Thesis title Synthesis and Purification of Chitosan Polysulfate for Determining the Anticoagulant Activities and in vitro Immune Response

Author Mrs. Preeyanat Vongchan

Ph.D. Biochemistry

Examining committee

Assoc. Prof. Dr. Prachya	Kongtawelert	Chairman
Assoc. Prof. Dr. Viboon	Rattanapanone	Member
Assoc. Prof. Dr. Porn-ngarm	Limtrakul	Member
Assoc. Prof. Dr. Watchara	Kasinrerk	Member
Dr. Dumrat	Subyen	Member
Assoc. Prof. Dr. Sansanee	Chaiyaroj	Member

ABSTRACT

The objectives of this study were to synthesize chitosan polysulfate which has the anticoagulant activities, analyze the chemical properties and study its effects on the immune response *in vitro*. Commercial chitosan derived from the shell of marine crabs with degree of deacetylation of 0.12 was modified by random sulfation using chlorosulfonic acid in a mixture of N, N-dimethylformamide as a sulfate donor. The sulfation reaction was

performed at room temperature for 5 hours in order to increase the degree of substitution. The obtained chitosan polysulfate was in the form of sodium salt. A characteristic absorption in the IR spectrum at 800 and 1240 cm^{-1}, due to sulfo groups, were assigned to C-O-S and S=O bond stretching, respectively and it was found that the degree of substitution was 2.23. ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR spectra showed the sulfate substitution at amine group, C-3 and C-6 positions. Analytical calculation of $[C_6H_8O_4N(C_2H_3O)_{0.12}(SO_3Na)_{2.23}(H)_{0.65}\ 3.7H_2O]_n$ was C, 15.89%; H, 3.34%; N, 3.08%; S, 16.18%; Na, 11.63% and was found to be C, 16.99%; H, 3.07%; N, 3.12%; S, 15.64%; Na, 11.33%. Its average molecular weight was 3.2 x 10^4 dalton as determined by the viscometry method. The chitosan polysulfate was separated into three different average molecular weights (P1, P2 and P3) of 6.8 x 10^4, 3.5 x 10^4 and 2.0 x 10^4 dalton by gel filtration on the Sepharose CL-6B at K_d of 0.16 and 0.58. All three fractions were purified by fast protein liquid chromatography on the MonoQ column. The yield of purified chitosan polysulfate was 55%.

P1, P2 and P3 were evaluated for its anticoagulant activities in comparison to pentosan polysulfate (PPS) and standard therapeutic heparin. It was demonstrated that all three fractions showed strong anticoagulant activity when compared to the standard therapeutic heparin. However, the activity was less than that of PPS. The mechanism of action was studied and it was shown that P1 and P2 could inhibit factor Xa activity *via* binding to antithrombin III but directly inhibited thrombin activity. In contrast, P3 which has the smallest average molecular weight of all fractions could only directly inhibit thrombin activity. All three fractions had no effect on the other coagulation factors in the extrinsic pathway or fibrin polymerization process.

In order to evaluate for its biological effects in the immune response *in vitro* if they were applied as a therapeutic agent, P1-P3 in parallel with PPS and standard therapeutic heparin were studied for their involvement in the cell proliferation. The results showed that all tested materials could significantly inhibit PPD stimulated cell proliferation in dose dependent manner ($p<0.01$). However, only heparin that could inhibit PHA stimulated cell proliferation while P1-P3 and PPS showed no significant effect ($p>0.05$). The effect on the pokeweed mitogen induced immunoglobulin production was also studied. The results showed that P1-P3, PPS or heparin itself had no effect on the immunoglobulin production of human peripheral blood mononuclear. However, all tested materials inhibited pokeweed mitogen induced immunoglobulin production in dose dependent manner ($p<0.01$). Moreover, all three fractions showed no significant effect on cell mediated cytotoxicity or cytokine production ($p>0.05$) as well as PPS and standard therapeutic heparin.

All results can be concluded that chitin heparinoid could be synthesized by random sulfation of chitosan in a semi-heterogeneous phase. The reaction could be easily performed at room temperature with high yield. The obtained products had the mechanism of action closed to heparin. It could be applied for the biomedical heparinomimetic compound. Therefore, It is of interest for more investigation *in vivo* for its pharmacological and toxicological effects.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การสังเคราะห์ไคโตซานพอลิซัลเฟตและทำให้บริสุทธิ์ เพื่อตรวจหาความสามารถยับยั้งการแข็งตัวของเลือด และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในหลอดทดลอง
ชื่อผู้เขียน	นางปรียานาถ วงศ์จันทร์
วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต	สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ปรัชญา	คงทวีเลิศ	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. วิบูลย์	รัตนาปนนท์	กรรมการ
รศ. ดร. พรงาม	ลิ้มตระกูล	กรรมการ
รศ. ดร. วัชระ	กสิณฤกษ์	กรรมการ
ดร. ดำรัส	ทรัพย์เย็น	กรรมการ
รศ. ดร. ศันสนีย์	ไชยโรจน์	กรรมการ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือการสังเคราะห์ไคโตซานพอลิซัลเฟตที่มีคุณสมบัติยับยั้งการแข็งตัวของเลือด วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี และศึกษาผลกระทบต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในหลอดทดลอง โดยนำไคโตซานที่จำหน่ายเชิงพาณิชย์ซึ่งเตรียมได้จากกระดองปูทะเลที่มีค่าองศาการกำจัดหมู่อะเซติลเป็น 0.12 มาดัดแปลง ด้วยการเติมหมู่ซัลเฟตแบบสุ่ม โดยใช้กรดคลอโรซัลโฟนิกในสารละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์เป็นสาร

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ให้หมู่ซัลเฟต ปฏิกิริยาเติมหมู่ซัลเฟตทำที่อุณหภูมิห้องนาน 5 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มองศาของการแทนที่ไคโตซานพอลิซัลเฟตที่ได้อยู่ในรูปของเกลือโซเดียม การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีอินฟราเรดสเปคโตรเมทรีพบค่าการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่งคลื่น 800 และ 1240 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงหมู่ C-O-S และ S=O ตามลำดับ องศาการแทนที่ของหมู่ซัลเฟตมีค่าเป็น 2.23 การศึกษาตำแหน่งของหมู่ซัลเฟตด้วยวิธี ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR พบการแทนที่ที่หมู่เอไมด์และคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 องค์ประกอบในโมเลกุล $[C_6H_8O_4N(C_2H_3O)_{0.12}(SO_3Na)_{2.23}(H)_{0.65}3.7H_2O]_n$ ซึ่งมีค่าตามการคำนวณเป็น C,15.89%; H, 3.34%; N, 3.08%; S, 16.18%; Na, 11.63% ได้ผลการวิเคราะห์เป็น C, 16.99%; H, 3.07%; N, 3.12%; S, 15.64%; Na, 11.33% ตามลำดับ มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 3.2 x 10^4 ดาลตัน ซึ่งตรวจวัดได้ด้วยวิธีวิสโคเมทรี เมื่อนำไปแยกออกเป็น 3 ส่วนโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่นในคอลัมน์ Sepharose CL-6B ด้วยค่าการแยกคงที่ (K_d) 2 ตำแหน่งที่ 0.16 และ 0.58 ได้ไคโตซานพอลิซัลเฟต (P1, P2 และ P3) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 6.8 x 10^4, 3.5 x 10^4 และ 2.0 x 10^4 ดาลตันตามลำดับ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีฟาสท์โปรตีนลิควิดโครมาโทรกราฟฟีในคอลัมน์ MonoQ ได้ไคโตซานพอลิซัลเฟตบริสุทธิ์ โดยมีผลผลิตรวมคิดเป็น 55%

การศึกษาคุณสมบัติยับยั้งการแข็งตัวของเลือดของ P1, P2 และ P3 เปรียบเทียบกับเพนโตซานพอลิซัลเฟต (พีพีเอส) และสารมาตรฐานเฮพารินที่ใช้ในการรักษา พบว่าไคโตซานพอลิซัลเฟตทั้งสามขนาดสามารถยับยั้งการแข็งตัวของเลือดได้ดีเมื่อเทียบกับเฮพาริ แต่น้อยกว่าพีพีเอส ผลการศึกษากลไกการทำงานพบว่า P1 และ P2 ยับยั้งการทำงานของ factor Xa โดยผ่านการจับกับ antithrombin III แต่สามารถยับยั้งการทำงานของ thrombin ได้โดยตรง ในขณะที่ P3 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยน้อยที่สุดยับยั้งการทำงานของ thrombin โดยตรงได้เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าไคโตซานพอลิซัลเฟตไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของปัจจัยช่วยการแข็งตัวของเลือดชนิดอื่น ๆ ในกระบวนการแข็งตัวของเลือดแบบ extrinsic

หรือกระบวนการโปลีเมอไรเซชั่นของไฟบริน กลไกการทำงานดังกล่าวทั้งหมดใกล้เคียงกับกลไกการทำงานของเฮพาริน

เพื่อศึกษาผลทางชีวภาพด้านการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในหลอดทดลองของไคโตซานพอลิซัลเฟตหากจะถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษา ได้ศึกษาผลกระทบของ P1, P2 และ P3 ต่อการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว เปรียบเทียบกับพีพีเอสและเฮพาริน พบว่าสารทดสอบทั้งสามชนิดสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนพีพีดี ($p<0.01$) โดยการยับยั้งมีลักษณะแปรผันตามความเข้มข้นที่ใช้ อย่างไรก็ตามไคโตซานพอลิซัลเฟตและพีพีเอสไม่มีผลยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญเมื่อกระตุ้นด้วยไมโตเจนพีเอชเอ ยกเว้นเฮพาริน ($p>0.05$) การศึกษาผลกระทบต่อการสร้างอิมมูโนโกลบูลินจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวเมื่อถูกกระตุ้นด้วยโพควีดไมโตเจน พบว่า P1-P3, พีพีเอสและเฮพารินไม่มีผลกระทบต่อการสร้างอิมมูโนโกลบูลิน แต่สามารถยับยั้งการสร้างอิมมูโนโกลบูลินของเซลล์ดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อถูกกระตุ้นด้วยโพควีดไมโตเจน ($p<0.01$) การยับยั้งมีลักษณะแปรผันตามความเข้มข้นที่ใช้ นอกจากนี้การศึกษายังพบว่า P1, P2 และ P3 ไม่มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อการทำงานในระบบ cell mediated cytotoxicity และการสร้างไซโตคัยน์ ($p>0.05$) เช่นเดียวกับพีพีเอสและเฮพาริน

จากผลการศึกษาสามารถทั้งหมดสรุปได้ว่า สามารถสังเคราะห์ไคตินเฮพารินนอยด์ได้ด้วยปฏิกิริยาการเติมหมู่ซัลเฟตแบบสุ่มในไคโตซาน ซึ่งอยู่ในสภาวะที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถทำได้ง่ายที่อุณหภูมิห้องและให้ผลผลิตสูง ผลิตผลที่ได้มีกลไกการทำงานคล้ายเฮพาริน สามารถนำไปประยุกต์เป็นสารเลียนแบบเฮพารินใช้ในการแพทย์ได้ ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปทางด้านเภสัชวิทยา และความเป็นพิษต่อร่างกาย