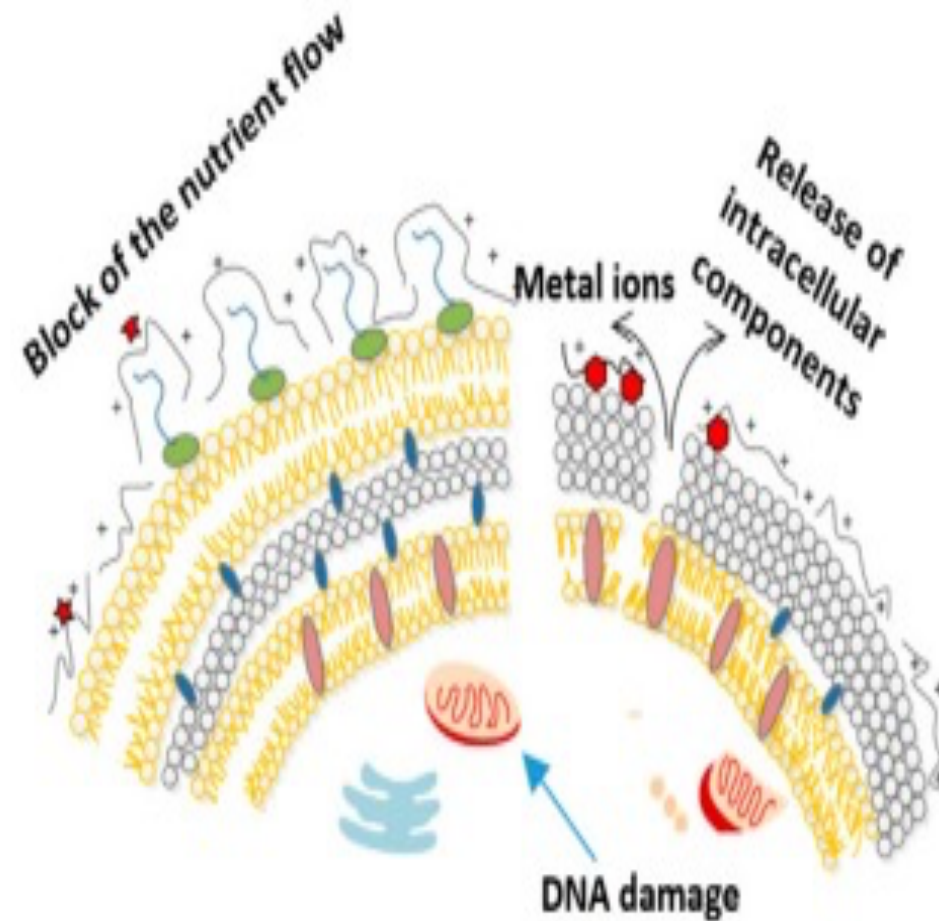
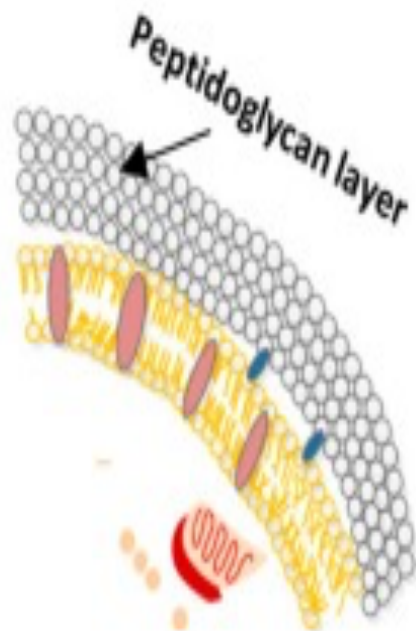
Kitosanın Antimikrobiyal Etki Mekanizmaları

- Dördüncü hipotez ise kitosanın **oksijen ve besinlerin hücre içerisine girmesini engelleyici bir ajan olarak görev yapmasıdır.**
 - Besin ve oksijenden yararlanamayacak bakterilerde hücre ölümü gözlenir
- 

Gram negative



Gram positive



Recent studies of various hypotheses on the mechanism of chitosan antimicrobial action.

Antimicrobial Mechanism	Findings
Polycationic nature of chitosan	• The interaction between positively-charged chitosan molecules and negatively charged microbial cell membranes leads to leakage of intracellular constituents [16,17] • The binding neutralizes and reverses the surface charge of bacteria • Cationic groups increase <i>E. coli</i> membrane permeability and membrane lysis [18]
Binding to bacterial DNA (inhibition of mRNA)	• Binding to bacterial DNA leads to inhibition of mRNA and consequently protein synthesis • The low molecular weight (≤ 50 kDa) chitosan and nano-sized particles can penetrate the bacteria cell wall and inhibit DNA transcription [14] • Binding of chitosan to bacterial DNA was commonly investigated for gene delivery [19] • The mechanism of DNA binding ability and its antimicrobial activity are not yet fully understood
Chelation agent (nutrients and essential metals)	• Chitosan selectively binds essential metals and thereby inhibits microbial growth and the production of toxins [20] • Higher inhibitory efficiency at high pH where positive ions are bonded to chitosan • Activates defense processes in host tissue [17] • Acts as a water-binding agent that inhibits several enzymes [21]

Antimikrobiyal Etkinliği Etkileyen Faktörler

pH

- Ortamın pH'sı kitosan ve kitosan türevlerinin antimikrobiyal aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir.
- Kitosan antimikrobiyal etkinliğini sadece asidik pH ($\text{pH} \geq 6.5$) koşullarında gösterebilir
- Çünkü daha yüksek pH'larda düşük çözünürlüğe sahiptir



Antimikrobiyal Etkinliği Etkileyen Faktörler

- Bunun nedeninin amino grupların çoğunun 7 civarı pH'da yüksüz hale gelmesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir.
- Bunun engellenmesi ve çözünürlüğün arttırılması için kitosanlar sistematik olarak modifiye edilerek kitosan türevleri oluşturulur
- Kitosan monomerleri yüzeylerinde üç reaktif fonksiyonel grup bulundurmaktadır.
- Bunlar farklı kimyasal gruplarla reaksiyona girerek kitosan türevlerini oluşturabilir

Yapısal Faktörler

- **Düşük moleküler ağırlık**
- **Boyut**
- **Konformasyon** kitosanın antimikrobiyal etkinliğini değiştirebilen yapısal faktörlerdir.
- **Küçük zincirlerin hareketliliği, iyonik etkileşimleri daha fazla olduğundan, büyük moleküllere kıyasla membran yüzeylerine daha etkili bir bağlanma gerçekleştirirler**

Yapısal Faktörler

- Yapılan bir çalışmada 470 kDa'dan daha küçük moleküler ağırlığa sahip bileşenlerin gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde daha fazla antibakteriyal etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir.
- Bir başka çalışmada de-asetilasyon oranı %81 olan kitosanın %62 olan kitosana göre antibakteriyal etkinliğinin daha yüksek olduğu bulunmuştur.
- Bunun nedeni deasetilasyon oranı yükseldikçe yüzeyde daha fazla pozitif yüklü amino grubunun oluşmasının antibakteriyal etkinliği tetiklemesi olabilir.

Kitosan Türevleri

- Kitosan türevleri farklı kimyasal modifikasyonlarla oluşturulabilir:
- Açılleme
- Alkilleme
- Sülfatlama
- Hidroksilleme
- Kuaternizasyon
- Esterifikasyon
- Graft kopolimerizasyon



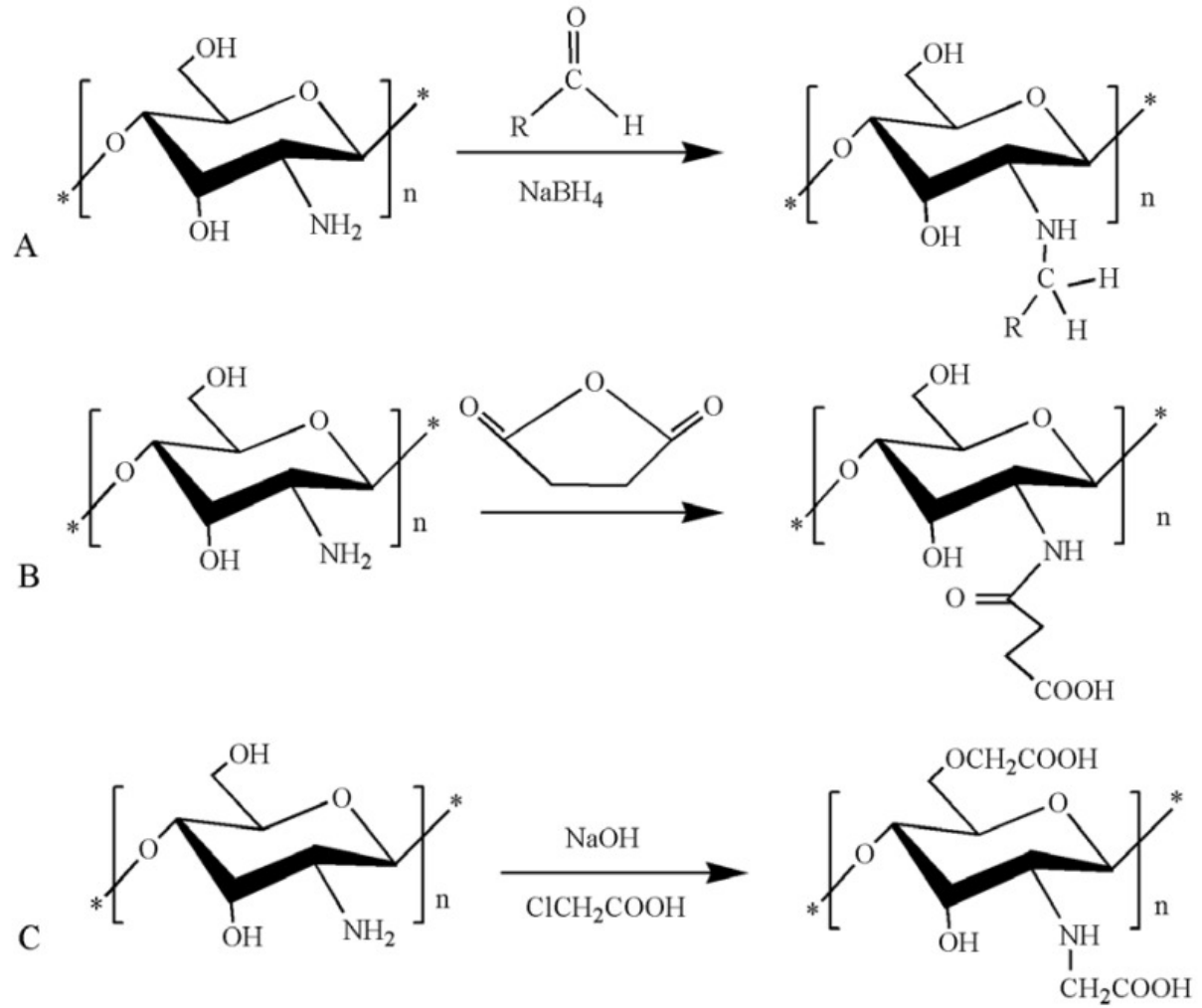
Mukoadeziflik

- Kitosanın yüzeylere yapışma kabiliyeti en önemli özelliklerinden birisidir.
- Bu özellik hem moleküllerin mukozal yol kullanılarak taşınmasına hem de mukus tabakasına tutunamayan moleküllerin absorblanabilmesine katkıda bulunur.
- Örneğin kitosan birarada bulunduğu polimerlerin yapışkanlığını arttırarak sıkı epitelyal bağlantıların açılmasına katkıda bulunur.

Kan uyumluluğu

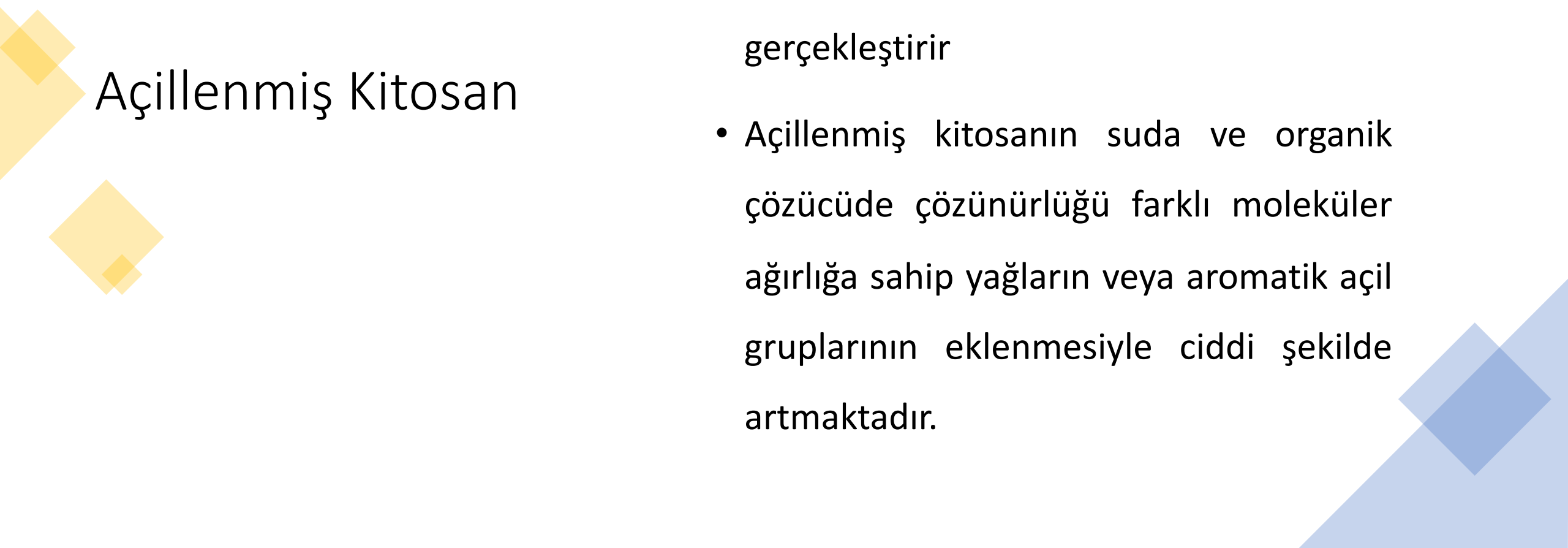
- Koagülasyon çalışmalarında kitosan kullanılmaktadır.
- Kan plateletleri ile kitosanın amino gruplarının etkileşimi yara iyileşme sürecini arttırabilir.
- Bir yara örtüsü olarak kitosanın pek çok önemli özelliği bulunmaktadır:
- **Kemo-atraksiyon**
- **Makrofaj ve nötrofil aktivasyonu**
- **Granülasyon dokusunun oluşumu**
- **Re-epitelizasyon**
- **Küçük skar oluşumu**
- **Antibakteriyal etkinlik bunlardan bazılarıdır.**

Kitosan Modifikasyonları



Alkillenmiş Kitosan

- Kitosanın alkillenmesi amino grupları üzerinden olur ve *N*-alkillenmiş kitosan türevleri oluşur
- Hemoliz ve toksisite çalışmaları *N*-alkillenmiş kitosan türevlerinin iyi bir biyouyumluluk gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.
- Modifiye olmayan kitosana göre daha fazla hemostaz gösterirler.
- Alkil gruplarının eklenmesiyle **kitosan molekülleri arasındaki hidrojen bağlarının sayısı azalır ve suda çözünürlük artar**



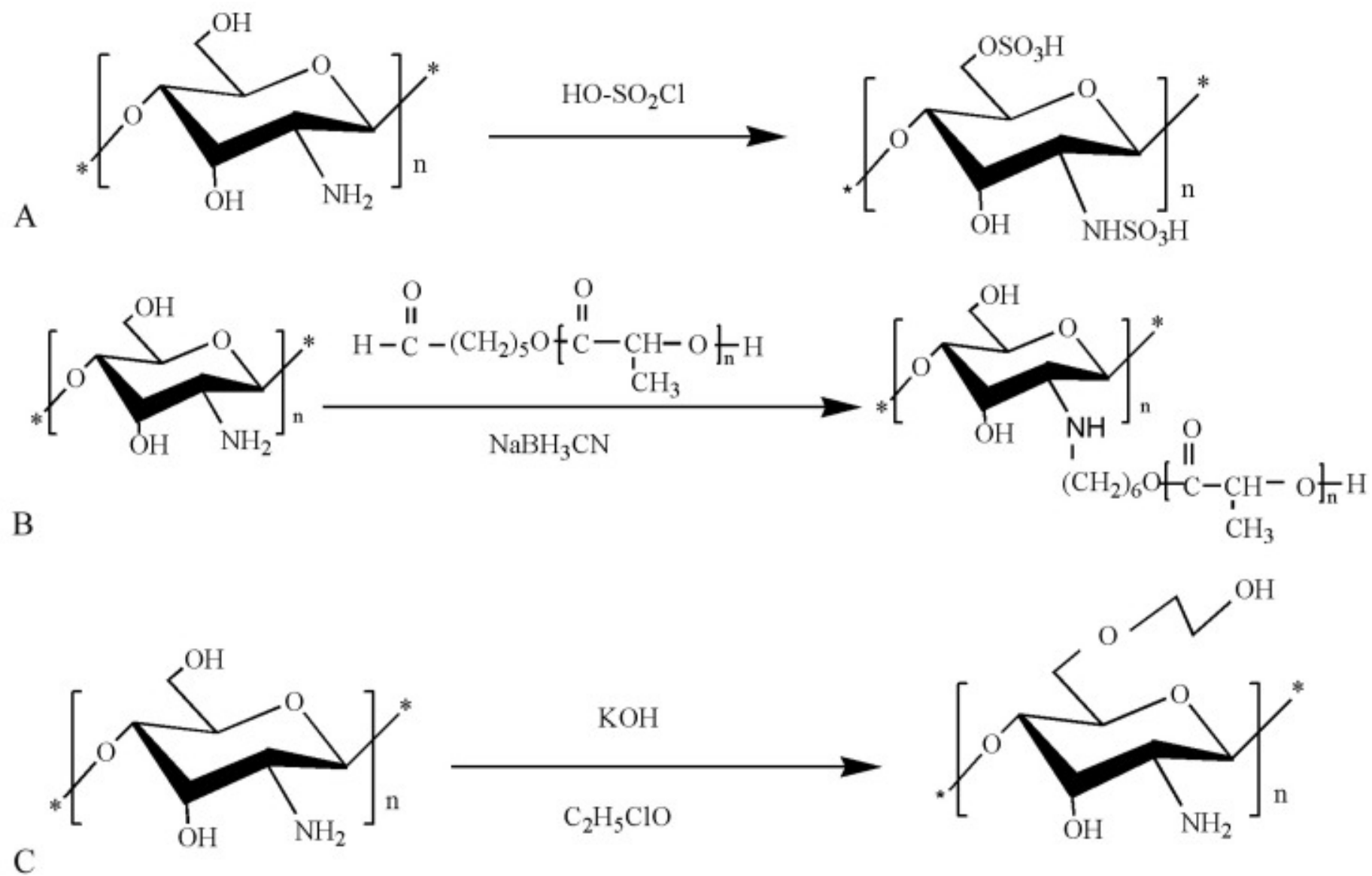
Açillenmiş Kitosan

- -NH_2 and -OH grupları organik asit anhidritlerle veya organik asit kloritlerle ester veya amid reaksiyonları gerçekleştirir
- Açillenmiş kitosanın suda ve organik çözücüde çözünürlüğü farklı moleküler ağırlığa sahip yağların veya aromatik açıl gruplarının eklenmesiyle ciddi şekilde artmaktadır.



Karboksillenmiş Kitosan

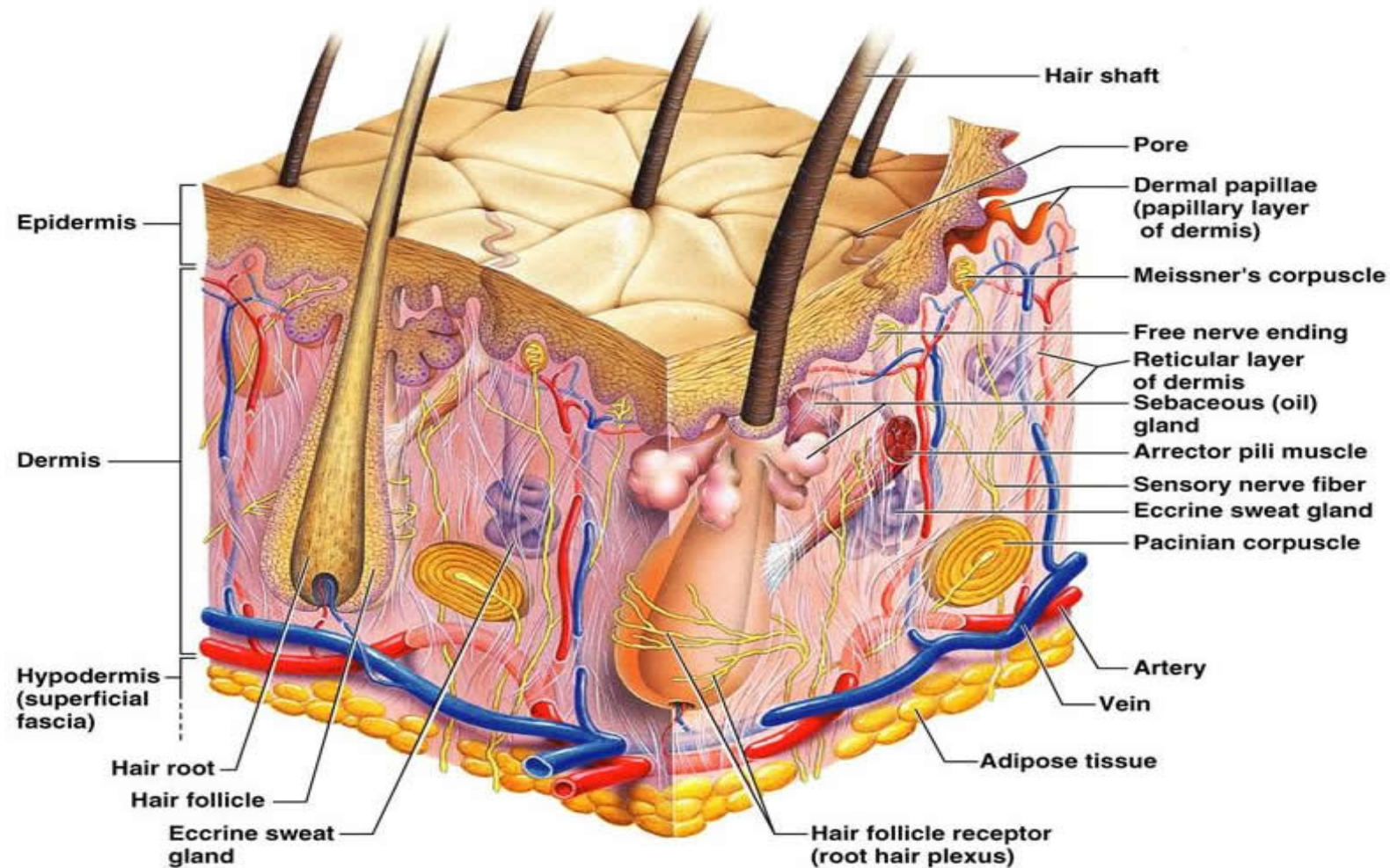
- Kitosan farklı koşullarda monokloroasetik asid ile etkileşerek karboksimetil kitosan oluşturabilir.
 - Karboksimetil kitosanın sudaki çözünürlüğü karboksilasyon işleminin derecesi ile alakalıdır.
 - Karboksillenme yalnızca kitosanın çözünürlüğünü arttırmaz aynı zamanda $-NH_2$ ve $-COOH$ grupları içeren amfifilik kitosan türevlerini de oluşturur.
 - Bu türevler film oluşturma, nem absorpsiyonu, antibakteriyal, antioksidan ve pek çok biyolojik özellik gösterebilirler
- 



Yara Örtüleri

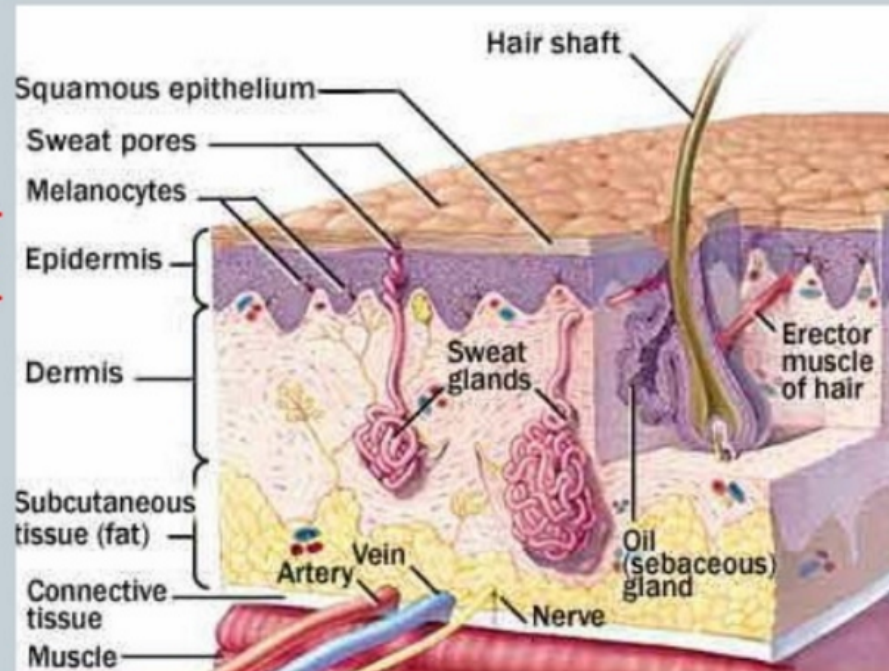
- Yara iyileşmesi hemostaz, enflamasyon, göç, proliferasyon ve yeniden şekillenmeyi içeren oldukça karışık bir işlemler bütünüdür.
- Antimikrobiyal yara örtülerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir
- Kitosan hem kendisi antimikrobiyal etkinlik gösterirken hem de antimikrobiyal bileşenleri yara bölgesine taşıyabilir.

The Skin Layers



Wound classification according to depth of the wound

- Superficial
- Partial thickness
- Full thickness
- Deep wound



+ bone, opened cavities, organs...etc.

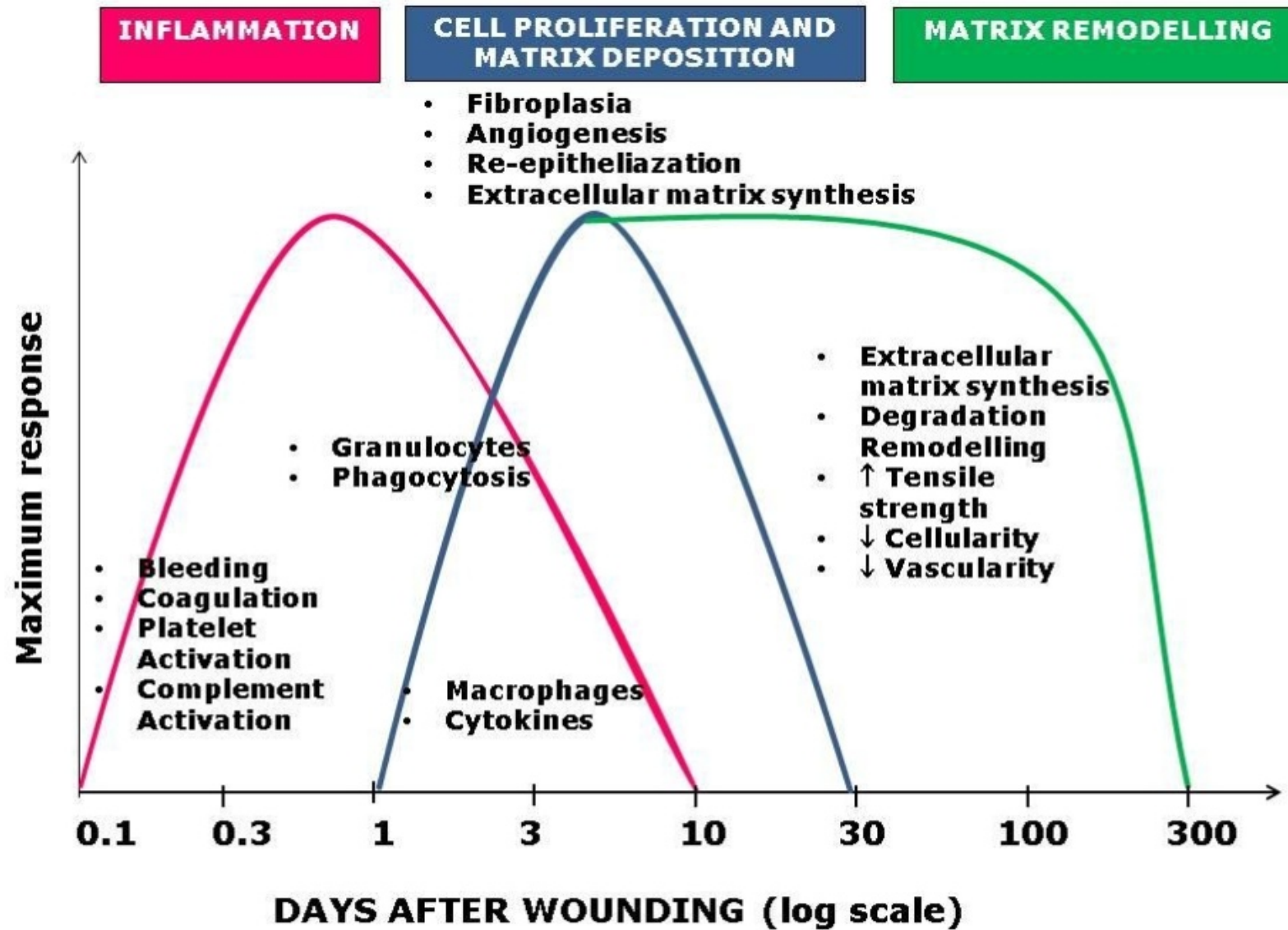
Wound classification according to healing duration



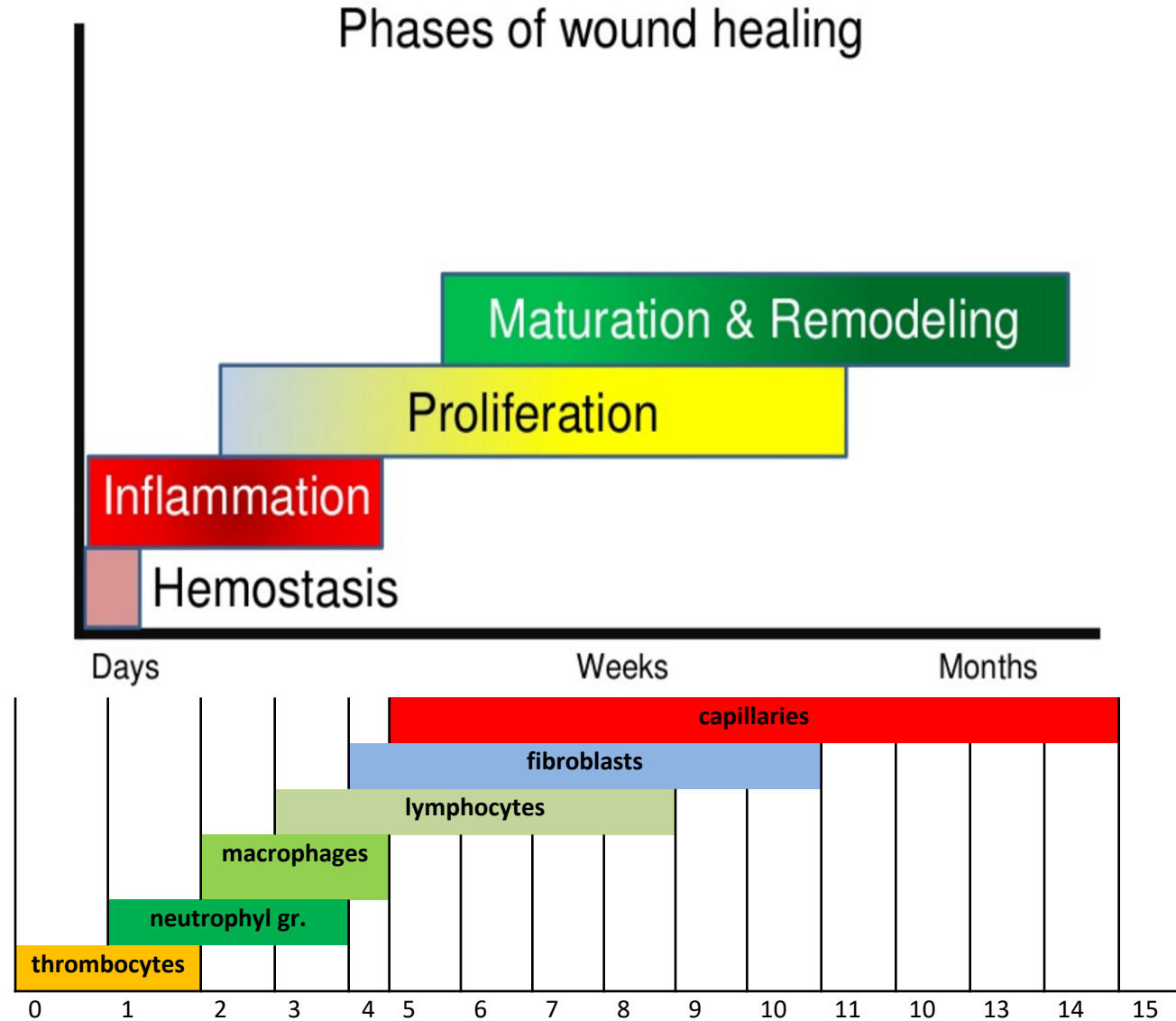
ACUTE Recent wound which has yet to progress through the sequential stages of healing

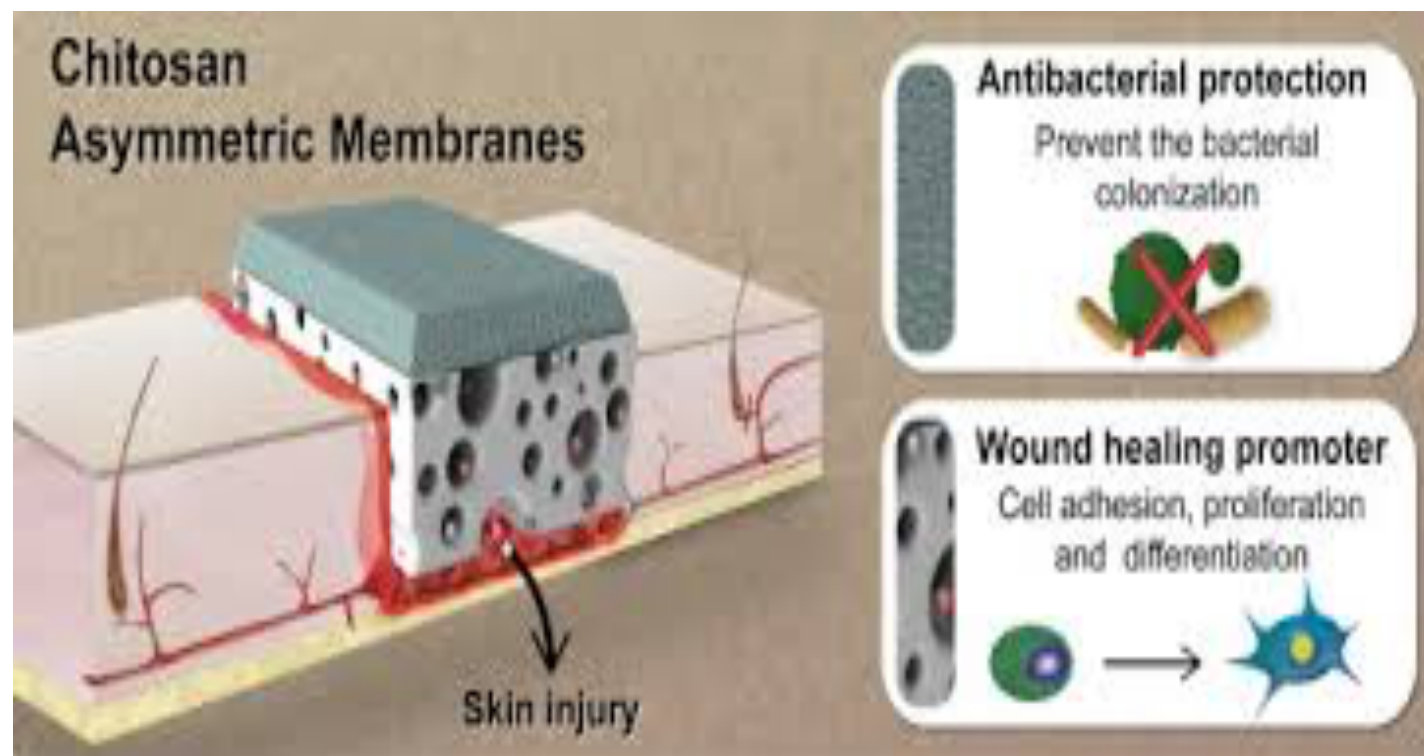
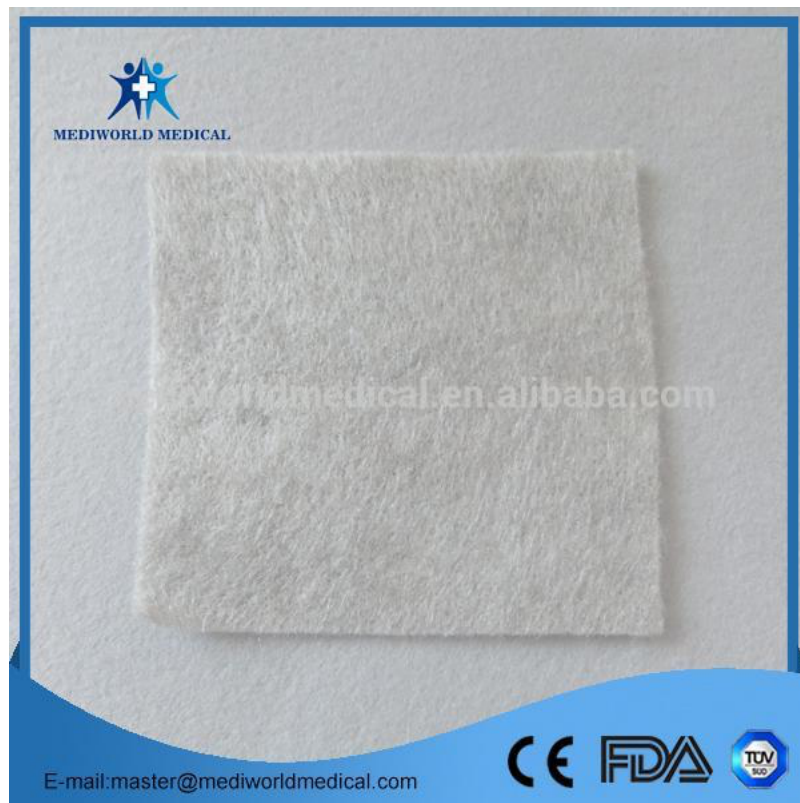


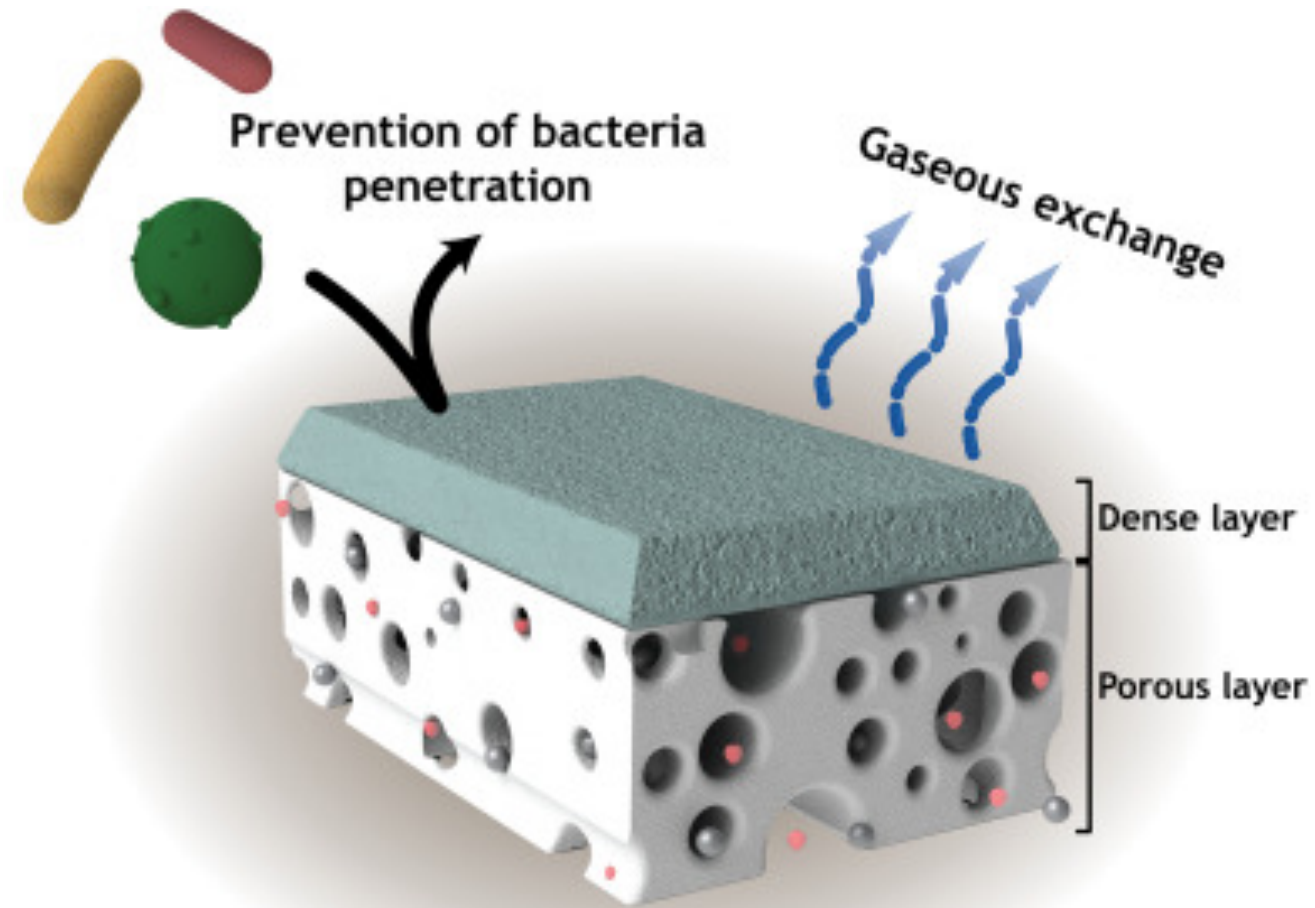
CHRONIC Wound that has arrested in one of the wound healing stages usually inflammatory phase



Normal sequence of wound healing







 **Antibacterial agents**
Silver
Natural products
Antibiotics

 **Bioactive Agents**
Growth factors
Anti-inflammatory molecules

Kitosan Yara Örtüleri

- Kitosan modifiye edilerek asimetrik porlu skaffoldları, hidrojelleri, membranları ve filmleri oluşturabilir.
- Bu tür modifikasyonlar toksik değildir.
- Hidrojeller yapısında yüksek kapasite ile su tutar. Bu da yaralı bölgenin nemlenmesine yardımcı olur.



Kitosan Yara Örtüleri

- Hidrojellerin şişme özellikleri biyomedikal uygulamalar öncesinde detaylı olarak incelenmelidir.
- En büyük dezavantajları; düşük mekanik özellikleridir.
- İkinci bir örtü ile takviye edilmeleri gerekebilir.

Kitosan Yara Örtüleri

- Kitosan süngerleri çok fazla porlu yapı içerir ve şişme özellikleri vardır.
- Yaralı doku için önemli bir matriks görevi görebilir.
- Tek dezavantajları deri dokusunda ıslanarak yumuşama ihtimalleridir.
- Bu nedenle üçüncü derece yaralanmalar için kullanılmazlar.



Kitosan Yara Örtüleri

- Kitosan Filmler bakteri geçişine karşı dirençli olmalı ve terapötik etkinlik göstermelidirler
 - Bu filmler yara bölgesine yapışır ve eksudanın birikmesine neden olabilirler.
- 

Kitosan Yara Örtüleri

- Kitosan membranlar yara örtüsü olarak en uygun bileşenlerdendir.
- 3 boyutlu matriks yapısını harika bir biçimde taklit edebilirler
- Yüksek yüzey alanı/hacim oranları besin akışını ve hücre proliferasyonunu sağlar

Kitosan Yara Örtüleri

- Kitosan bazlı antimikrobiyal yara örtüleri antibiyotiklerle (ciprofloxacin, gentamicin, sulfadiazine or tetracycline), metalik antimikrobiyal partiküllerle (nAg, nCu, nZnO and nTiO₂) veya doğal bitki bileşenleri ve ekstraktlarla (*Juglana regia*, *Salix alba* yaprakları, honey, *Aloe vera* vb) modifiye edilebilir

Recent chitosan-based wound dressings prepared either as native chitosan or modified and formulated with other antimicrobial substances.

	Type	Findings	Tested Microorganisms	Ref.
Native Chitosan-Based Biomaterials				
Chitosan/PVA/starch	Membrane	Excellent cell growth and proliferation	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	[84]
Chitosan/ β -cyclodextrin polymer	Sponge	Controlled swelling and drug delivery	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	[85]
Chitosan	Hydrogel	Superb antifungal and antimicrobial effects	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Fusarium solani</i>	[86]
Chitosan	Membrane	Epithelialization rate was increased	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	[58]
Chitosan/PVP/nano-cellulose	Film	<i>In vitro</i> wound dressing application was significant	<i>Staphylococcus aureus</i>	[87]
Chitosan-distamycin and vancomycin	Films	80% degrees of deacetylation were optimal for eluting antibiotics	<i>Staphylococcus aureus</i>	[88]

Kitosan Bazlı İlaç Taşıma Sistemleri

- Toksik değil
- Biyouyumlu
- Biyobozunur
- Biyoaktif
- Mukoadhezif



Kitosan Bazlı İlaç Taşıma Sistemleri

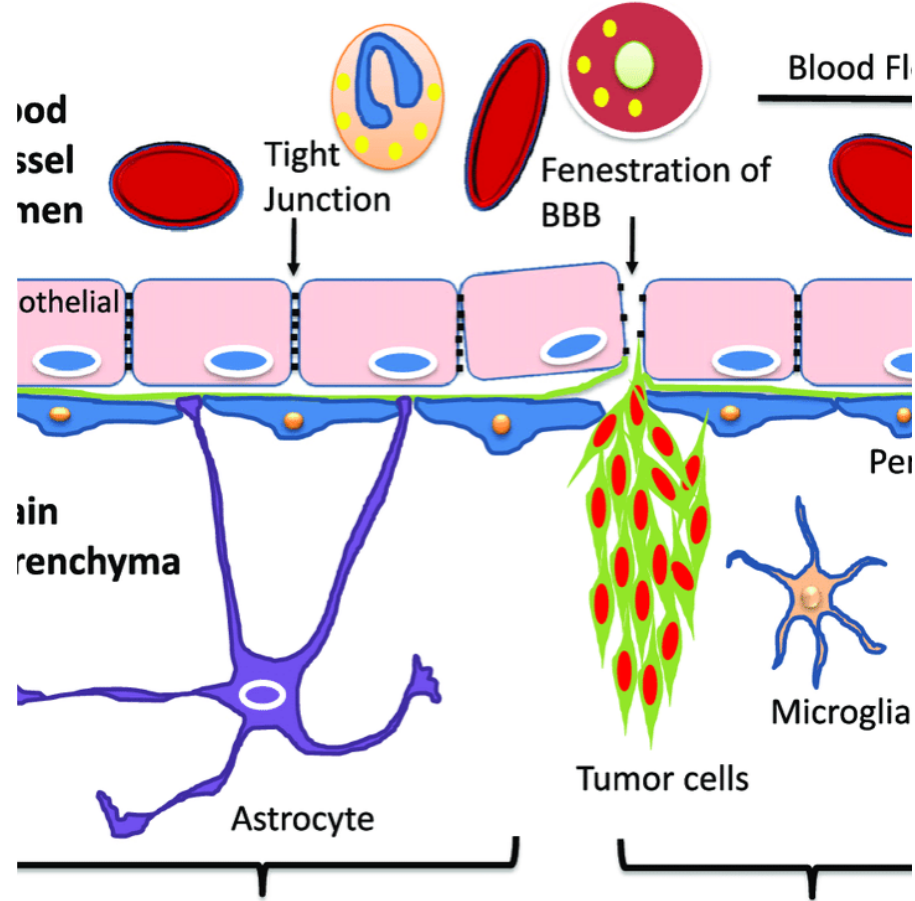
- Kitosan bazlı taşıyıcı sistemler lizozim, kitosanaz gibi vücut içi enzimler tarafından parçalanır vücut tarafından absorbe edilir.
- Amino ve hidroksil grupları kullanılarak kitosan türevleri elde edilebilir.
- Bu türevler çözünürlüğü arttırırken, fonksiyonel proteinlere affiniteyi de arttırarak hedeflendirmelerine katkıda bulunurlar e

Kitosan Bazlı İlaç Taşıma Sistemlerinin Avantajları

- (1) biyouyumluluk ve ve biyoaktif bileşenlerle etkileşim
- (2) stabil olmayan ilaçları gastric asitten ve kan proteinlerinden koruma
- (3) mukozal dokulara yapışma
- (4) elektrostatik etkileşim ile DNA gibi biyomakromoleküllerle bağlanabilme
- (5) kolon bölgesine hedeflendirilebilme

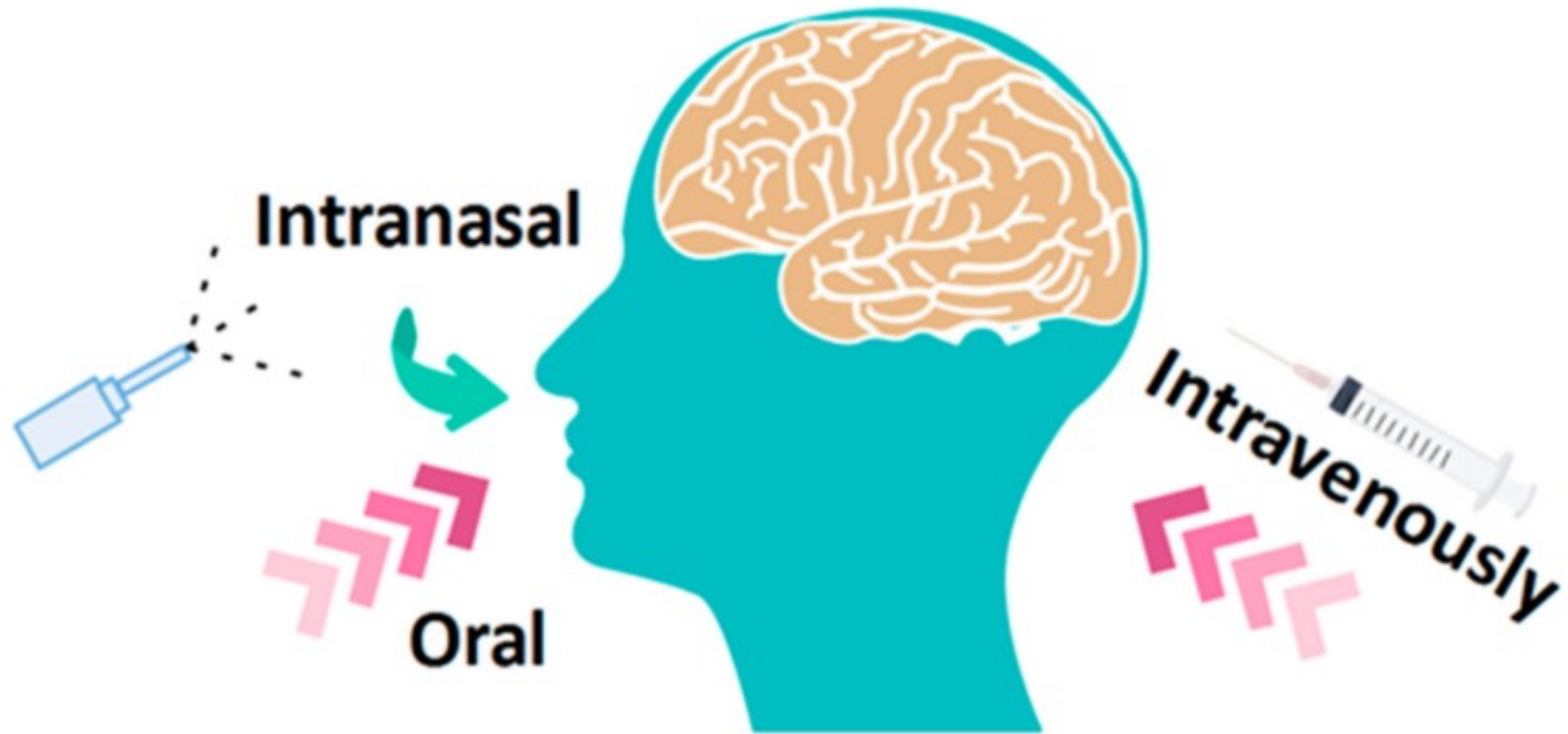


Merkezi Sinir Sistemi Hastalıklarında Kitosan



- Kitosan nanopartikülleri Kan Beyin Bariyerini (KBB) aşarak ilaçların istenen dokuya ulaşmasını sağlayabilir.
- Böylece Alzheimer, Parkinson, Epilepsi gibi merkezi sinir sistemini etkileyen çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilir

Brain drug delivery



Nazal Yoldan Uygulama

- Nazal taşıma ilaçların kan dolaşımına nazal kavitede biriktikten sonra girmesine neden olur.
- Yapılan çalışmalar nazal uygulamanın KBB aşmak için daha kullanışlı bir yol olduğunu göstermektedir.



Kitosan- Nazal Uygulama

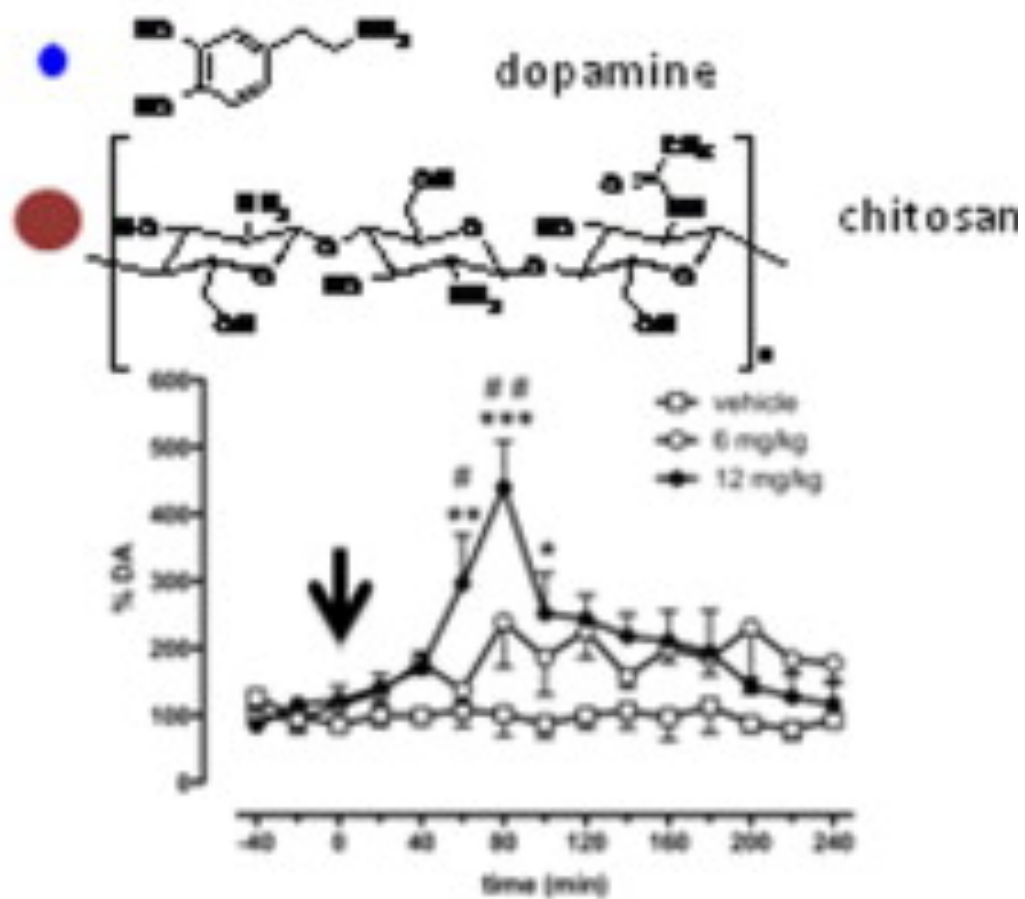
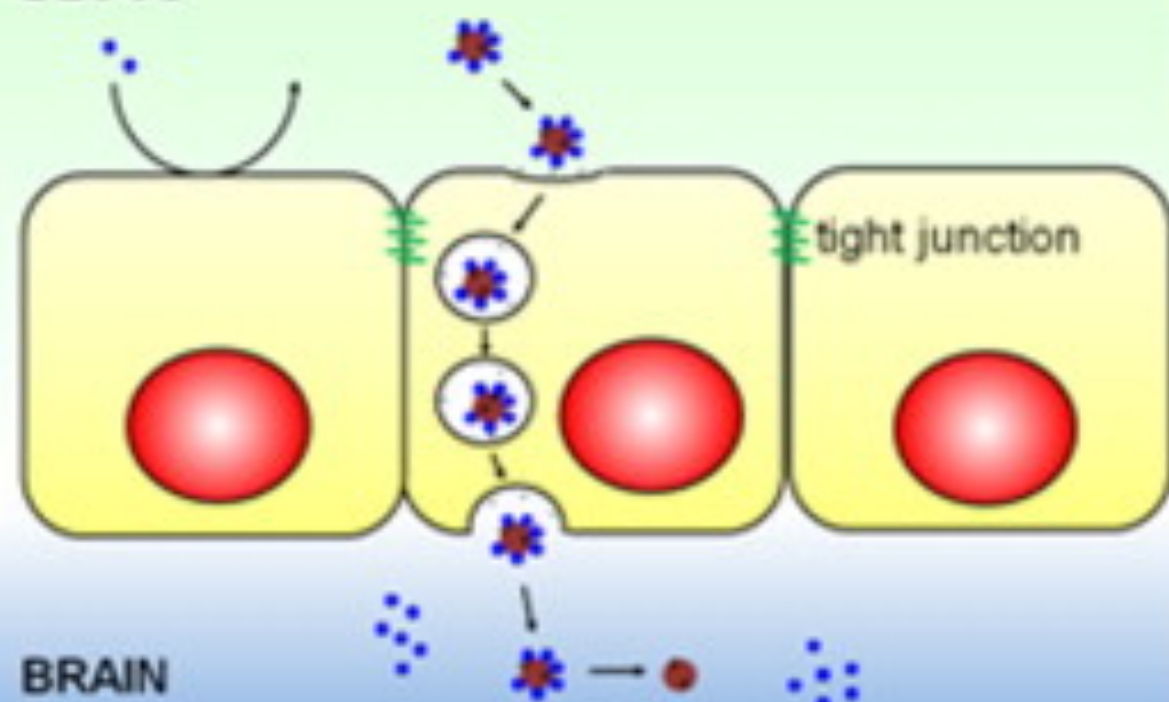
- Kitosan nazal yoldan uygulandığında nazal mukozal membrana sıkı bir biçimde bağlanarak alıkonma süresini arttırabilir
- Mukoz tabakadaki sillerin temizleme etkinliği bu şekilde azaltılabilir.
- Aynı zamanda hidrofobik ilaçların çözünme miktarını arttırabilirler

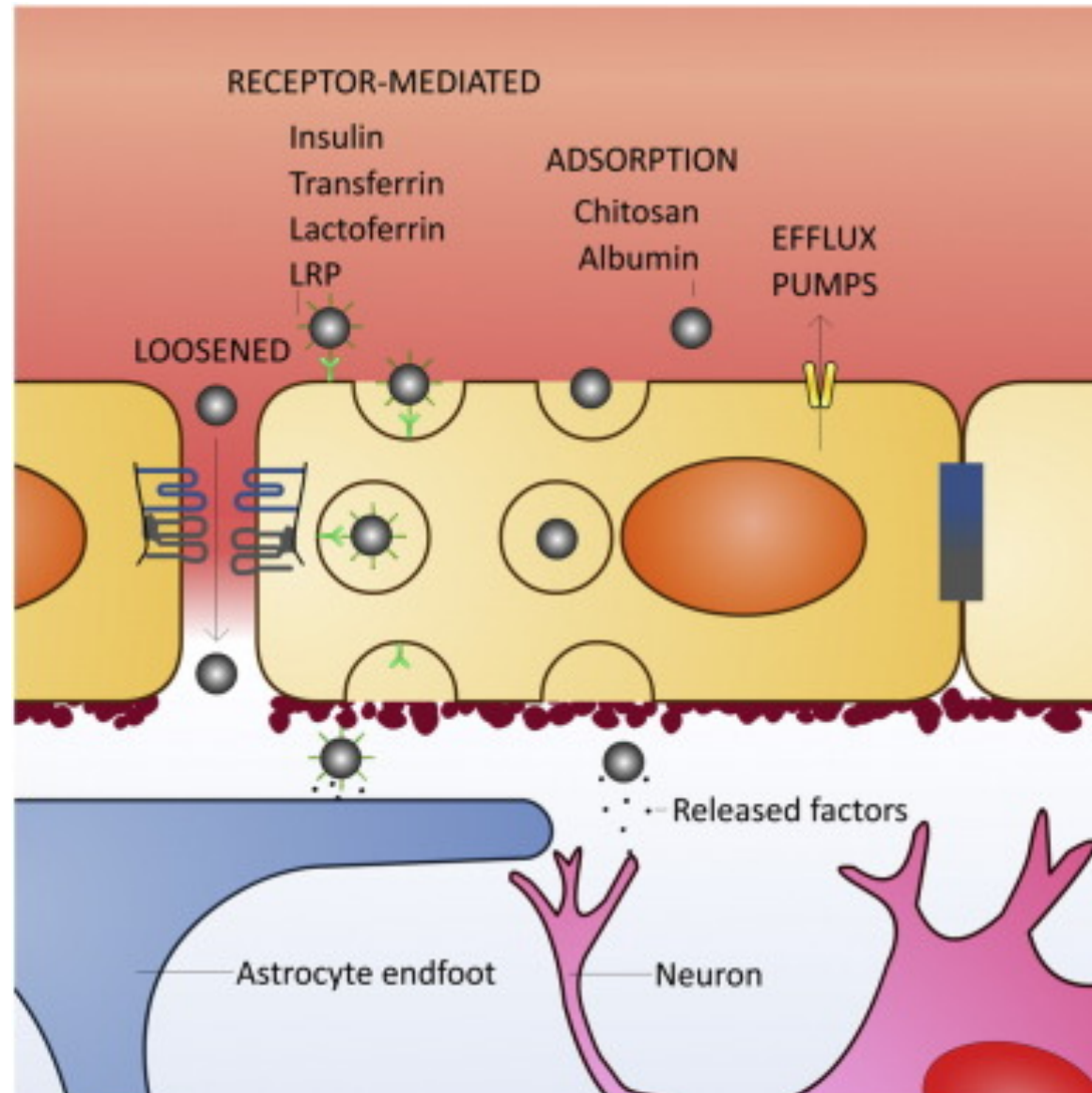


- Nasal formulations with the presence of chitosan or its derivatives were prepared as anti-ischemic drugs, anti-Alzheimer's drugs, anxiolytic drugs, anti-Parkinson's drugs, antimigraine drugs, anti-neurodegenerative drugs, antibiotic drugs, anti-nociceptive drugs, antiepileptic drugs and anti-HIV drugs. They have many advantages over liquid preparations: e.g., they are easy to handle, can be used as carriers for protein or other unstable drugs and provide a lengthy residence time of the drug in the nasal cavity. Chitosan may be used in its unmodified form or in the form of chitosan salts or chitosan derivatives.

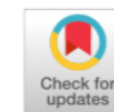
ADSORPTIVE-MEDIATE TRANSCYTOSIS

BLOOD





Intranasal administration of carbamazepine-loaded carboxymethyl chitosan nanoparticles for drug delivery to the brain



Shanshan Liu, Shili Yang, Paul C. Ho *

National University of Singapore, 21 Kent Ridge Road, Republic of Singapore

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 April 2017

Received in revised form 20 August 2017

Accepted 7 September 2017

Available online 12 September 2017

Keywords:

Carbamazepine

Blood-brain barrier

Nanoparticles

Nasal drug delivery

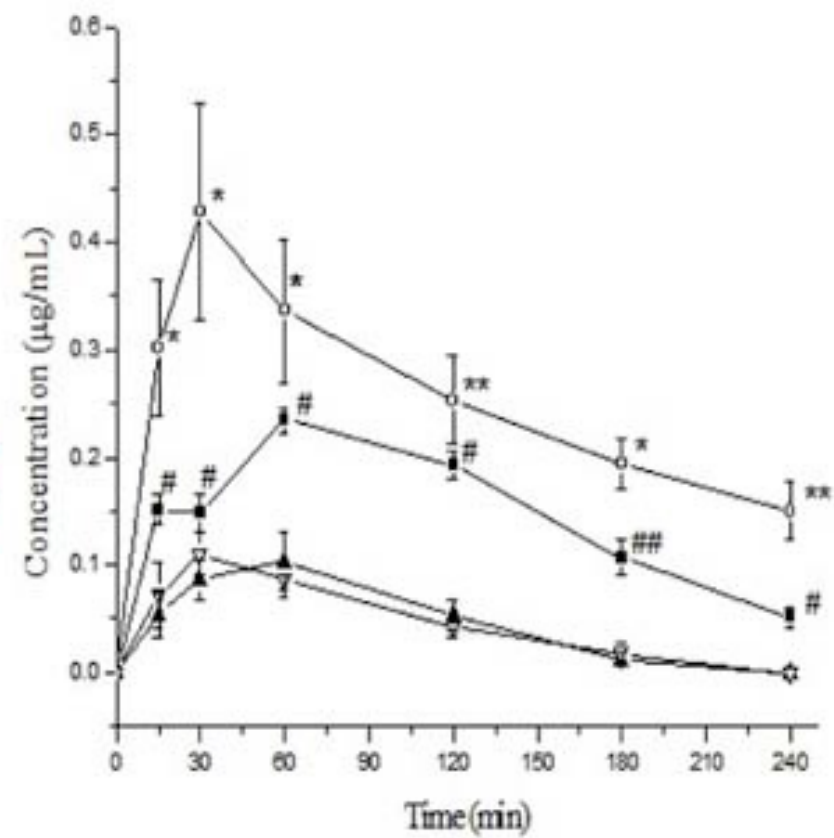
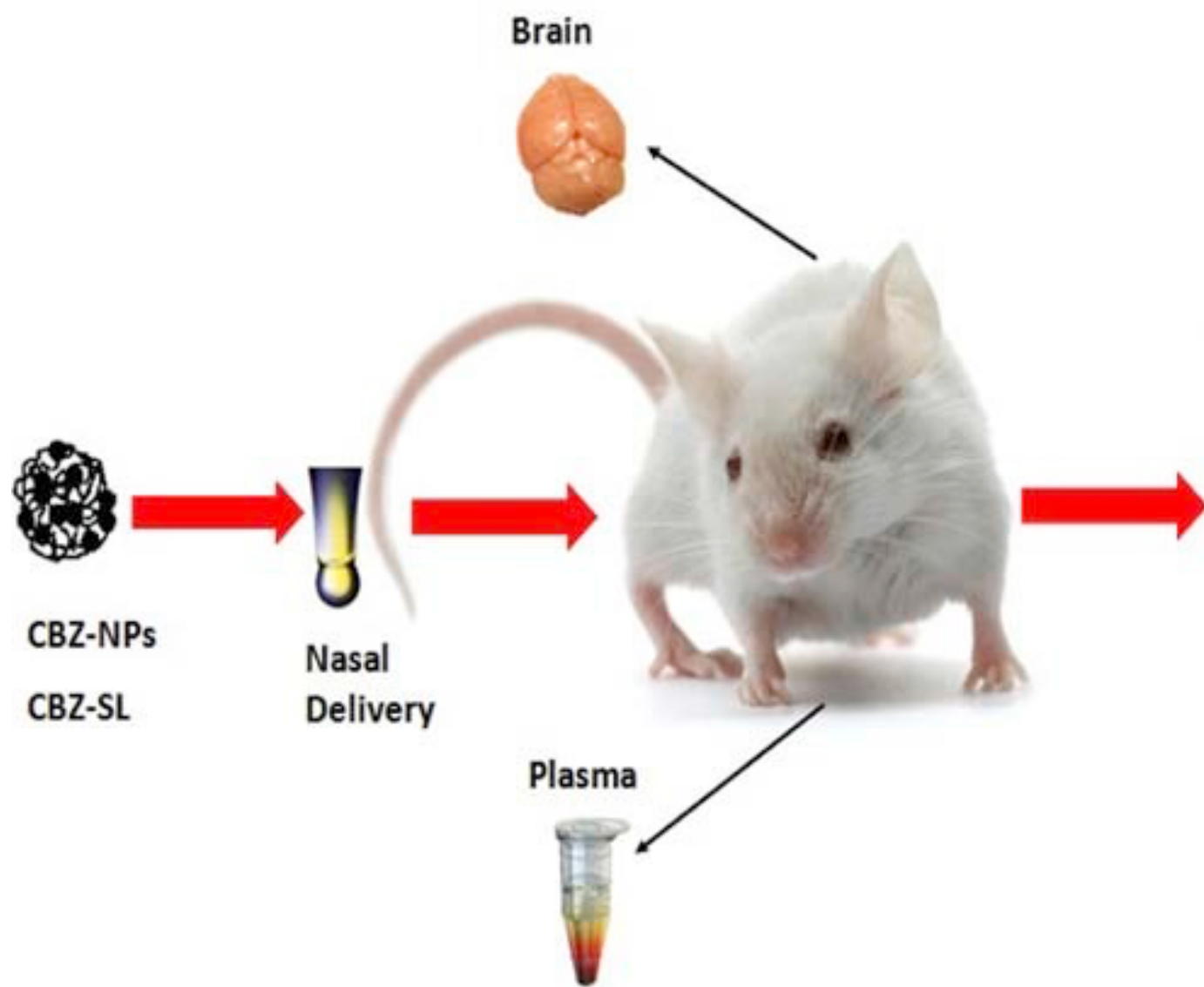
Pharmacokinetics

Chitosan

ABSTRACT

Epilepsy is considered as a common and diverse set of chronic neurological disorders and its symptoms can be controlled by antiepileptic drugs (AEDs). The presence of p-glycoprotein and multi-drug resistance transporters in the blood-brain barrier could prevent the entry of AEDs into the brain, causing drug resistant epilepsy. To overcome this problem, we propose using carboxymethyl chitosan nanoparticles as a carrier to deliver carbamazepine (CBZ) intranasally with the purpose to bypass the blood-brain barrier thus to enhance the brain drug concentration and the treatment efficacy. Results so far indicate that the developed CBZ-NPs have small particle size (218.76 ± 2.41 nm) with high drug loading (around 35%) and high entrapment efficiency (around 80%). The *in vitro* release profiles of CBZ from the NPs are in accordance with the Korsmeyer-peppas model. The *in vivo* results show that both encapsulation of CBZ in nanoparticles and the nasal route determined the enhancement of the drug bioavailability and brain targeting characteristics.

© 2018 Shenyang Pharmaceutical University. Production and hosting by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).





Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

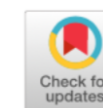
journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

N,N,N-trimethyl chitosan modified flaxseed oil based mucoadhesive neuronanoemulsions for direct nose to brain drug delivery

Chandrakantsing V. Pardeshi ^{a,*}, Veena S. Belgamwar ^b

^a Industrial Pharmacy Laboratory, Department of Pharmaceutics, R.C. Patel Institute of Pharmaceutical Education and Research, Shirpur 425 405, Maharashtra, India

^b Department of Pharmaceutical Sciences, R.T.M. Nagpur University, Nagpur, 110 033, Maharashtra, India



ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 August 2018

Received in revised form 30 August 2018

Accepted 5 September 2018

Available online 8 September 2018

Keywords:

N,N,N-trimethyl chitosan

Flaxseed oil

Neuronanoemulsions

Mucoadhesion

Nose to brain delivery

Parkinson's disease

ABSTRACT

Here we fabricated flaxseed oil-based neuronanoemulsions (NNEs) which were further surface-modified with a mucoadhesive polymer, N,N,N-trimethyl chitosan (TMC) to form mucoadhesive neuronanoemulsions (mNNEs). The NNEs were loaded with high partitioning ropinirole-dextran sulfate (ROPI-DS) nanoplex and fabricated using hot high-pressure homogenization (HPH) technique. NNEs were optimized using Central Composite experimental design. TMC modified mNNE have not been prepared yet for direct nose to brain drug delivery. Here, an objective to provide controlled drug release with prolonged residence on the nasal mucosa for the treatment of Parkinson's disease (PD) is at prime consideration. Enhanced brain targeting through BBB bypass drug delivery, improved therapeutic efficacy through enhanced retention of mNNE formulation over nasal mucosal membrane, reduced dose and frequency of administration, and safety were further expected outcomes of this experiment. The mNNE formulation was subjected to 6 month stability assessment. The mNNE formulation was administered to the Swiss albino mice model *via* intranasal route and both, the plasma and brain pharmacokinetics were estimated. The *in vivo* studies performed on mice exhibited high brain targeting efficiency of mNNE formulation through nose to brain delivery *via* olfactory pathway. The prepared intranasal mNNEs could be on the clinics, if investigated more for behavioral and neurotoxicity studies.

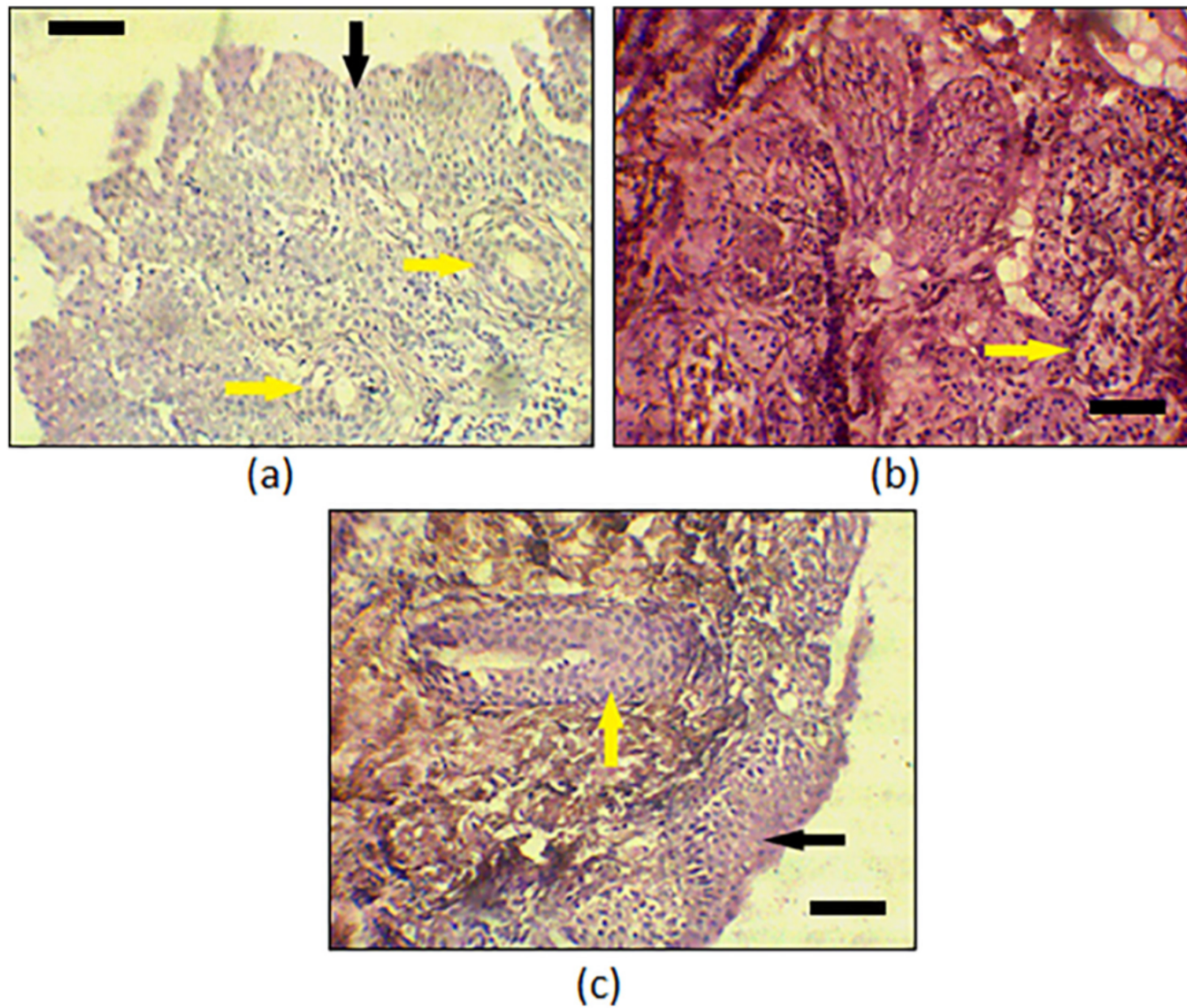


Fig. 4. Optical light photomicrographs of histological sections of excised cattle nasal mucosa [scale bar: 10 μ m, magnification: 400 $\times$], (a) untreated control nasal mucosa, (b) nasal mucosa treated with NNEs, and (c) mNNEs [sample treatment includes application of 100 μ L of suspension of NNE and mNNE formulations for 2 h; black arrow indicates mucus layer and yellow arrow indicates goblet cells].

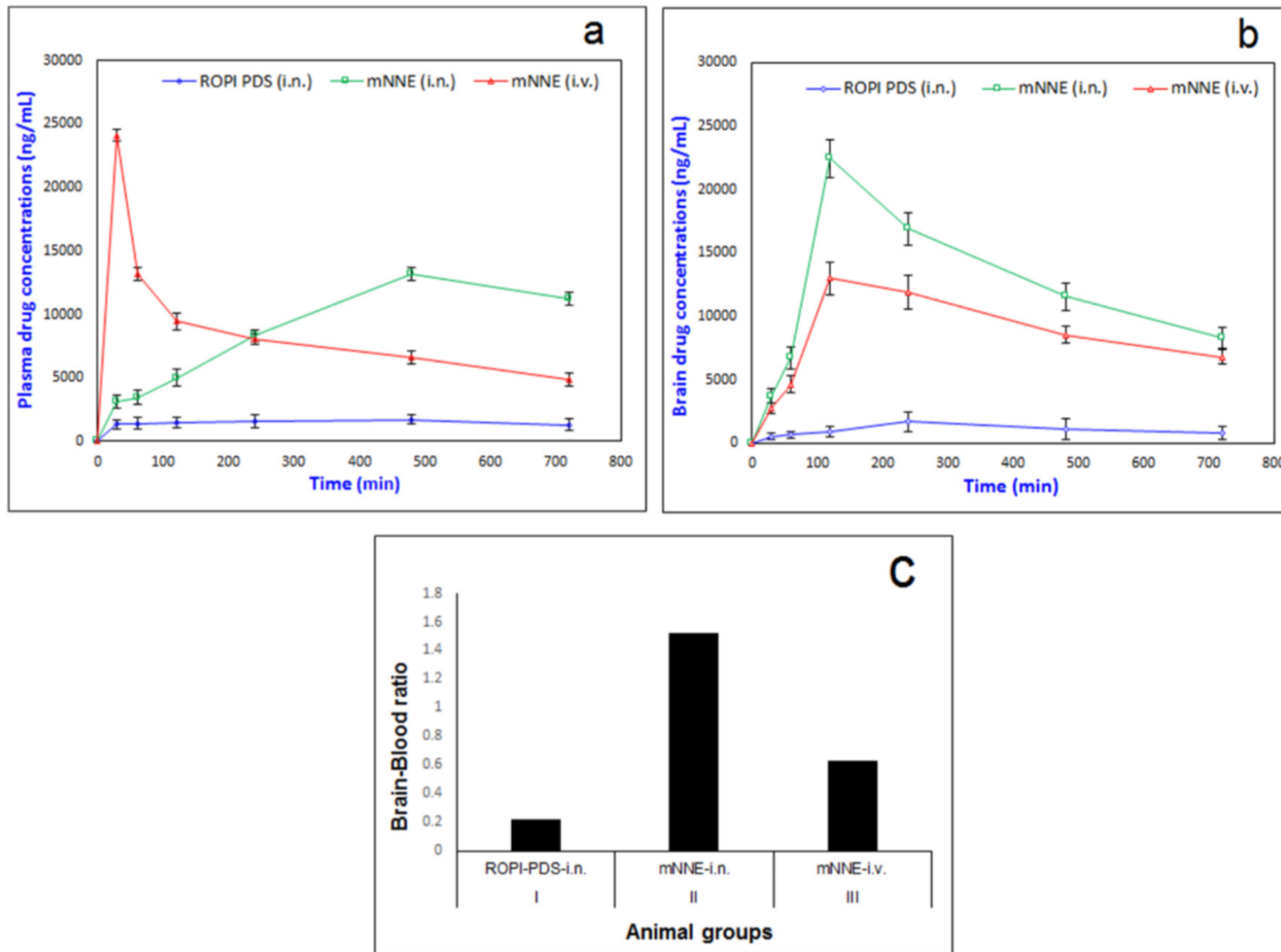


Fig. 5. (a) Plasma concentrations vs. time profile of ROPI PDS and mNNE formulations after intranasal and intravenous administration. (b) Brain concentrations vs. time profile of ROPI PDS and mNNE formulations after intranasal and intravenous administration, and (c) the brain-blood ratio of ROPI PDS (i.n.), mNNEs (i.n.), and mNNEs (i.v.) formulations in Swiss albino mice model.