

國立臺灣大學工學院高分子科學與工程學研究所



碩士論文

Institute of Polymer Science and Engineering

College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

具有抗病毒以及抗菌特性的硫酸化多醣-殼聚糖奈米複合粒子作為藥物載體的研究

Antiviral and antibacterial sulfated polysaccharide-chitosan
nanocomposite particles as drug carrier

殷愛宜

Ai-Yi Yin

指導教授：徐善慧 博士

Advisor: Shan-hui Hsu, Ph.D.

中華民國 112 年 03 月

March, 2023

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

具有抗病毒以及抗菌特性的硫酸化多醣-殼聚醣奈米複合粒子作為藥物載體的研究

Antiviral and Antibacterial Sulfated
Polysaccharide-Chitosan Nanocomposite Particles as a
Drug Carrier

本論文係由殷宜君（學號 R10549024）在國立臺灣大學高分子科學與工程學研究所完成之碩士學位論文，於民國 112 年 3 月 15 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

徐善芝

（簽名）（指導教授）

楊啓仲

周佳欣

侯詠德

張臺灣

系主任、所長

黃如惠

（簽名）

致謝



時光匆匆，就像掠過苔原的鹿，無聲而快速。在學生進入實驗室之前，對這個領域的知識和技能都很有限。但在實驗室同胞的悉心指導，學生開始理解了這些複雜的概念和技術。對於能夠成為這裡的一份子，學生感到非常幸運。

最感謝的人莫過於學生的指導教授徐善慧教授，教會了學生重要的道理：「當機會向你伸出手的時候，那就抓住它吧！」。現在能夠走到現在，都是因為老師伸出了幫助的手。除此之外，每週辛苦的舉辦會議，老師都非常珍重這些時間。老師也非常大方的提供資源讓大家能夠有嘗試的機會。在研究以及撰寫論文期間，老師給予了很多包容並幫助學生許多。在口試期間，承蒙楊啟伸教授、侯詠德教授、張書瑋教授與周佳靚教授給予許多寶貴的意見，也感謝對於學生的肯定以及讚美。

本篇論文的完成要特別感謝俊鵬學長，不管是在各方面的指導，和學生一同進行實驗設計以及討論，並時刻關心著動態。哉羽學長也不吝嗇的協助，讓這個論文更臻完整。實驗室的學長姐也給予許多關懷與鼓勵：薇博、坤志學長、欣達學長、世和學長、乾溥學長、廷杰學長、佩旋學姐、俐婷學姐、宇峰學長、于真學姐、于婷學姐與亮鈞學弟。謝謝你們。

最後要感謝所有在低谷時幫助我站起來的所有人。

殷愛宜

中華民國一百一十二年三月

摘要

藥物輸送系統 (DDS) 是將藥物輸送到目標部位且風險最小的方法。而其中有一種具有潛力的策略是利用聚合物奈米粒子作為藥物載體，使用的聚合物需具備生物相容性和可降解的特性，以降低對於人體的傷害。在本篇研究，開發了由節旋萃取硫酸化多醣和殼聚醣組成的奈米粒子，並期望透過兩種材料的合成，結合兩者的優勢。得到具有抗病毒、抗菌和 pH 敏感的多功能複合奈米粒子，縮寫為 APC。在接近人體的生理環境中 (pH = 7.4)，透過不同的比例針對 APC 奈米粒子的形態和尺寸 (~160 nm) 進行穩定性的觀察並進行優化。優化過的 APC 奈米粒子在體外驗證了有效的抗菌 (有效濃度 2 μ g/mL) 和抗病毒 (有效濃度 6.596 μ g/mL) 特性。並且在不同 pH 值下的環境，針對各種類別的藥物 (包括親水性藥物、疏水性藥物和蛋白質藥物) 檢驗了 APC 的載藥可行性，針對 pH 敏感的藥物釋放行為和藥物動力學。也在肺癌細胞和神經幹細胞中評估了應用。使用 APC 作為載藥奈米粒子，能夠保持藥物的生物活性，以抑制肺癌細胞的增殖 (減少約 40%)，同時能夠減輕藥物對神經幹細胞的抑制作用。這些發現表明，硫酸化多醣-殼聚醣的生物相容性複合奈米粒子很好地保持了抗病毒和抗菌特性並具有 pH 敏感的藥物釋放作用，可作為一種有前途的多功能藥物載體用於進一步的生物醫學應用。

關鍵詞：節旋藻、硫酸化多醣、奈米粒子、抗菌、抗病毒、藥物輸送

Abstract

Drug delivery systems (DDS) are methods of delivering drugs to targeted sites with minimal risk. One popular strategy of DDS is using nanoparticles as a drug carrier, which are made from biocompatible and degradable polymers. Herein, nanoparticles composed of *Arthrosphaera*-derived sulfated polysaccharide (AP) and chitosan were developed and expected to possess the capabilities of antiviral, antibacterial, and pH-sensitive properties. The composite nanoparticles, abbreviated as APC, were optimized for stability of morphology and size (~160 nm) in the physiological environment (pH=7.4). Potent antibacterial (over 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and antiviral (over 6.596 $\mu\text{g}/\text{mL}$) properties were verified *in vitro*. The pH-sensitive release behavior and release kinetics of drug-loaded APC nanoparticles were examined for various categories of drugs, including hydrophilic, hydrophobic, and protein drugs, under different pH values of the surroundings. Effects of APC nanoparticles were also evaluated in lung cancer cells and neural stem cells. The use of APC nanoparticles as a drug delivery system maintained the bioactivity of drug to inhibit the proliferation of lung cancer cells (with ~40% reduction) and to relieve the growth inhibitory effect on neural stem cells. These findings indicate that the pH-sensitive and biocompatible composite nanoparticles of sulfated polysaccharide and chitosan well keep the antiviral and antibacterial properties and may serve as a promising multifunctional drug carrier for further biomedical

applications.



Keywords: *Arthrosphaera*, Sulfated polysaccharide, Nanoparticles, Antibacterial, Antiviral, Drug Delivery

目錄

| | |
|---|------|
| 致謝..... | I |
| 摘要..... | II |
| Abstract..... | III |
| 目錄..... | V |
| 圖目錄..... | VIII |
| 表目錄..... | IX |
| 第一章 文獻回顧..... | 1 |
| 1.1. 藥物遞送系統..... | 1 |
| 1.2. 載藥奈米粒子..... | 1 |
| 1.3. 硫酸化多醣..... | 1 |
| 1.4. 膠聚醣..... | 2 |
| 1.5. 研究目的..... | 3 |
| 第二章 研究方法..... | 4 |
| 2.1. 研究架構..... | 4 |
| 2.2. 硫酸化多醣-膠聚醣奈米粒子合成 | 6 |
| 2.3. APC 奈米粒子優化 | 7 |
| 2.4. APC 奈米粒子形態和熱性質 | 7 |
| 2.4.1. 穿透式電子顯微鏡 (Transmission electron microscope, TEM) ... | 7 |

| | |
|---|----|
| 2.4.2. 热重分析儀 (Thermogravimetric analysis, TGA) | 7 |
| 2.4.3. 差示掃描量熱儀 (Differential scanning calorimetry, DSC) | 7 |
| 2.5. 抗菌實驗 (哉羽學長操作)..... | 8 |
| 2.6. 抗病毒評估 (遠東生技公司操作)..... | 8 |
| 2.7. 載藥機制 | 9 |
| 2.7.1. 親水藥物 | 10 |
| 2.7.2. 疏水藥物 | 10 |
| 2.7.3. 大分子蛋白質藥物 | 10 |
| 2.8. 載藥效率和包封效率 | 10 |
| 2.9. 藥物釋放效率 | 11 |
| 2.10. 藥物釋放動力學 | 12 |
| 2.10.1. 一級動力學模型 | 12 |
| 2.10.2. Hixson-Crowell 模型 | 12 |
| 2.10.3. Higuchi 模型 | 13 |
| 2.10.4. Korsmeyer-Peppas 模型 | 13 |
| 2.11. 細胞實驗 (俊鵬學長操作) | 13 |
| 2.11.1 人上皮肺癌細胞 | 14 |
| 2.11.2 神經幹細胞 | 14 |
| 2.12. 統計學分析 | 15 |



| | |
|--|----|
| 第三章 實驗結果..... | 16 |
| 3.1. 複合奈米粒子優化及奈米粒子分析儀分析..... | 16 |
| 3.2. APC 奈米粒子表徵 | 19 |
| 3.2.1. 穿透式電子顯微鏡 (TEM) 分析 | 19 |
| 3.2.2. 热重分析儀 (TGA) 和差示掃描量熱儀 (DSC) 分析 | 20 |
| 3.3. 抗菌特性分析..... | 21 |
| 3.4. 抗病毒特性分析..... | 22 |
| 3.5. 載藥奈米粒子分析..... | 23 |
| 3.5.1.藥物型態觀察..... | 23 |
| 3.5.2.藥物釋放分析..... | 25 |
| 3.5.3.藥物釋放動力學分析..... | 27 |
| 3.6. 載有 HEBR 的奈米粒子對細胞行為的作用 | 28 |
| 3.6.1 肺癌細胞..... | 28 |
| 3.6.2 神經幹細胞..... | 29 |
| 第四章 討論..... | 30 |
| 第五章 結論..... | 36 |
| 第六章 未來展望..... | 37 |
| 參考文獻..... | 39 |

圖目錄

| | |
|--|----|
| 圖 2.1. 研究架構..... | 5 |
| 圖 3.1. APC 奈米粒子的形成機制和在不同 pH 值環境中潛在的結構變化。..... | 17 |
| 圖 3.2. AP:CS 比例為 1:1.5 時的 APC 沉澱。 | 17 |
| 圖 3.3. APC 奈米粒子的穩定性和 pH 敏感性。 | 18 |
| 圖 3.4. APC2 在鹼性溶液中的沉澱。 | 19 |
| 圖 3.5. APC 奈米粒子的 TEM 圖像。 | 20 |
| 圖 3.6. TGA 和 DSC 分析的材料熱性質。 | 21 |
| 圖 3.7. 各材料對大腸桿菌和表皮葡萄球菌的抗菌譜。 | 22 |
| 圖 3.8. 不同材料濃度對於病毒的抗病毒活性。 | 23 |
| 圖 3.9. 固綠 FCF、薑黃素和 HEBR 的檢量線。 | 24 |
| 圖 3.10. 初始載藥 APC 奈米粒子的 TEM 圖像。 | 25 |
| 圖 3.11. 不同 pH 值下 APC-F, APC-C 的釋放曲線。 | 26 |
| 圖 3.12. 包載 HEBR 的 APC 奈米粒子可能機制。 | 26 |
| 圖 3.13. 不同 pH 值下 APC-H 的釋放曲線。 | 27 |
| 圖 3.14. TCPS(對照組)、AP、APC 和 APC-H 在 24 小時和 48 小時時測量的(A)肺癌細胞和(B)神經幹細胞的增殖 CCK-8 測定。 | 29 |

表目錄



| | |
|---|----|
| 表 2.1. 各種重量濃度比的 AP 和 CS 製備的各種 APC 奈米粒子。 | 6 |
| 表 3.1. 用不同質量比的 AP 和 CS 製備的 APC 奈米粒子的 zeta 電位和 PDI | 18 |
| 表 3.2. 所有載藥 APC 奈米粒子在不同 pH 值下的藥物釋放動力學。 | 28 |

第一章 文獻回顧



1.1. 藥物遞送系統

藥物遞送系統 (Drug Delivery System, DDS) 是一種機制，旨在以安全有效的方式將治療藥物輸送到體內的特定目標部位，同時最大限度地降低任何潛在風險。[1]。DDS 的主要目的是提高藥物使用的療效，提高治療的整體有效性，減輕藥物過度毒性可能引起的不良副作用。DDS 採用各種策略，例如：製造載藥顆粒、優化存儲系統和使用藥物分子，將藥物遞送至預期目標 [2]。

1.2. 載藥奈米粒子

各種有機和無機奈米粒子已被確定為有效的藥物載體，已經顯示出具有提高治療效果和減少不良副作用巨大潛力 [3, 4]。而與不可生物降解的材料相比，具有生物相容性和可降解的聚合物提供了一種更安全的選擇。因為它們可以從體內排出沒有額外的殘留，或是可以被體內的環境吸收。這些優點可以避免潛在的毒性風險。其中常見的材料便是多醣類。多醣類是具有龐大分支且結構多樣的生物聚合物，主要從微生物或植物中提取，具有多種生物學特性 [5]。幾乎所有的多醣都具有生物相容性和可降解性。因此，許多多醣被選擇用於開發不同形式的藥物載體，例如奈米粒子 [6, 7]

1.3. 硫酸化多醣

硫酸化多醣 (Sulfated polysaccharide, SP) 是多醣的不同分支之一。SP 是指天然和半合成的酸性多醣，由硫酸根取代大分子鏈中單醣上的羥基形成 [8]。SP 由於與人體黏多醣的結構相似，而具有細胞相容性 [9-11]。特別是 SP 的獨特結構使其具有抗病毒的特性。多醣與硫酸基團的相互作用可在細胞被感染前通過抑制病毒的複製來阻斷生命週期 [12]。由於特殊的生物學特性，SP 作為抗病毒藥物具有很強的開發潛力 [13]。然而，SP 的醫學應用主要是作為藥物，最近報導了一些基於 SP 的聚合物網絡，但它們仍然需要額外的條件來補充，例如存在最初可膠凝的基質 [14, 15] 或金屬電離 [16]。這種限制可能是由於 SP 本身的結構 [17]。最近的一項研究證實了節旋藻(*Arthrosphaera*)衍生的 SP(AP)作為載藥奈米粒子的可能性 [18]。高純度 AP 具有高分子量(~300 kDa)和良好的水溶性。由於帶負電荷的硫酸基團，AP 可與陽離子聚合物如殼聚醣(Chitosan, CS)相互作用，並以複合奈米粒子形式自組裝。然而，藥物加載/釋放的詳細機制和優化過程尚未確定。

1.4. 殼聚醣

CS 作為一種具有生物相容性和可生物降解的陽離子聚合物，具有抗菌功能，已經作為藥物遞送的研究材料 [19]。CS 是由葡萄糖胺(去乙酰基單元)和 N-乙酰氨基葡萄糖(乙酰化單元)隨機分佈並通過糖苷鍵結合而成的線性多醣 [20]。它作為生物醫學材料得到了廣泛研究 [21, 22]。但 CS 因其不溶於水的性質而使其應

用受到限制，單獨作為藥物載體可能存在載藥量不足和藥物釋放不可控等缺點

[23]。CS 與其他分子或聚合物結合是製備藥物載體的有效方法。例如，CS 和肝

素(一種黏多醣)形成複合奈米粒子以改善藥物吸收 [24, 25]。

1.5. 研究目的

在這項工作中，我們使用 AP 和 CS 開發了 pH 敏感的複合奈米粒子。預計這兩種聚合物的組合具有抗病毒和抗菌作用。通過製備過程優化了複合奈米粒子，並量測尺寸和 zeta 電位。還研究了奈米粒子的熱性能和奈米粒子在不同 pH 值下的行為。然後用親水性和疏水性模型藥物以及蛋白質藥物 [26] 做成藥物包載奈米粒子，以檢查各種類型藥物的包封效率和釋放曲線。此外，評估了複合奈米粒子在調節細胞增殖方面的潛在功能。

第二章 研究方法

2.1. 研究架構



本研究為開發具有抗病毒以及抗菌特性的硫酸化多醣(AP)-殼聚醣(CS)奈米複合粒子(APC)作為載藥奈米粒子，首先合成了硫酸化多醣-殼聚醣奈米複合粒子。並以奈米粒子分析儀進行材料比例優化，通過 polydispersity index(PDI)、流體動力學直徑和 zeta 電位確認最佳組別。選擇好的最佳組別再以熱重分析儀和差示掃描量熱儀確定材料熱性質的差異。並透過穿透式電子顯微鏡觀察不同酸鹼情況的 APC 奈米粒子的形態和尺寸。使用標準微量稀釋法測試 AP，CS，以及 APC 奈米粒子的抗菌效果。再來根據中和試驗進行測試 AP，CS，以及 APC 奈米粒子的抗毒效果。

體外藥物釋放實驗選擇三種不同的藥物進行測試：親水小分子藥物固綠 FCF、疏水小分子藥物薑黃素、以及大分子蛋白質藥物高表達細菌視紫紅質(HEBR)。並計算載藥率以及包載率，確認載藥 APC 奈米粒子的包載可能性。接著在酸中鹼環境觀察藥物釋放的情況，並針對釋放情況進行藥物釋放動力學模型擬合，用以找出載藥 APC 奈米粒子的釋放機制。最後使用 AP、APC、以及載有 HEBR 的 APC 奈米粒子確認對於肺癌細胞的細胞抑制和對於神經幹細胞的細胞增殖，驗證 APC 奈米粒子的藥物活性保持和針對健康細胞的促進增值，以開發應用於生物醫學領域的多功能藥物載體。研究架構圖如圖 2.1.所示。

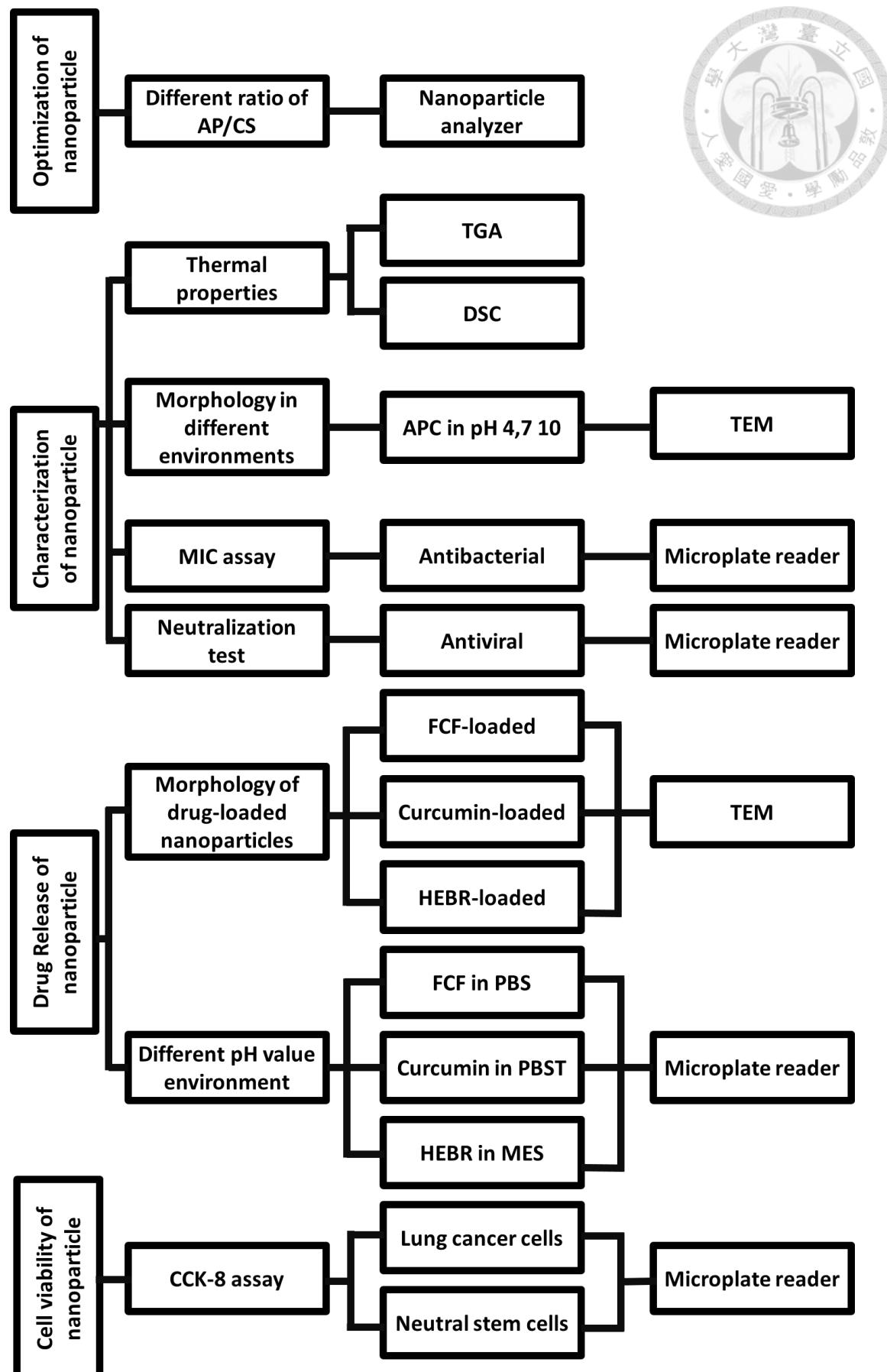


圖 2.1. 研究架構

2.2. 硫酸化多醣-殼聚糖奈米粒子合成

由 AP 與 CS 組成的奈米粒子，縮寫為 APC。主要由 AP ($M_n = 3 \times 10^5$ Da, Far East Bio-Tec. Co., Ltd., Taiwan) 和 CS ($M_n = 1.4 \times 10^5$ Da, Hopax Inc, Taiwan) 組成。首先製備兩種溶液，CS 溶解在濃度為 10 mg/mL 的 1 wt% 乙酸中 (Sigma-Aldrich, USA)，接著用磷酸鹽緩衝鹽水 (PBS) 將高濃度 CS 溶液稀釋至目標濃度 (0.5、0.75 和 1 mg/mL)，並將 pH 值維持在 6.0 左右；AP 以 1.0 mg/mL 的濃度溶解在去離子(DI)水中。而製備過程先將 CS 溶液以 800rpm 的速度維持攪拌狀態，再將 AP 水溶液緩慢滴加到不同濃度的 CS 溶液中。APC 的整個製備過程均在室溫下進行。兩種溶液混合後，將初步混合物以 5000 rpm 離心 15 分鐘。將上層澄清液去除後，沉澱物重新懸浮在 DI 水中並重新離心。過程重複三次後得到的最終沉澱物就是所要的 APC 奈米粒子。並且根據材料組分不同分成 APC1, APC2, 以及 APC3。

表 2.1. 各種重量濃度比的 AP 和 CS 製備的各種 APC 奈米粒子。

| Abbreviated names | AP /mg·mL ⁻¹ | CS /mg·mL ⁻¹ |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|
| APC1 | 1.0 | 0.5 |
| APC2 | 1.0 | 0.75 |
| APC3 | 1.0 | 1.0 |



2.3. APC 奈米粒子優化

APC1, APC2, 以及 APC3 的 Polydispersity index (PDI)、流體動力學直徑和 zeta 電位由奈米粒子分析儀 (Delsa Nano, Beckman Counter) 在 25 °C 下浸泡在 DI 水中測定。以選擇之後進行實驗的材料組分。

2.4. APC 奈米粒子形態和熱性質

2.4.1. 穿透式電子顯微鏡 (Transmission electron microscope, TEM)

準備酸性 (pH = 4.0)、中性 (pH = 7.4)、以及鹼性 (pH = 10.0) 三種環境的 DI 水，並將 APC 奈米粒子浸泡在 DI 水中七天。再另外準備剛浸泡中性 DI 水的 APC 奈米粒子。總共四管觀測材料。不同環境和不同天數的 APC 奈米粒子形態和尺寸用穿透式電子顯微鏡 (Hitachi H-7100, Japan) 觀察並通過圖像進行分析以及尺寸估計。

2.4.2. 热重分析儀 (Thermogravimetric analysis, TGA)

分別準備 AP、CS 和冷凍乾燥的 APC 奈米粒子，測量樣品的熱穩定性和重量損失通過熱重分析儀 (TA Instruments Q50) 以在氮氣環境下以 10 °C/min 的加熱速度從 25 °C 加熱到 800 °C 進行測量。

2.4.3. 差示掃描量熱儀 (Differential scanning calorimetry, DSC)

分別準備 AP、CS 和冷凍乾燥的 APC 奈米粒子各 3.5 mg，將測量樣品以壓錠機分別密封於樣品盤中，並以差示掃描量熱儀 (TA Instruments Q20, USA) 在氮

氣環境下以 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升溫至 150°C 進行測量。



2.5. 抗菌實驗 (哉羽學長操作)

使用標準微量稀釋法測試 AP、CS 和 APC 奈米粒子的抗菌活性，該方法用以確定最小抑菌濃度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)。試驗菌為表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, ATCC®12228TM) 和大腸桿菌(*Escherichia coli*, ATCC®23815TM)，分別為革蘭氏陽性菌和革蘭氏陰性菌。這些細菌在 37°C 的 Luria-Bertani (LB) 培養液中培養 1 天。並用新鮮的 LB 培養液稀釋至 1×10^6 CFU/mL。CS 首先溶解在 1 wt% 乙酸中作為儲備液，濃度為 10 mg/mL。然後用 LB 培養液將原液稀釋至 0.86 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。AP 則是直接溶解在 LB 培養液中，APC 奈米粒子也同樣直接溶解在 LB 培養液中以達到所需濃度 (AP 為 1.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，APC 奈米粒子為 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。將 AP、CS 和 APC 奈米粒子分別置於 24 孔板中，每孔加入 1mL 稀釋菌液，在 37°C 下孵育 1 天。通過微量盤分光光譜儀 (Biolog, model 680) 在 595 nm 處讀取離心後的上層溶液。對照組為未經任何處理的 LB 培養菌。

2.6. 抗病毒評估 (遠東生技公司操作)

抗病毒評估是根據中和試驗 (Neutralization test) 進行的，其中測量了材料對於 Vero 細胞被單純皰疹病毒二型病毒(Herpes Simplex Virus-2)誘導病變效應的抑

制。將密度為每孔 1×10^4 個細胞的 96 孔板中的 Vero 細胞感染 HSV-2 病毒 (嗜菌斑塊形成單位 0.15)，並在由高濃度組成的培養基中用連續濃度的 CS、AP 或 APC 奈米粒子處理。培養基是由葡萄糖 Dulbecco 改良的 Eagle 培養基(HG-DMEM, Gibco, USA)，並補充了 2 wt% 的胎牛血清 (FBS, Gibco, USA)。將密度為每孔 1×10^4 個細胞的 96 孔板中的 Vero 細胞感染 HSV-2 病毒 (嗜菌斑塊形成單位 0.15)，並用連續濃度的 CS、AP 或 APC 奈米粒子處理。將細胞在 37 °C 下孵育 96 小時。接著通過加入 0.5wt% 的甲醛固定板並在室溫下孵育 4 小時。此後，除去甲醛並在室溫下用 0.1 wt% 的結晶紫將孔染色 10 分鐘。最後洗滌 96 孔板並風乾，並用微量盤分光光譜儀 (BioTek, USA) 在 570 nm 處測量每個孔的細胞密度。將病毒誘導的細胞病變效應降低 50% 所需的 CS、AP 或 APC 奈米粒子的濃度表示為 EC₅₀。

2.7. 載藥機制

載藥粒子的後續的處理手法會根據藥物性質而不同，這次實驗選用了三種藥物：親水藥物固綠 FCF、疏水藥物薑黃素、以及大分子蛋白質藥物 HEBR。一開始都是先加入藥物進入 CS 溶液 (0.75mg/mL)，再將 AP 溶液緩慢滴入，藥物濃度為 500 ppm。並以 800 rpm 的速度混合，用於載藥和自組裝成奈米粒子形式。載藥奈米粒子的整個製備過程均在室溫下進行。最後將混合物以 2500 rpm 離心 15 分鐘。最後經過不同處理手法得到的載藥奈米粒子都會通過 2.4.1. 提及的 TEM

檢查載藥 APC 的形態和平均大小。

2.7.1.親水藥物

離心後得到的沉澱物，去除上層澄清液之後，就是載有固綠 FCF 的載藥 APC



奈米粒子(APC-F)。

2.7.2.疏水藥物

離心後得到的沉澱物，去除上層澄清液後將沉澱物重新分散，此懸浮液靜置 1 小時，得到的上清液就是載有薑黃素的載藥 APC 奈米粒子(APC-C)。

2.7.3.大分子蛋白質藥物

根據以往文獻 [27, 28]，基於大腸桿菌系統建立了 HEBR 的大規模生產。且 HEBR 屬於光敏蛋白，因此所有與 HEBR 相關的實驗均避光。得到的離心沉澱物，去除上層澄清液之後，就是載有 HEBR 的載藥 APC 奈米粒子(APC-H)。

2.8.載藥效率和包封效率

跟包載藥物相同的情況，根據不同的藥物包載方法，分析程序略有不同。對於親水藥物固綠 FCF 和大分子蛋白質藥物 HEBR，這兩種藥物只要通過離心後的上層澄清液就能得到包載藥物的量。由於疏水藥物薑黃素的載藥過程不同，未負載藥物被分為兩部分，包括離心後的上清液和重新分散液中的沉澱物。離心後的上層澄清液用微量盤分光光譜儀 (SpectraMax M5，Molecular Devices，USA) 測量上清液中，以獲得藥物在特定波數下的吸光度，通過檢量線計算，得到未包

載的殘留藥物的重量。每種藥物都有在特定波數下的吸收，薑黃素為 425 nm，

HEBR 為 551 nm，固綠 FCF 為 622 nm。而重新分散液中的沉澱物則是透過烘乾

直接得到乾重。奈米粒子的載藥效率(loading efficiency)和包封效率(encapsulation

efficiency)計算公式如下：

$$\text{Loading efficiency} = (W_I - W_U)/W_{APC} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Encapsulation efficiency} = (W_I - W_U)/W_I \times 100\% \quad (2)$$

其中 W_I 是用於製備奈米粒子的藥物的初始重量， W_U 是未包載藥物的總重量，

而 W_{APC} 是空 APC 奈米粒子的重量。

2.9. 藥物釋放效率

在 37 °C下研究了 APC-F 和 APC-C 奈米粒子的藥物釋放。由於考量 HEBR 的熱穩定性，在 4 °C下研究了 APC-H 的藥物釋放。這些實驗中使用的環境溶液也考慮了分散特性，APC-F 使用 PBS，而 APC-C 使用 PBST(含 5% 聚山梨醇酯-20 的 PBS 緩衝液)，pH 值分別為 4.0、7.4 和 10.0。而考慮到 HEBR 的活性，選擇 2-(N-嗎啉基)乙礦酸 (MES) 緩衝液作為 APC-H 的釋放環境，MES 緩衝液的 pH 分別為 6.5、7.4 和 8.5。在 APC-F 和 APC-C 的情況下，將載藥奈米粒子添加到 75 mL 的 PBS 或 PBST 中。而 APC-H 則是加進 3 mL MES 緩衝溶液。通過 2.7.節中提到的微量盤分光光譜儀測量的吸光度，使用相同的計算方法在預設時間獲得釋放到環境溶液中的藥物重量。藥物釋放率計算如下：

$$\text{Drug release} = \frac{W_a}{W_0} \times 100\% \quad (3)$$

其中 W_a 是在預設時間點從奈米粒子釋放到環境溶液中的藥物重量， W_0 是包載藥物的總重量。

2.10. 藥物釋放動力學

為了研究載藥 APC 奈米粒子的藥物釋放動力學，根據以往文獻選擇了四種常見的模型進行擬合，分別是一級動力學模型、Hixson-Crowell 模型、Higuchi 模型、以及 Korsmeyer-Peppas 模型 [29-32]。

2.10.1. 一級動力學模型

一級動力學模型將藥物釋放速率描述為系統中剩餘藥物濃度的函數。它假定釋放速率與系統中殘留的藥物量成正比，可以用來描述藥物從不同類型系統中的釋放。公式如下：

$$\frac{dM}{dt} = -kM \quad (3)$$

其中 M 是在時間 t 時系統中剩餘的藥物量， k 是釋放速率常數。

2.10.2. Hixson-Crowell 模型

Hixson-Crowell 模型基於這樣的假設，即藥物從系統中的釋放取決於顆粒的表面積，顆粒的面積正比於顆粒體積的立方根。用於描述釋放過程中表面積減小的藥物顆粒釋放曲線。公式如下：

$$\sqrt[3]{M_0} = \sqrt[3]{M} + kt \quad (4)$$

其中 M_0 是系統中藥物的初始量， M 是在時間 t 時系統中剩餘的藥物量， k 是釋放速率常數。



2.10.3. Higuchi 模型

Higuchi 模型描述了藥物從系統中的釋放動力學，其中釋放速率與時間的平方根成正比。該模型通常用於描述藥物從固體基質和半固體基質中的釋放，速率與釋放介質接觸的基質表面積成正比。公式如下：

$$M_t = k\sqrt{t} \quad (5)$$

其中 M_t 是在時間 t 釋放的藥物量， k 是釋放速率常數。

2.10.4. Korsmeyer-Peppas 模型

Korsmeyer-Peppas 模型基於這樣的假設，其中釋放速率是時間和藥物釋放分數的函數。即藥物從系統中的釋放取決於顆粒的表面積和藥物通過顆粒基質的擴散。可用於描述藥物從包括奈米顆粒在內的不同類型系統中的釋放。公式如下：

$$\frac{M}{M_0} = kt^n \quad (6)$$

其中 M_0 是系統中藥物的初始量， M 是在時間 t 時系統中剩餘的藥物量， k 是釋放速率常數。 n 是釋放指數，描述了藥物釋放的機制。如果 $n=0.43-0.5$ ，為 Fickian 擴散，如果 $n < 0.43$ ，則為 Quasi-Fickian 擴散，如果 $n > 0.5$ ，則為 non-Fickian 擴散。

2.11. 細胞實驗 (俊鵬學長操作)

使用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma-Aldrich, USA) 測定用於估計奈米粒子的細胞活力和增殖。



2.11.1 人上皮肺癌細胞

人上皮肺癌細胞 (A549) 在 Roswell Park Memorial Institute 培養基 (RPMI 1640, Gibco, USA) 中培養。培養基含有 1% 青黴素-鏈黴素 (Gibco, USA) 和 10% 胎牛血清 (FBS, Gibco, USA)。將肺癌細胞接種在 24 孔板中，密度為每孔 8×10^3 個細胞。然後，加入 AP (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、APC 奈米粒子 (140 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 或 APC-H (180 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，其中 HEBR 佔 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。24 和 48 小時後，每孔加入 300 μL CCK-8 溶液。使用 2.7. 節中提到的微量盤分光光譜儀在 450 nm 處測量每個孔的上清液。而沒有經過任何處理的細胞，作為對照組 (細胞培養在組織培養聚苯乙烯板，Tissue culture polystyrene plate, TCPS)。

2.11.2 神經幹細胞

源自成年小鼠大腦的神經幹細胞 (Neural stem cells, NSCs) [33] 在培養基中製備以獲得細胞懸浮液和計數。培養基為葡萄糖 Dulbecco 改良 Eagle 培養基 (Gibco, USA) 和 Ham's F-12 (Gibco, USA)，添加 10% FBS (Gibco, USA)，400 mg/mL G418 (Invitrogen, USA) 和 1% 青黴素-鏈黴素-兩性黴素 (Gibco, USA)。將 NSCs 接種在 24 孔板中，密度為每孔 8×10^3 個細胞。然後，加入 AP (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、APC 奈米粒子 (140 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 或 APC-H (180 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，其中 HEBR 佔 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。24 和 48 小時後，每孔加入 300 μL CCK-8 溶液。使用 2.7. 節中提到的微量盤分光光

譜儀在 450 nm 處測量每個孔的上清液。而沒有經過任何處理的細胞，作為對照組(TCPS)。



2.12. 統計學分析

實驗數據表示為平均值±標準差。數據的統計分析通過單向方差分析(ANOVA)進行。小於 0.05 的 p 值被認為具有統計學意義。

第三章 實驗結果

3.1. 複合奈米粒子優化及奈米粒子分析儀分析

APC 奈米粒子通過在室溫下混合 AP 溶液和 CS 溶液製備而成。APC 奈米粒子的形成機制和響應具有不同 pH 值的環境的潛在結構變化如圖 3.1. 所示。還評估了 APC 製備過程中，將 CS 提高至 1.5 mg/mL 的濃度，但生成的奈米粒子不穩定，混合後立即聚集形成大的、不均勻的沉澱物，如圖 3.2.。

將成功製備的 APC 奈米粒子重新分散在 DI 水中進行觀察。APC 奈米粒子的流體動力學直徑隨浸入 DI 水中時間的變化如圖 3.3.A 所示。表 3.1. 總結了各種 APC 奈米粒子的初始 zeta 電位和 PDI。在第 0 天，APC1 和 APC3 奈米粒子的流體動力學直徑小於 APC2 奈米粒子。7 天後，與其他兩組相比，APC2 奈米粒子隨時間變化的流體動力學直徑 (~ 164 nm) 最穩定；APC3 奈米粒子的流體動力學直徑逐漸增加到 190 nm；APC1 奈米粒子的流體動力學直徑在第一天略有下降，然後在接下來的幾天增加，但總體尺寸 (~ 138 nm) 仍然小於 APC2 奈米粒子。此外，APC2 奈米粒子在不同 pH 值環境下的流體動力學直徑的變化如圖 3.3.B 所示。14 天後，APC2 在中性條件下 ($\text{pH}=7.4$) 的直徑幾乎保持不變，約為 166 nm；在酸性 ($\text{pH}=4.0$) 條件下，APC2 奈米粒子的流體動力學直徑緩慢增加，14 天後達到 295 nm；在鹼性 ($\text{pH}=10.0$) 條件下，APC2 奈米粒子的流體動力學直徑比在中性環境中大四倍。且因為在鹼性環境中觀察到 APC2 有大量非懸浮沉澱，7 天後粒子分析儀已經檢測不到有效流體動力學直徑數據。這種現



象的圖像顯示在圖 3.4. 中。優化後選擇 APC2 的奈米粒進行後續載藥實驗，簡稱 APC。

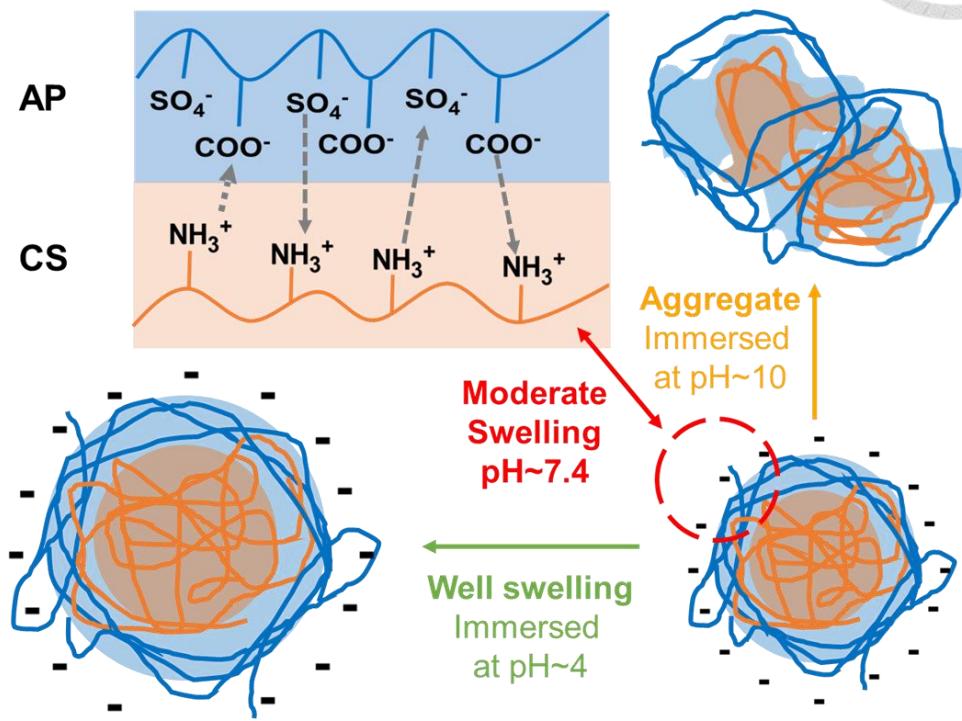


圖 3.1. APC 奈米粒子的形成機制和在不同 pH 值環境中潛在的結構變化。



圖 3.2. AP:CS 比例為 1:1.5 時的 APC 沉澱。APC 系統中 CS 的濃度進一步升高至 1.5 mg/mL 可能會導致奈米粒子形成大的聚集體，這使得奈米粒子大小不穩定且難以測量。

表 3.1. 用不同質量比的 AP 和 CS 製備的 APC 奈米粒子的 zeta 電位和 PDI。

| Samples | Zeta potential | PDI |
|---------|---------------------|-------|
| APC1 | -17.3 ± 1.2 mV | 0.278 |
| APC2 | -20.31 ± 1.6 mV | 0.256 |
| APC3 | -16.6 ± 0.9 mV | 0.271 |

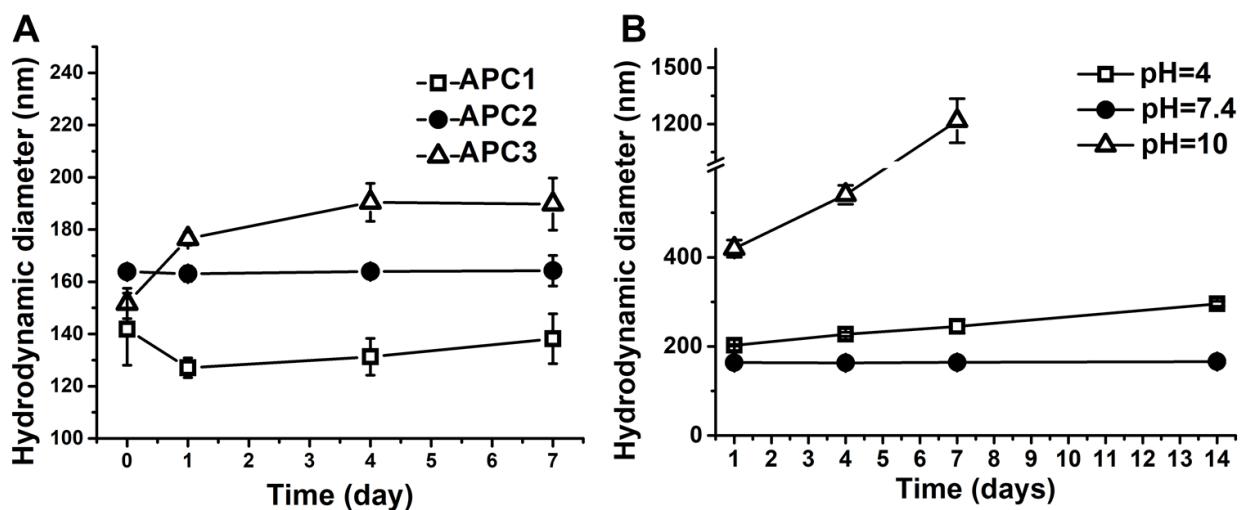


圖 3.3. APC 奈米粒子的穩定性和 pH 敏感性。通過流體動力學直徑與浸泡在環

境中的天數進行觀察。(A) 在 4 °C 下 7 天的時間內，檢測不同組成的 APC 奈米

粒子的流體動力學直徑隨浸泡時間的變化。(B) 檢測 APC2 奈米粒子在不同 pH

值下，25 °C 的環境在 14 天內的流體動力學直徑的變化。



圖 3.4. APC2 在鹼性溶液中的沉澱。7 天後，因為 APC 奈米粒子的結構崩解，粒子因此聚集並導致沉澱發生。

3.2. APC 奈米粒子表徵

3.2.1. 穿透式電子顯微鏡 (TEM) 分析

穿透式電子顯微鏡 (TEM) 觀測了在不同 pH 值下的 DI 水環境，第 0 天和第 7 天的奈米粒子的尺寸，基本上所有數值都與奈米粒子分析儀獲得的數據一致，具有參考性。在圖 3.5.A 中，第 0 天的 APC 奈米粒子在中性環境中 ($\text{pH} = 7.4$) 中呈球形，直徑約為 151 nm。第 7 天後，在酸性環境中 ($\text{pH} = 4.0$ ，圖 3.5. B)，APC 奈米粒子發生變形，呈現出結構鬆散、不規則的多邊形球形，直徑約為 207 nm。在中性環境(圖 3.5. C)中，APC 奈米粒子表現出良好的穩定性以保持球形和尺寸(保持在 153 nm)。此外，鹼性環境 ($\text{pH} = 10.0$) 中的奈米粒子有明顯的聚集，無法保持其形狀，如圖 3.5.D 所示。

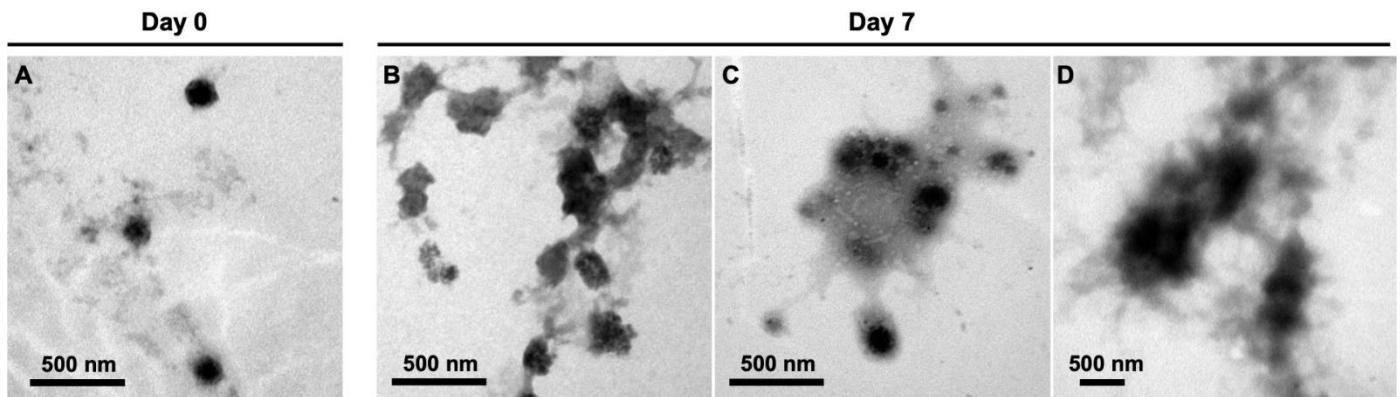


圖 3.5. APC 奈米粒子的 TEM 圖像。APC 奈米粒子在(A)第 0 天進行觀察，並在 (B) pH 4、(C) pH 7 和 (D) pH 10 下浸泡 7 天進行觀察。

3.2.2. 热重分析儀 (TGA) 和差示掃描量熱儀 (DSC) 分析

AP、CS 和 APC 奈米粒子的熱性質通過 TGA 和 DSC 法進行評估。TGA 曲線如圖 3.6.A 所示。AP 曲線顯示熱轉變發生在兩個溫度範圍內，即 255-400 °C 和 500-655 °C。這與 CS 的熱轉變特徵相似 (250-425 °C 和 550-725°C)。相比之下，APC 奈米粒子在溫度達到 750 °C 之前沒有明顯的質量損失。AP、CS 和 APC 奈米粒子的 DSC 曲線如圖 3.6.B 所示。AP 在 120°C 處表現出比較明顯的吸熱寬帶。而 CS 在 125°C 處表現出吸熱寬帶。APC 的吸熱值是三組中最小的，除了在 120°C 處的吸熱吸收帶外，在 45°C 處還觀察到一個額外的小吸熱峰。

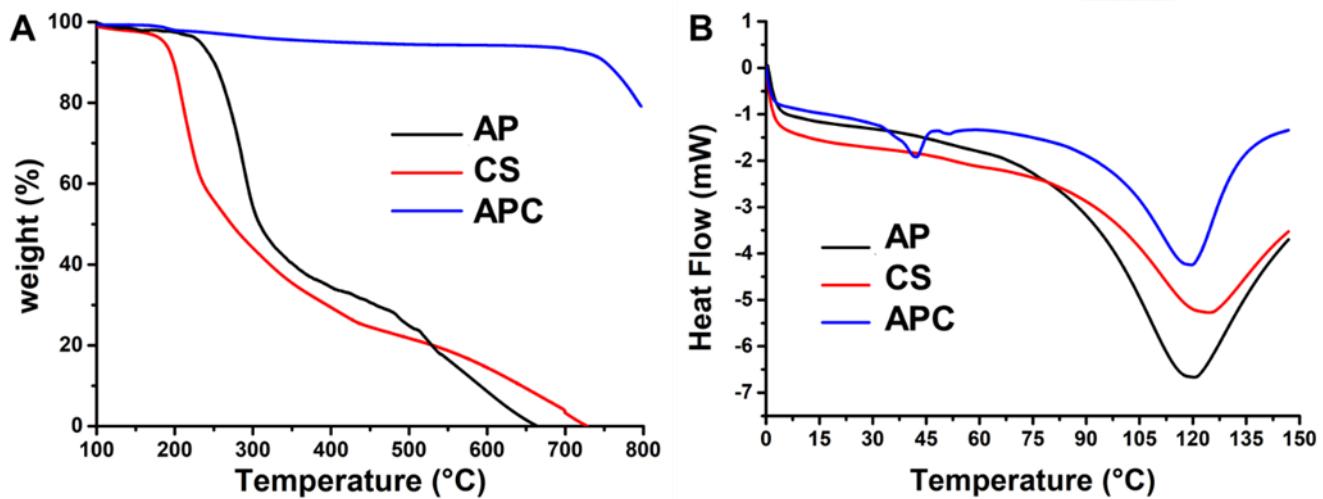


圖 3.6. TGA 和 DSC 分析的材料熱性質。透過 (A) TGA 的質量損失曲線以及 (B) DSC 的熱量吸收曲線分析 AP、CS 和 APC 奈米粒子的熱性質。

3.3. 抗菌特性分析

評估了 CS、AP 和 APC 奈米粒子對革蘭氏陰性菌（大腸桿菌）和革蘭氏陽性菌（表皮葡萄球菌）的抗菌活性。對照組、CS、AP 和 APC 奈米粒子的結果如圖 3.7. 所示。圖 3.7. A 和圖 3.7. B 中的數據顯示 CS 分別消滅了約 17% 的大腸桿菌和約 60% 的表皮葡萄球菌。而 AP 分別消滅了近 20% 的兩種菌，沒有明顯的特異性。與原材料相比，APC 奈米粒子對大腸桿菌具有更好的抗菌活性，可消滅約 30%。儘管 APC 減少表皮葡萄球菌的能力略遜於 CS，但 APC 奈米粒子仍保留了相當大的抗菌效果（消滅了約 45%）。

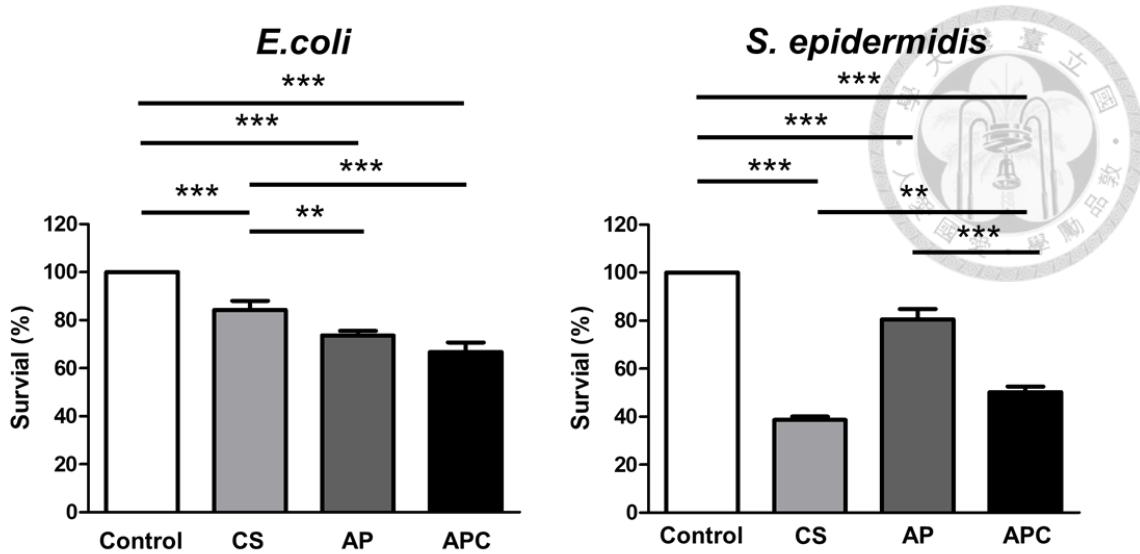


圖 3.7. 各材料對大腸桿菌和表皮葡萄球菌的抗菌譜。選擇了(A)大腸桿菌作為革蘭氏陰性菌以及 (B) 表皮葡萄球菌作為革蘭氏陽性菌。經過 CS、APC 和 APC 奈米粒子處理後，透過不同吸光度，將各組別細菌數量與對照組 (未處理的細菌) 的吸光度值進行比較並標準化數值，將存活率標示為百分比 (%)。在所有組別中

* $p \leq 0.05$ 、 ** $p \leq 0.01$ 、 *** $p \leq 0.001$ 。

3.4. 抗病毒特性分析

進行了 CS、AP 和 APC 奈米粒子的抗病毒評估，以檢查上述材料是否具有抑制由單純皰疹病毒二型 (HSV-2) 誘導的 Vero 細胞的細胞病變作用的能力。使用噬菌斑測定 [27] 評估病毒滴度。在圖 3.8.A 中，CS 被證明不具有病毒抑制作用。在圖 3.8.B 和圖 3.8.C 中，AP 和 APC 奈米粒子均顯示出對病毒的有效抑制和保護細胞活力。經 CS 處理的 Vero 細胞存活率低於 2%，這種低細胞活力

無法獲得有效的半數最大有效濃度 (EC₅₀) 值。AP 處理細胞組的 EC₅₀ 為 0.1607 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，說明純 AP 在很低的含量下就具有有效抑制 HSV-2 的活性。APC 奈米粒子組的 EC₅₀ 為 6.596 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，略高於純 AP 組，但也處於較低濃度，這些結果表明 APC 具有良好的抗病毒性能。

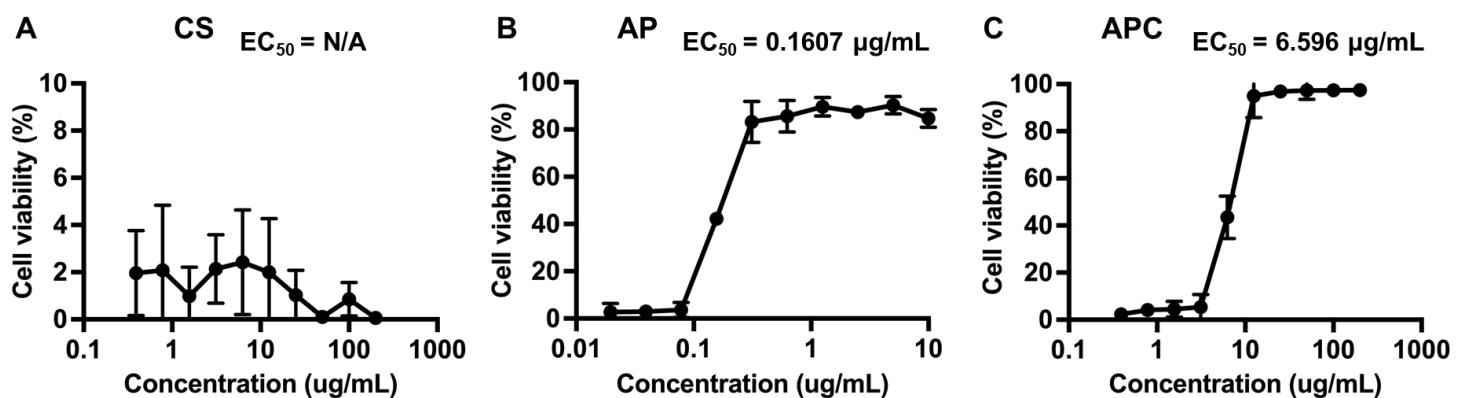


圖 3.8. 不同材料濃度對於病毒的抗病毒活性。在 37°C 下將 HSV-2 感染 Vero 細胞後，添加不同濃度的(A) CS、(B) AP 和 (C) APC 奈米粒子，以評估抗病毒能力和有效濃度。通過中和試驗評價各組的抑制效率，活的殘留 Vero 細胞表示為細胞存活率。

3.5. 載藥奈米粒子分析

3.5.1. 藥物型態觀察

在 37 °C 下檢查兩種載有不同模型藥物的 APC 奈米粒子的藥物釋放曲線。將 APC-F 浸入 PBS 緩衝液中，將 APC-C 浸入 PBST 緩衝液中。同時，在 4°C

MES 緩衝液中檢測了 APC-H 的藥物釋放曲線。圖 3.8.是用於載藥 APC 奈米粒子的釋放藥物檢量線曲線。

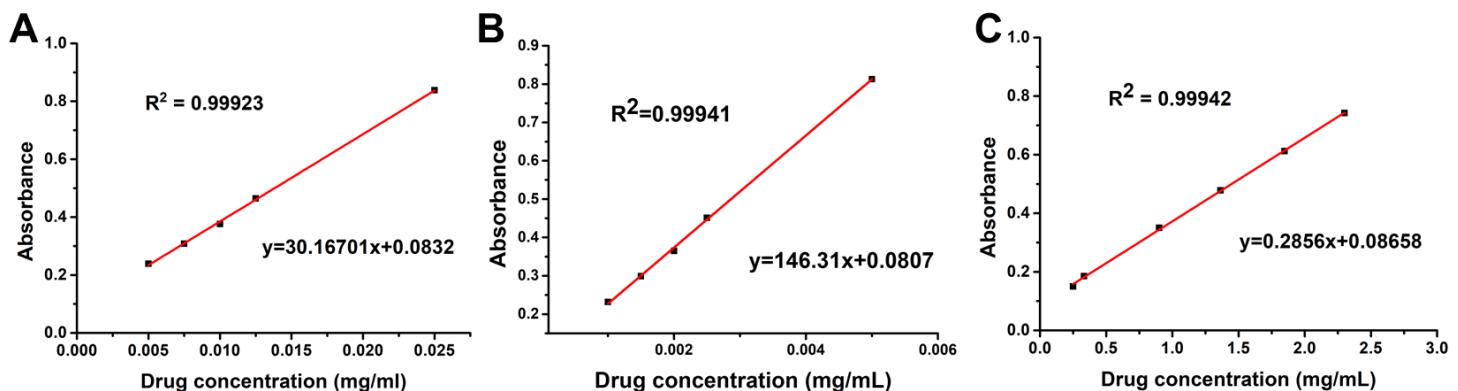


圖 3.9.固綠 FCF、薑黃素和 HEBR 的檢量線。

通過 TEM 觀察第 0 天分散於 DI 水中的三種載藥 APC 奈米粒子的形態。圖 3.8. 中，APC-F 呈中空球形，直徑約為 189 nm (圖 3.9.A)，大於空白 APC 奈米粒子 (~151 nm)；APC-C 呈實心球形，直徑約為 65 nm (圖 3.9.B)，小於空白 APC 奈米粒子；HEBR 是具有三維柱狀結構的蛋白質藥物，所以從圖 3.9.C 可以發現，APC-H 的形狀是不規則的，平均粒徑為 1420 nm，比空白 APC 奈米粒子大 9 倍。

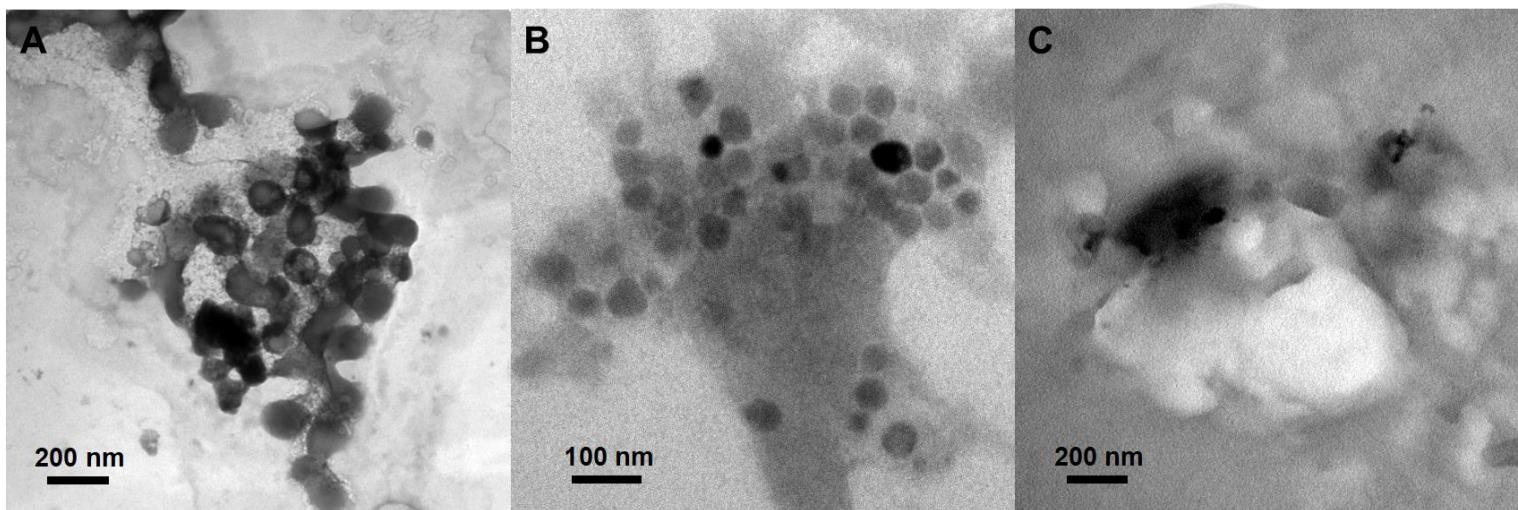


圖 3.10. 初始載藥 APC 奈米粒子的 TEM 圖像。分別為 (A) APC-F, (B) APC-C 和 (C) APC-H。

3.5.2. 藥物釋放分析

APC-F 和 APC-C 在不同 pH 值下的藥物釋放如圖 3.9. 所示。在圖 3.9. A 中，APC-F 在三種不同 pH 值下的釋放曲線在前 12 小時內大致相似。pH 7.4 下的藥物釋放在隨後的 24 小時最快。直到 48 小時後，APC-F 在酸性環境中的釋放效率超過了 APC-F 在中性環境中的釋放效率。168 小時後，APC-F 在酸性環境中的釋放效率達到 27%，比中性環境高 5%，比鹼性環境高 10%。在圖 3.9.B 中，APC-C 在不同 pH 值下的釋放曲線在前 48 小時相似。在接下來直到第 168 小時的時間內，APC-C 奈米粒子在酸性環境中表現出比其他兩種條件下更快的藥物釋放速率。

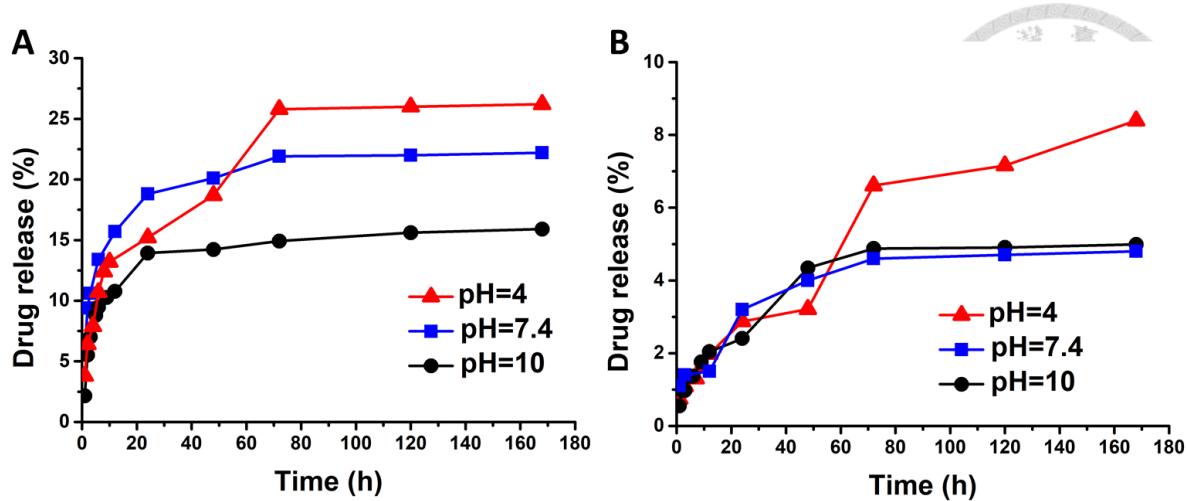


圖 3.11. 不同 pH 值下 APC-F, APC-C 的釋放曲線。(A) APC-F (B) APC-C

APC 奈米粒子包封 HEBR 的可能機制如圖 3.12. 所示。APC-H 在不同 pH 值下的釋放曲線如圖 3.13. 所示。在 24 小時內，APC-H 在 pH 6.5 MES 緩衝液中的釋放效率始終為高於 pH 7.4 和 pH 8.5 MES 緩衝液。APC-H 在 pH 7.4 和 pH 8.5 緩衝液中的釋放顯示出類似的趨勢。APC-H 在酸性環境中的最終釋放效率(~60%) 比在中性或鹼性環境中高出近 10%。

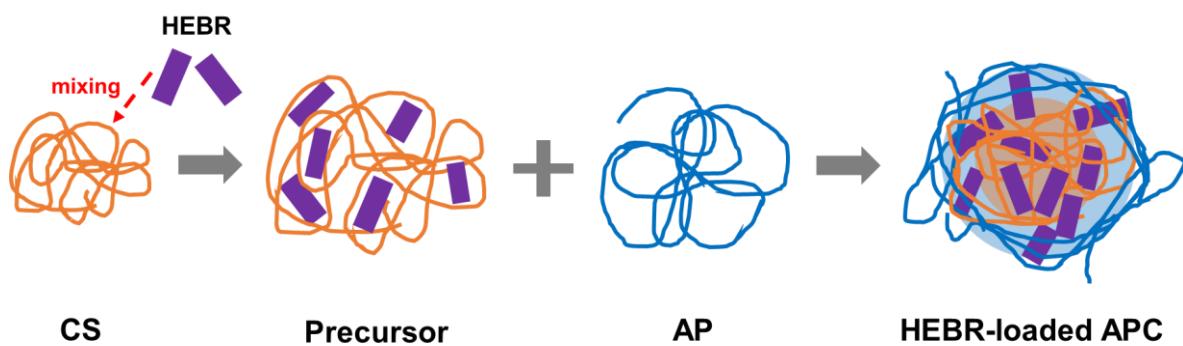


圖 3.12. 包載 HEBR 的 APC 奈米粒子可能機制。

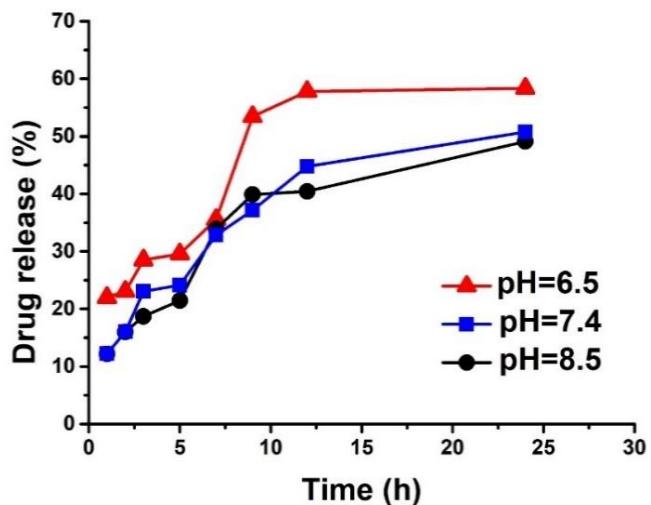


圖 3.13. 不同 pH 值下 APC-H 的釋放曲線。

3.5.3. 藥物釋放動力學分析

表 3.2. 總結了不同環境下各類載藥 APC 複合奈米粒子的各種動力學模型擬合數據， R^2 代表相關係數值。Korsmeyer-Peppas 模型符合最佳相關性，其中所有組的相關係數均大於 0.9，釋放指數 $n \sim 0.45$ 。

表 3.2. 所有載藥 APC 奈米粒子在不同 pH 值下的藥物釋放動力學。其中 R2

作為每個動力學模型的相關係數值。



R^2

| Drug | pH value | 1 st -order | Hixson-Crowell's | Higuchi's | Korsmeyer-Peppas's |
|------------|----------|------------------------|------------------|-----------|--------------------|
| Fast green | 4.0 | 0.8689 | 0.7976 | 0.9419 | 0.9619 |
| | 7.4 | 0.6127 | 0.6445 | 0.8710 | 0.9578 |
| | 10.0 | 0.6780 | 0.7437 | 0.8922 | 0.9474 |
| Curcumin | 4.0 | 0.9215 | 0.9000 | 0.9354 | 0.9539 |
| | 7.4 | 0.8801 | 0.8610 | 0.9448 | 0.9922 |
| | 10.0 | 0.7690 | 0.7163 | 0.9073 | 0.9681 |
| HEBR | 6.5 | 0.8511 | 0.8769 | 0.9082 | 0.9278 |
| | 7.4 | 0.9703 | 0.9042 | 0.9723 | 0.9765 |
| | 8.5 | 0.9329 | 0.9082 | 0.9389 | 0.9470 |

3.6. 載有 HEBR 的奈米粒子對細胞行為的作用

根據以往 HEBR 抑制某些細胞增殖的生物活性數據 [26]，選擇 A549 細胞和 NSCs 作為藥物釋放治療的標靶細胞。

3.6.1 肺癌細胞

在圖 3.14. A 中，APC-H 對肺癌細胞表現出最佳抑制作用(抑制 40%)。使用 APC 奈米粒子對肺癌細胞的生長也有一定程度的抑制。

3.6.2 神經幹細胞

在圖 3.14.B 中 AP、APC 和 APC-H 的存在顯示出對 NSC 增殖的促進作用，如圖 3.14.B 所示。其中 APC-H 的促進作用最小(圖 3.14.B)，這可能是由於 HEBR 的生物活性在一定程度上抑制了 NSCs 的增殖 [35]。

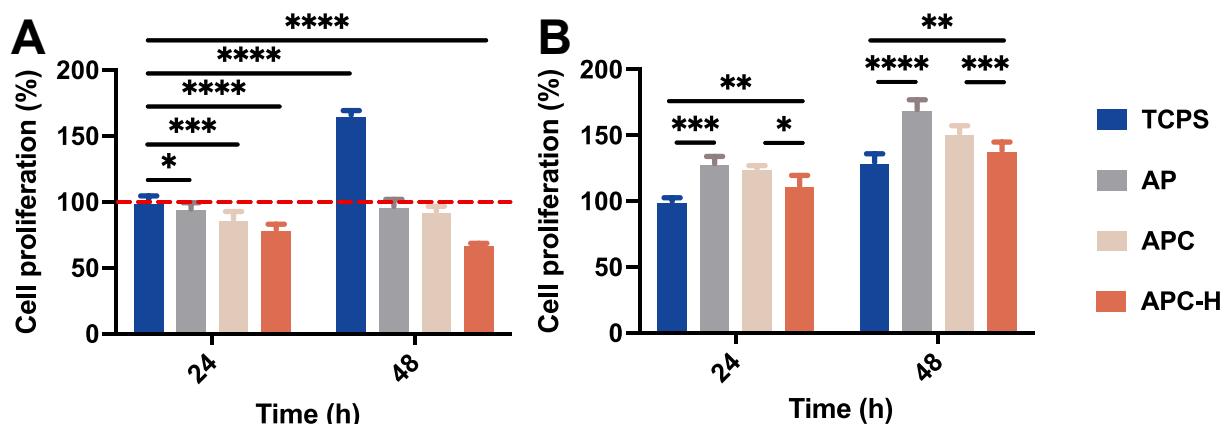


圖 3.14. TCPS(對照組)、AP、APC 和 APC-H 在 24 小時和 48 小時時測量的(A)

肺癌細胞和(B)神經幹細胞的增殖 CCK-8 測定。標準化組為 24 小時 TCPS 組的

吸光度值，並將細胞增殖表示為百分比(%)。所有組別的 * p ≤ 0.05 、 ** p ≤

0.01 、 *** p ≤ 0.001 和 **** p ≤ 0.0001 。

第四章 討論



CS 本身不溶於水，必須將其進行改質或與其他材料結合以提高親水性，以克服不溶於水所造成的限制 [36, 37]。本研究的 APC 奈米粒子製備是透過材料間的靜電力結合，AP 中存在帶負電的硫酸基團以及羧酸基團，而 CS 具有帶正電的胺基團。由於靜電力不是化學鍵，不會改變材料的化學結構，因此可以很好地保留材料的原有特性。根據 APC 奈米粒子的在水中好的分散性以及測得的 zeta 電位 (-20.31 mV)，可以推測合成的 APC 奈米粒子是以 AP 為主導的奈米粒子。因為 AP 是一種親水並帶負電的材料，而相對疏水的 CS 大部分被外部的 AP 包圍。在優化過程中，發現過量的 CS 可能會導致結構變得不穩定。當 CS 與 AP 的重量濃度比例達到 1.5:1 時，在環境中會出現明顯的沉澱。這是由於 CS 的疏水性導致，當 CS 超過一定濃度，即使在親水性 AP 的存在下，也會使得 APC 複合粒子的懸浮能力變差。其他系統中也報導了類似的觀察結果，粒子尺寸在隨著更高的 CS 比例會變得更大，達到微米級別後，最終聚集沉澱 [24]。

觀察了 APC 奈米粒子在不同 pH 值下的尺寸變化。在生理中性環境(pH = 7.4)中，APC 奈米粒子的形態與尺寸在七天之後都能保持穩定，這是令人驚訝的結果。根據之前的論文，與同樣是硫酸化多醣的肝素與 CS 的複合奈米粒子無法保持穩定結構，並且當 pH 值高於 6.5 時可能會分解並崩裂 [38]。文獻表明，CS 在 pH 值大於 6.5 時會去質子化，並逐漸從已經電離的胺基團中失去正電荷 [39, 40]。由於來自 CS 的正電荷數量降低，會影響其透過電性與其他材料的結合 [41]。相

比之下，此研究中的 APC 奈米粒子在 pH 值高於 6.5 時顯示出穩定的尺寸和形態，這可能與 APC 的製備方法和材料本身性質有關。在製作過程中，CS 預先在 pH~6.0 的環境中電離，然後在合適的環境中與同樣已經電離的 AP 結合。因此，AP 和 CS 之間的靜電相互作用穩定了 APC 的結構。除了極端鹼性環境外，才有可能會發生由 CS 主導的去質子化產生結構剝離的變化 [42]。同時，AP 本身也會有融脹的行為，儘管 CS 在 pH~6.5 以上可能會發生去質子化，但 APC 奈米粒子的結構由兩種聚合物支撐，因此在中性環境下才能保持大小不變。而酸性環境中的主要尺寸變化可歸因於 CS 在酸性環境中的溶脹 [43]。在鹼性環境中的主要尺寸變化可能是由於去質子化後 CS 的結構崩解導致進一步聚集。

在本研究中，對革蘭氏陽性表皮葡萄球菌和革蘭氏陰性大腸桿菌測試了抑菌能力。在文獻中，CS 通常被認為對革蘭氏陰性菌具有良好的抗菌活性，因為 CS 的正電荷密度導致 CS 對革蘭氏陰性菌更有效的相互作用 [44, 45]。而後，通過本次實驗可以初步確認 AP 對兩種類型細菌的生長抑制相近，沒有明顯的選擇性。AP 的抗菌機制可能是由於其中存在負電基團。這些帶負電荷的極性基團很容易與細菌代謝中的一些重要陽離子進行螯合或相互作用，從而擾亂細菌環境中穩定的氫鍵 [46, 47]。即使 CS 對革蘭氏陽性菌的抑制效果不佳，且 AP 對於兩種兩種類型細菌的抑制效果相差不大，但 APC 奈米粒子卻對大腸桿菌和表皮葡萄球菌均表現出相當好的抑制效果。推測可能是因為這很可能是由於 CS 和 AP 的協同作用，可能導致細菌細胞膜破裂或阻止細菌的代謝循環 [48]。此外，APC 奈

米粒子對表皮葡萄球菌的抑制作用比 CS 略差，可能與 APC 奈米粒子的核殼結構有關。由於 CS 更多地集中在奈米粒子內部，因此它無法有效地參與抗菌過程。

這樣抗菌結果也側面證明了我們對於粒子結構的猜測是有參考性的。

研究材料對於 HSV-2 誘導的 Vero 細胞所產生的病理狀態，用以觀察 CS、AP 和 APC 奈米粒子是否具有有效的病毒抑制作用。結果表明，CS 本身沒有有效的病毒抑制作用。另一方面，AP 由於其豐富的負電荷，尤其是來自硫酸基團的負電荷，具有明顯的抗病毒特性 [49]，可以與病毒粒子相互作用，抑制吸附，阻礙其與細胞受體結合，阻止病毒侵入宿主細胞，從而影響病毒的生命週期 [50, 51]。此外，AP 可以增強宿主的免疫反應，誘導免疫因子加速病毒清除 [52, 53]。通過將 APC 奈米粒子的 EC_{50} ($6.596 \mu\text{g/mL}$) 與其他材料進行比較，APC 奈米粒子表現出相當有競爭力的抗病毒特性 [54, 55]。但 APC 奈米粒子的抗病毒作用略遜於 AP，有可能是因為 APC 核殼結構的影響。AP 上的硫酸基團的濃度與病毒抑制有關 [56]，但 AP 與 CS 結合會佔據 AP 的硫酸基團，間接影響 APC 奈米粒子的病毒抑制作用。不過 APC 奈米粒子仍擁有抗病毒的特性也與我們推測的核殼結構有關，AP 處於殼外層，除此之外，APC 粒子的 zeta 電位為負，這意味著 AP 部分的負電基團沒有被中和並暴露在外，使其更容易與病毒結合反應。

APC 奈米粒子作為一種多功能複合材料，不但有利於自身作為單一奈米粒子的應用，而且還具有其他應用潛力，例如藥物載體 [57, 58]。在傳統療法中，藥物通常用於緩解身體狀況。疾病週期通常與復雜的症狀、免疫缺陷、治療後的

併發症以及副作用有關，例如細菌或病毒感染 [59-62]。這些症狀需要同時治療，並不是使用一種功能單一的藥物就能解決 [63]。在這種情況下，具有抗菌和抗病毒能力的 APC 奈米粒子可以減少多種藥物的使用，以解決藥物過量和藥效衝突的問題 [64, 65]。APC 奈米粒子的使用可以在疾病週期內提供更廣泛的治療選擇 [66]。在這項研究中，採用三種藥物作為模型藥物，代表三種不同類別的藥物：親水性藥物的固綠 FCF、疏水性藥物的薑黃素和大分子蛋白藥物的 HEBR。用以評估不同類型的藥物包封在 APC 奈米粒子中的可行性。在 APC 的載藥系統中，可以透過材料的正負電以及親疏水性結合。例如，固綠 FCF 和 HEBR 作為帶負電荷的藥物，在製備過程中與帶正電荷的 CS 相互作用；而薑黃素透過與疏水 CS 相似的性質結合。CS-藥物前驅複合物隨後被 AP 鏈覆蓋，進一步自組裝成奈米粒子。

針對了 APC 奈米粒子對於不同藥物在不同 pH 值的介質的釋放進行了研究，並評估載藥 APC 奈米粒子的 pH 敏感釋放行為。結果顯示，無論藥物類型如何，在酸性條件下均表現出最佳的釋放效率。空白未載藥的 APC 奈米粒子在酸性環境中放置 7 天後的形態和結構變化表明，AP 在酸性環境中在電性上有了更強的負電作用，會將 CS 上與藥物結合的位點進行搶奪，這樣的置換加快了釋放速率 [67]。此外，CS 的構象變化導致載藥 APC 奈米粒子具有足夠的響應性，因為 CS 在酸性環境的融脹，結構鬆散的載藥 APC 奈米粒子會加速藥物釋放 [58]。而在中性環境中較低的釋放速率可能歸因於 APC 奈米粒子的高穩定性，很難通過

結構變化進行藥物的釋放。此外，在鹼性條件下，複合奈米粒子中的疏水 CS-藥物核心會與周圍的鹼性水溶液環境相互排斥而收縮。而且 AP 的物理特性使其更親近環境，降低了搶奪藥物與 CS 的結合位點的機率，因此不利於藥物擴散。

研究動力學模型以檢視藥物從 APC 奈米粒子中釋放的機制。本研究使用了四種模型進行對照。根據模型擬合，載藥 APC 奈米粒子的釋放最符合 Korsmeyer-Peppas 模型，相關係數約為 0.95。此外，通過計算指數 n ，證實 Fickian 擴散是 APC 奈米粒子系統中藥物釋放的控制因素，這表明擴散是 APC 系統中藥物釋放的主要機制 [69]。同時，Higuchi 模型的次優相關性 ($R^2 \sim 0.9$) 也支持了當前系統中藥物釋放機制確實是 Fickian 擴散的論點 [70]。最初的藥物快速釋放是由於 APC 奈米粒子表面附近分散的藥物分子在開始時擴散的結果。經過爆發釋放期後，釋放速率降低，主要釋放機制可能已轉變為聚合物侵蝕 [71]。然而，Hixson-Crowell 模型對小分子藥物和大分子藥物顯示出不同的擬合結果。對於小分子藥物，發現 R^2 值低於 0.8，這表明粒子的表面積隨時間變化不大。另一方面，在蛋白質藥物，即大分子藥物中，相關值在 0.9 以上。造成這種差異的可能原因是封裝藥物的大小不同，HEBR 與其他藥物分子之間存在明顯的尺寸差距，這解釋了載有 HEBR 的奈米粒子表面積的明顯變化。

通過 A549 細胞和 NSCs 評估 AP、APC 和 APC-H 的細胞毒性。在先前的文獻中研究了 HEBR 作為游離藥物在處理細胞 24 小時後，可以將 A549 細胞活力降低至 60% [26]。但在目前的工作中，A549 細胞在用 APC-H 處理後受到抑制，

24 小時後減少到約 75%，這表明抑制效果略低於游離 HEBR。原因可能來自於環境溫度和釋放緩衝液(此處使用培養基)與體外藥物釋放條件不同，這可能會影響 APC-H 的實際藥物釋放。然而，APC-H 在 48 小時後仍對 A549 細胞表現出相當大的抑制作用 (降低至 60%)，這與之前關於 HEBR 作為游離藥物的強抑制作用相當 [26]。該結果表明，使用 APC 奈米粒子作為具有生物活性的 HEBR 的遞送系統可能不會對治療結果產生不利影響。使用靜電作為載藥機制可能是載藥 APC 粒子維持藥物活性的能力的原因，因為沒有化學鍵來改變藥物的化學結構 [72]。同時，NSCs 的結果顯示，所有組別處理 48 小時後，細胞增殖均顯著增加。這一發現不同於之前關於 HEBR 對 NSCs 生長抑制的報導 [28]。AP 是一種硫酸化多醣，類似於人體的細胞外基質 [73]。AP 可以作為細胞的營養來源，通過促進細胞週期促進細胞生長 [74]。據推測，APC 奈米粒子中 AP 的存在可能會降低 HEBR 對 NSCs 生長的抑制作用，甚至反過來增強 NSCs 的增殖 [18, 75]。

總之，APC 奈米複合粒子在中性環境中具有穩定的尺寸和形狀。它們表現出對革蘭氏陽性菌和陰性菌的抗菌特性，和良好的抗病毒特性。還顯示出作為具有 pH 敏感釋放行為的藥物載體的巨大潛力。針對各種藥物研究了載藥奈米粒子的釋放動力學。而且展現了使用 APC 奈米粒子作為載藥奈米粒子可以保留藥物的生物活性，減輕某些藥物對有利細胞的抑制作用。

第五章 結論



在本研究中，成功開發並優化了由 AP 和 CS 組成的生物相容性奈米粒子，名為 APC。APC 的最佳化比例為 1:0.75(AP:CS 重量濃度比)，在中性環境 (pH = 7.4) 中擁有穩定的形態和尺寸 (水和直徑 160 nm)。APC 奈米粒子的 pH 敏感性質通過在不同 pH 值的環境下粒子形態的變化，得到了很好的證實。APC 奈米粒子對革蘭氏陽性菌 (消滅 45%) 和革蘭氏陰性菌 (消滅 30%) 表現出非特異性抗菌特性；APC 奈米粒子的抗病毒的半數最大有效濃度為 6.596 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，這些證明了 APC 奈米粒子成功結合了每種成分的特性。而在載藥方面，使用三種不同的藥物來考察 APC 奈米粒子作為多元藥物載體的潛力，並透過載藥 APC 複合物粒子的體外釋放研究進行觀察，並通過藥物動力學模型表明：載藥 APC 複合物粒子是因為溶脹和擴散，才導致藥物在酸性條件下 (pH = 4.0) 擁有最快的釋放速率。此外，以 HEBR 蛋白藥物為例，使用肺癌細胞和 NSCs 進行了載藥 APC 奈米粒子的體外細胞研究。APC-H 奈米粒子有效地阻止了肺癌細胞的增殖（保持在 60%），這主要是因為 APC 不會太大程度的影響 HEBR 的生物活性以及治療效果。除此之外，APC-H 對 NSCs 增殖也表現出輕微的促進作用，這代表著 APC 可以減輕藥物對健康細胞的抑制作用。這些研究發現了多功能 APC 奈米粒子作為有潛力的藥物載體，以及未來的應用前景。

第六章 未來展望



本篇論文由於 APC 奈米粒子獨特的性質，在生物醫學中具有潛在的優勢。但目前對於 APC 奈米粒子還有兩個部分需要進行探討，第一個是 APC 奈米粒子本身結構還需要更精確的實驗去進行觀測，可以利用傅立葉轉換紅外光譜儀以及小角度 X-ray 散射以清楚真正的結構；第二個是 APC 奈米粒子在細胞內的彼此的互相作用其實還有很多的討論空間，可以透過將 APC 奈米粒子進行染色，再利用電子顯微鏡去觀察細胞是甚麼方式與 APC 奈米粒子互相作用。

除此之外，本篇論文的優化其實只是針對重量濃度比進行改變，也許在以後的討論中，可以將優化的條件擴大，雖然本篇論文的實驗室針對酸性環境的響應，但也許在其他的地方，如果使用不同的優化方式，會使環境出現中性環境的響應。這些結果都是非常有趣且值得多加探討的。

不過單就目前的已經測出的性質，可以發現 APC 奈米粒子對 pH 敏感的性質允許將藥物靶向輸送到身體的特定區域。酸性環境通常是癌細胞等患病細胞的特徵。這可以減少對健康細胞的毒性，提高藥物的療效，並可能減少副作用。但是關於給藥的方式，需要再透過調整載藥 APC 奈米粒子的大小，再進行評估以及測試。因為此篇論文提及了，載藥奈米粒子其實會根據藥物的大小而改變，如果達到微米等級其實也會影響給藥的方式。除了靶向藥物遞送外，APC 奈米粒子還顯示出非特異性抗菌和抗病毒特性。這意味著 APC 奈米粒子可用於醫療應用，例如，可用作醫療設備（例如植人物）上的塗層以防止感染。但塗層實際上能否

應用以及維持的程度可以再進一步觀察 APC 奈米粒子的穩定性以及結構。本篇論文對於 APC 奈米粒子的穩定性研究主要是以浸泡在水中的尺寸大小進行判斷依據，雖然單就 APC 奈米粒子在中性環境可以長達 14 天不會有明顯的結構改變，但醫療器械的使用場所有極大部份都是在受傷的酸性區域。且所使用的醫療器械是以拋棄式還是以長久使用為主，這也是一個很重要的問題。

APC 奈米粒子還有潛在應用是基因治療和免疫治療。APC 奈米粒子藉由能夠包載蛋白質藥物並保留其生物特性的性質，可以設計用於將治療基因遞送至特定細胞或組織，這可以治療基因的表達並可能治癒或減輕遺傳疾病。APC 奈米粒子還可用於刺激免疫系統對抗癌症或其他疾病。通過 APC 奈米粒子將抗原呈遞給免疫細胞，從而激活它們並引發免疫反應。但是針對 DNA 或 RNA 材料的包裹，需要進行測試的實驗才能確定是否能夠包載，可以透過將染色去觀察載藥 APC 奈米粒子的顏色，以確定藥物是能夠被包載的。

總而言之，APC 奈米粒子在生物醫學中具有多種潛在應用，包括靶向藥物遞送、基因治療和免疫治療。APC 奈米粒子的多重特性使其成為具有前途的發展平台。但細節的實驗部分還有一些需要我們設計進一步的研究以了解更內部的結果。同時在臨床實驗中也需要進行更進一步的實驗設計，以了解在臨床環境中的安全性和有效性。

參考文獻

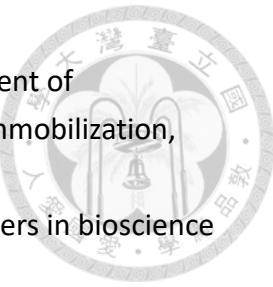


- [1] K.K. Jain, Drug delivery systems-an overview, *Drug delivery systems*. (2008) 1-50.
- [2] E. Touitou, B.W. Barry, *Enhancement in drug delivery*, CRC Press2006.
- [3] S. Bhatia, Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications, *Natural polymer drug delivery systems*, Springer2016, pp. 33-93.
- [4] W.H. De Jong, P.J. Borm, Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards, *International journal of nanomedicine* 3(2) (2008) 133.
- [5] S. Dumitriu, *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*, CRC press2004.
- [6] Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, Z. Zhang, Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems, *Advanced drug delivery reviews* 60(15) (2008) 1650-1662.
- [7] J. Pushpamalar, A.K. Veeramachineni, C. Owh, X.J. Loh, Biodegradable polysaccharides for controlled drug delivery, *ChemPlusChem* 81(6) (2016) 504-514.
- [8] G. Jiao, G. Yu, J. Zhang, H.S. Ewart, Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae, *Marine drugs* 9(2) (2011) 196-223.
- [9] J. Turnbull, A. Powell, S. Guimond, Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator, *Trends in cell biology* 11(2) (2001) 75-82.
- [10] M. Bernfield, M. Götte, P.W. Park, O. Reizes, M.L. Fitzgerald, J. Lincecum, M. Zako, Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans, *Annual review of biochemistry* 68(1) (1999) 729-777.
- [11] R. Sasisekharan, R. Raman, V. Prabhakar, Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8 (2006) 181-231.
- [12] L. Huang, M. Shen, G.A. Morris, J. Xie, Sulfated polysaccharides: Immunomodulation and signaling mechanisms, *Trends in Food Science & Technology* 92 (2019) 1-11.
- [13] P.A. Mourão, Perspective on the use of sulfated polysaccharides from marine organisms as a source of new antithrombotic drugs, *Marine Drugs* 13(5) (2015) 2770-2784.
- [14] M. Halperin-Sternfeld, G. Netanel Liberman, R. Kannan, F. Netti, P.X. Ma, S.M. Arad, L. Adler-Abramovich, Thixotropic red microalgae sulfated polysaccharide-peptide composite hydrogels as scaffolds for tissue engineering, *Biomedicines* 10(6) (2022) 1388.
- [15] W. Huang, Y. Chen, J. Hu, W. Yao, L. You, P.C.-K. Cheung, Algal sulfated polysaccharide-based hydrogels enhance gelling properties and in vitro wound healing compared to conventional hydrogels, *Algal Research* 65 (2022) 102740.

- [16] G.N. Liberman, G. Ochbaum, R. Bitton, S.M. Arad, Antimicrobial hydrogels composed of chitosan and sulfated polysaccharides of red microalgae, *Polymer* 215 (2021) 123353.
- [17] J.H. Yim, E. Son, S. Pyo, H.K. Lee, Novel sulfated polysaccharide derived from red tide microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03 with immunostimulating activity in vivo, *Marine Biotechnology* 7(4) (2005) 331-338.
- [18] J. Xu, S.-h. Hsu, Enhancement of Cell Behavior by the Polysaccharide Extract of *Arthrosira* and Potential Biomedical Applications, *Molecules* 28(2) (2023) 732.
- [19] A. Bernkop-Schnürch, S. Dünnhaupt, Chitosan-based drug delivery systems, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 81(3) (2012) 463-469.
- [20] A. Domard, M. Domard, Chitosan: structure-properties relationship and biomedical applications, *Polymeric biomaterials* 9 (2002) 187-212.
- [21] Y. Fazli, Z. Shariatinia, Controlled release of cefazolin sodium antibiotic drug from electrospun chitosan-polyethylene oxide nanofibrous Mats, *Materials science and engineering: C* 71 (2017) 641-652.
- [22] H.S. Kas, Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems, *Journal of microencapsulation* 14(6) (1997) 689-711.
- [23] J.J. Wang, Z.W. Zeng, R.Z. Xiao, T. Xie, G.L. Zhou, X.R. Zhan, S.L. Wang, Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers, *International journal of nanomedicine* 6 (2011) 765.
- [24] I. Pilipenko, V. Korzhikov-Vlakh, V. Sharoyko, N. Zhang, M. Schäfer-Korting, E. Rühl, C. Zoschke, T. Tennikova, pH-sensitive chitosan-heparin nanoparticles for effective delivery of genetic drugs into epithelial cells, *Pharmaceutics* 11(7) (2019) 317.
- [25] J. Hirsh, Heparin, *New England Journal of Medicine* 324(22) (1991) 1565-1574.
- [26] C.-W. Wong, L.-N. Ko, H.-J. Huang, C.-S. Yang, S.-h. Hsu, Engineered bacteriorhodopsin may induce lung cancer cell cycle arrest and suppress their proliferation and migration, *Molecules* 26(23) (2021) 7344.
- [27] M.-F. Hsu, T.-F. Yu, C.-C. Chou, H.-Y. Fu, C.-S. Yang, A.H. Wang, Using *Haloarcula marismortui* bacteriorhodopsin as a fusion tag for enhancing and visible expression of integral membrane proteins in *Escherichia coli*, *PloS one* 8(2) (2013) e56363.
- [28] H.-W. Han, L.-N. Ko, C.-S. Yang, S.-h. Hsu, Potential of engineered bacteriorhodopsins as photoactivated biomaterials in modulating neural stem cell behavior, *ACS Biomaterials Science & Engineering* 5(6) (2019) 3068-3078.
- [29] Y.C. Hsu, D.C. Lee, S.L. Chen, W.C. Liao, J.W. Lin, W.T. Chiu, I.M. Chiu, Brain-specific 1B promoter of FGF1 gene facilitates the isolation of neural stem/progenitor cells with self-renewal and multipotent capacities, *Developmental Dynamics* 238(2) (2009) 302-314.

- [30] S.-R. Shih, T.-Y. Chu, G.R. Reddy, S.-N. Tseng, H.-L. Chen, W.-F. Tang, M.-s. Wu, J.-Y. Yeh, Y.-S. Chao, J.T. Hsu, Pyrazole compound BPR1P0034 with potent and selective anti-influenza virus activity, *Journal of biomedical science* 17(1) (2010) 1-9.
- [31] F.-Y. Hsieh, H.-W. Han, X.-R. Chen, C.-S. Yang, Y. Wei, S.-h. Hsu, Non-viral delivery of an optogenetic tool into cells with self-healing hydrogel, *Biomaterials* 174 (2018) 31-40.
- [32] S.Y. Kim, S.M. Cho, Y.M. Lee, S.J. Kim, Thermo-and pH-responsive behaviors of graft copolymer and blend based on chitosan and N-isopropylacrylamide, *Journal of Applied Polymer Science* 78(7) (2000) 1381-1391.
- [33] N. Gorochovceva, R. Makuška, Synthesis and study of water-soluble chitosan-O-poly (ethylene glycol) graft copolymers, *European Polymer Journal* 40(4) (2004) 685-691.
- [34] Y.-H. Lin, C.-H. Chang, Y.-S. Wu, Y.-M. Hsu, S.-F. Chiou, Y.-J. Chen, Development of pH-responsive chitosan/heparin nanoparticles for stomach-specific anti-Helicobacter pylori therapy, *Biomaterials* 30(19) (2009) 3332-3342.
- [35] Y. Hu, X. Jiang, Y. Ding, H. Ge, Y. Yuan, C. Yang, Synthesis and characterization of chitosan–poly (acrylic acid) nanoparticles, *Biomaterials* 23(15) (2002) 3193-3201.
- [36] J.-S. Ahn, H.-K. Choi, C.-S. Cho, A novel mucoadhesive polymer prepared by template polymerization of acrylic acid in the presence of chitosan, *Biomaterials* 22(9) (2001) 923-928.
- [37] S.J. Kim, S.R. Shin, K.B. Lee, Y.D. Park, S.I. Kim, Synthesis and characteristics of polyelectrolyte complexes composed of chitosan and hyaluronic acid, *Journal of applied polymer science* 91(5) (2004) 2908-2913.
- [38] S. Kalliola, E. Repo, V. Srivastava, J.P. Heiskanen, J.A. Sirviö, H. Liimatainen, M. Sillanpää, The pH sensitive properties of carboxymethyl chitosan nanoparticles cross-linked with calcium ions, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 153 (2017) 229-236.
- [39] X. Geng, O.-H. Kwon, J. Jang, Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution, *Biomaterials* 26(27) (2005) 5427-5432.
- [40] H. Nikaido, Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 33(11) (1989) 1831-1836.
- [41] I. Helander, E.-L. Nurmiaho-Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades, S. Roller, Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria, *International journal of food microbiology* 71(2-3) (2001) 235-244.
- [42] J. Muthukumar, R. Chidambaram, S. Sukumaran, Sulfated polysaccharides and its commercial applications in food industries—A review, *Journal of Food Science and Technology* 58(7) (2021) 2453-2466.
- [43] J.-Y. Jun, M.-J. Jung, I.-H. Jeong, K. Yamazaki, Y. Kawai, B.-M. Kim, Antimicrobial and antibiofilm activities of sulfated polysaccharides from marine algae against

- dental plaque bacteria, *Marine drugs* 16(9) (2018) 301.
- [44] F. Kara, E.A. Aksoy, Z. Yuksekdag, S. Aksoy, N. Hasirci, Enhancement of antibacterial properties of polyurethanes by chitosan and heparin immobilization, *Applied Surface Science* 357 (2015) 1692-1702.
- [45] R.S. Aquino, P.W. Park, Glycosaminoglycans and infection, *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 21 (2016) 1260.
- [46] L. Chen, G. Huang, The antiviral activity of polysaccharides and their derivatives, *International journal of biological macromolecules* 115 (2018) 77-82.
- [47] A. Muralidharan, M.S. Russell, L. Larocque, C. Gravel, S. Sauvé, Z. Chen, C. Li, W. Chen, T. Cyr, M. Rosu-Myles, Chitosan alters inactivated respiratory syncytial virus vaccine elicited immune responses without affecting lung histopathology in mice, *Vaccine* 37(30) (2019) 4031-4039.
- [48] X. Chen, W. Han, G. Wang, X. Zhao, Application prospect of polysaccharides in the development of anti-novel coronavirus drugs and vaccines, *International journal of biological macromolecules* 164 (2020) 331-343.
- [49] W. Lu, Z. Yang, J. Chen, D. Wang, Y. Zhang, Recent advances in antiviral activities and potential mechanisms of sulfated polysaccharides, *Carbohydrate Polymers* 272 (2021) 118526.
- [50] M. Malmsten, Antimicrobial and antiviral hydrogels, *Soft Matter* 7(19) (2011) 8725-8736.
- [51] V. Lysenko, V. Lozovski, M. Lokshyn, Y.V. Gomeniuk, A. Dorovskih, N. Rusinchuk, Y. Pankivska, O. Povnitsa, S. Zagorodnya, V. Tertykh, Nanoparticles as antiviral agents against adenoviruses, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 9(2) (2018) 025021.
- [52] S. Saha, M.H. Navid, S.S. Bandyopadhyay, P. Schnitzler, B. Ray, Sulfated polysaccharides from *Laminaria angustata*: structural features and in vitro antiviral activities, *Carbohydrate polymers* 87(1) (2012) 123-130.
- [53] V.P. Torchilin, Multifunctional nanocarriers, *Advanced drug delivery reviews* 58(14) (2006) 1532-1555.
- [54] D.-E. Lee, H. Koo, I.-C. Sun, J.H. Ryu, K. Kim, I.C. Kwon, Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis, *Chemical Society Reviews* 41(7) (2012) 2656-2672.
- [55] D. Stoltz, A. Stulz, B. Müller, A. Gratwohl, M. Tamm, BAL neutrophils, serum procalcitonin, and C-reactive protein to predict bacterial infection in the immunocompromised host, *Chest* 132(2) (2007) 504-514.
- [56] M.G. Ison, F.G. Hayden, Viral infections in immunocompromised patients: what's new with respiratory viruses?, *Current opinion in infectious diseases* 15(4) (2002) 355-367.



- [57] A.J. De Craen, P.J. Roos, A.L. De Vries, J. Kleijnen, Effect of colour of drugs: systematic review of perceived effect of drugs and of their effectiveness, *Bmj* 313(7072) (1996) 1624-1626.
- [58] W. Lu, J. Yao, X. Zhu, Y. Qi, Nanomedicines: redefining traditional medicine, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 134 (2021) 111103.
- [59] C.S. Cleeland, Symptom burden: multiple symptoms and their impact as patient-reported outcomes, *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 2007(37) (2007) 16-21.
- [60] B. Powis, J. Strang, P. Griffiths, C. Taylor, S. Williamson, J. Fountain, M. Gossop, Self-reported overdose among injecting drug users in London: extent and nature of the problem, *Addiction* 94(4) (1999) 471-478.
- [61] A.E. Zimmermann, T. Pizzoferrato, J. Bedford, A. Morris, R. Hoffman, G. Braden, Tenofovir-associated acute and chronic kidney disease: a case of multiple drug interactions, *Clinical Infectious Diseases* 42(2) (2006) 283-290.
- [62] L.S. Jabr-Milane, L.E. van Vlerken, S. Yadav, M.M. Amiji, Multi-functional nanocarriers to overcome tumor drug resistance, *Cancer treatment reviews* 34(7) (2008) 592-602.
- [63] X. Shu, K. Zhu, The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 54(2) (2002) 235-243.
- [64] J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N. Peppas, R. Gurny, Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 57(1) (2004) 19-34.
- [65] D. Bourne, G. Bunker, C. Rhodes, *Modern Pharmaceutics*, New York: Informa Healthcare (2002) 67-92.
- [66] T. Higuchi, Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices, *Journal of pharmaceutical sciences* 52(12) (1963) 1145-1149.
- [67] A. Hixson, J. Crowell, Dependence of reaction velocity upon surface and agitation, *Industrial & Engineering Chemistry* 23(8) (1931) 923-931.
- [68] R.W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, N.A. Peppas, Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers, *International journal of pharmaceutics* 15(1) (1983) 25-35.
- [69] U.K. Sharma, A. Verma, S.K. Prajapati, H. Pandey, A.C. Pandey, In vitro, in vivo and pharmacokinetic assessment of amikacin sulphate laden polymeric nanoparticles meant for controlled ocular drug delivery, *Applied Nanoscience* 5 (2015) 143-155.
- [70] Y. Boonsongrit, A. Mitrevey, B.W. Mueller, Chitosan drug binding by ionic

interaction, European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics 62(3) (2006) 267-274.

[71] S. Papadimitriou, D. Bikaris, K. Avgoustakis, E. Karavas, M. Georgarakis, Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole, Carbohydrate polymers 73(1) (2008) 44-54.

[72] C.-H. Tu, H.-P. Yi, S.-Y. Hsieh, H.-S. Lin, C.-S. Yang, Overexpression of different types of microbial rhodopsins with a highly expressible bacteriorhodopsin from *Haloarcula marismortui* as a single protein in *E. coli*, Scientific reports 8(1) (2018) 1-8.

[73] K. Senni, J. Pereira, F. Gueniche, C. Delbarre-Ladrat, C. Sinquin, J. Ratiskol, G. Godeau, A.-M. Fischer, D. Helley, S. Colliec-Jouault, Marine polysaccharides: a source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering, Marine drugs 9(9) (2011) 1664-1681.

[74] H. Murad, M. Hawat, A. Ekhtiar, A. AlJapawe, A. Abbas, H. Darwish, O. Sbenati, A. Ghannam, Induction of G1-phase cell cycle arrest and apoptosis pathway in MDA-MB-231 human breast cancer cells by sulfated polysaccharide extracted from *Laurencia papillosa*, Cancer cell international 16(1) (2016) 1-11.

[75] B. Kloareg, R. Quatrano, Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides, OCEANOGRAPHY AND MARINE BIOLOGY: AN ANNUAL REVIEW. 26 (1988) 259-315.