



بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و الگوی رهایش DNA از کopolymerهای PLA-PEG-PLA حاوی درصد متفاوت PEG و PLA

فاطمه ناهیدی: کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

یحشم یعقوبی: استادیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران (نویسنده مسئول) yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir

چکیده

کلیدواژه‌ها

کopolymer PLA-PEG-PLA، الگوی رهایش DNA، siRNA-FAM، MCF-7 سلول‌های

زمینه و هدف: سیستم‌های انتقال دارو با خاصیت کنترل رهایش DNA، امکان غلبه بر موائع خارج سلولی که سبب محدود شدن ژن درمانی می‌شود را فراهم آورده است. هدف از انجام این تحقیق بررسی تأثیر درصدهای متفاوت PLA:PEG در کopolymer PLA-PEG-PLA بر خصوصیات نانو ذرات حاصل بود.

روش کار: در این تحقیق با تغییر نسبت‌های PLA:PEG در کopolymer PLA-PEG-PLA نانو ذراتی با خاصیت کنترل اندازه، سرعت رهایش DNA و بازده انتقال siRNA-FAM با موفقیت سنتز شد. بدین منظور کopolymerهای مختلفی از PLA-PEG-PLA در حضور لاکتیک اسید، پلی‌اتیلن گلیکول به عنوان ماده اولیه و همچنین stannous octoate double emulsion solvent به عنوان کاتالیز سنتز شد. سپس siRNA-FAM یا DNA با استفاده از تکنیک evaporation technique توسط کopolymer PLA-PEG-PLA انکپسوله شد. خصوصیات نانو ذرات حاصل از قبیل اندازه، مرغولوزی، الگوی رهایش، سمتی و بازده انتقال siRNA-FAM مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد نانو ذرات حاصل دارای ساختار کروی و سطح صاف هستند. همچنین نتایج DLS نشان داد با افزایش نسبت PLA در کopolymer PLA-PEG-PLA اندازه ذرات افزایش می‌یابد علاوه بر این نتایج ما نشان داد افزایش نسبت PLA در کopolymer PLA-PEG-PLA سبب کاهش سرعت رهایش از نانو ذرات PLA/DNA کopolymer PLA-PEG-PLA می‌گردد. همچنین در این تحقیق تأثیر تغییر نسبت PLA:PEG بر بازده انتقال siRNA-FAM توسط میکروسکوپ فلورسانس و دستگاه فلوسایتو متري مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: بین افزایش نسبت PLA در کopolymer PLA-PEG-PLA و افزایش بازده انتقال siRNA-FAM رابطه مستقیم وجود دارد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Nahidi F, Yaghoubi H. Effect of different mass ratio of PLA: PEG segments in PLA-PEG-PLA copolymers on the physicochemical characterization and DNA release profile. Razi J Med Sci. 2019;26(3):1-12.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 1.0](#) صورت گرفته است.



Original Article

Effect of different mass ratio of PLA: PEG segments in PLA-PEG-PLA copolymers on the physicochemical characterization and DNA release profile

Fatemeh Nahidi, MSc Biochemistry, Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran
Hashem Yaghoubi, PhD, Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran (* Corresponding author) yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir

Abstract

Background: Adapting controlled release technologies to the delivery of DNA has the great potential to overcome extracellular barriers that limit gene delivery. This study investigates the effect of different mass ratio of PLA: PEG in the various tri block poly (lactic acid)-poly (ethylene glycol) - Poly (lactic acid) copolymer (PLA-PEG-PLA) on the properties of the resulting nanoparticles.

Methods: The various tri block PLA-PEG-PLA copolymers were prepared via ring-opening polymerization by poly (ethylene glycol) (PEG), lactic acid and stannous octoate as raw material and catalyst, respectively. DNA or siRNA-FAM was incorporated into the tree block PLA-PEG-PLA copolymer using double emulsion solvent evaporation technique. Properties of these nanoparticles, such as morphology and particles size of nanoparticles, DNA release kinetics, in vitro cytotoxicity and siRNA-FAM transfer efficiency were evaluated.

Results: Scanning electron microscope (SEM) showed that PLA-PEG-PLA/DNA nanoparticles have spherical morphology with smooth surface. Dynamic light scattering results showed the particle size of PLA-PEG-PLA copolymers increased with an increase in the mass ratio of PLA in PLA-PEG-PLA copolymers. The release profile of the PLA-PEG-PLA/DNA nanoparticles measured using nanodrop and the results showed that, decrease in mass ratio of PLA, increased the release profile of DNA from PLA-PEG-PLA/DNA nanoparticles. Moreover the percentage of siRNA-FAM transfer to MCF-7 cells by various PLA-PEG-PLA copolymers, measuring using flow cytometry and fluorescence microscopy.

Conclusion: These results showed that there is same relation between the mass ratio of PLA and percentage of siRNA-FAM delivery into the MCF-7 cells.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Keywords

PLA-PEG-PLA copolymer, Drug release profile, siRNA-FAM, MCF-7 cell

Received: 08/12/2018

Accepted: 06/04/2019

Cite this article as:

Nahidi F, Yaghoubi H. Effect of different mass ratio of PLA: PEG segments in PLA-PEG-PLA copolymers on the physicochemical characterization and DNA release profile. Razi J Med Sci. 2019;26(3):1-12.

This work is published under CC BY-NC-SA 1.0 licence.



طرفی تزریق پیوسته دارو، خطراتی از قبیل جداسدگی شبکیه را در پی خواهد داشت (۱۵). لذا طراحی نانوناقل‌هایی با قابلیت رهایش پیوسته و منظم، به منظور جلوگیری از عوارضی از قبیل دز بالا پس از تزریق و اثرات جانبی تزریقات پی‌درپی در این گونه بیماری‌ها ضروری به نظر می‌رسد (۱۶).

کوپلیمرهای حاوی قطعات PLA و PEG از جمله کوپلیمرهای قطعه‌ای می‌باشند که علاوه بر رهایش منحصر به فرد، از زیست سازگاری و زیست تخریب‌پذیری مناسبی نیز برخوردار هستند. به همین دلیل در گذشته تحقیقات متعددی به منظور انکپسوله‌سازی DNA درون میسل‌های حاصل از این کوپلیمرها و همچنین توانایی این میسل‌ها در انتقال ژن انجام گرفته است (۱۷، ۱۸). وجود لایه PEG در سطح میسل‌های حاصل از این کوپلیمر علاوه بر تسهیل در جذب آب به درون ماتریکس و کمک به رهایش داروی انکپسوله شده، سبب افزایش زیست سازگاری و همچنین مانع از تحریک سیستم ایمنی بدن و حذف زودهنگام میسل‌ها می‌گردد (۱۶، ۱۹، ۲۰). از طرفی PLA به عنوان لایه داخلی میسل، مانع از نفوذ مواد مخرب به هسته و آسیب به داروهای انکپسوله شده آسیب‌پذیر از قبیل DNA می‌گردد (۱۰).

با توجه به اینکه در شرایط درون شیشه‌ای می‌توان با تغییر در طول زنجیره و همچنین وزن ملکولی پلیمرهایی از قبیل PCL و PLA، رهایش دارو را کنترل نمود (۱۶). لذا این تحقیق باهدف بررسی تأثیر PLA بر خصوصیات رهایش، بازده انکپسولاسیون DNA، سمیت، مرفلوژی و همچنین MCF-7 بازده انتقال siRNA-FAM به سلول‌های PLA-PEG-PLA می‌گرفت. بدین منظور سه کوپلیمر PLA با نسبت‌های متفاوتی از PLA و PEG و سنتز شدند و پس از بارگذاری با DNA، خصوصیات فوکال ذکر به ترتیب توسط نانودرآپ، تست MTT، میکروسکوپ الکترونی نگاره و دستگاه DLS مورد بررسی قرار گرفت همچنین به منظور بررسی تأثیر نسبت‌های متفاوت PLA:PEG بر بازده انتقال

ژن درمانی با انتقال ژن‌های سالم به درون سلول‌های بدن و تصحیح و درمان ژن‌های جهش‌یافته و معیوب، پنچرهای نو به سوی درمان بسیاری از بیماری‌ها گشوده است. امروزه استفاده از نانو ناقل‌ها به خاطر وجود مزایایی از قبیل توانایی انتقال و ارسال هدفمند ژن به بافت یا اندام‌ک خاصی درون سلول، جلوگیری از تخریب پیش از موعد و همچنین رهایش مناسب ژن، علاوه بر کاهش عوارض جانبی رویکرد جذابی را در درمان سرطان به وجود آورده است (۱-۳). یکی از موانع استفاده بالینی، از نانو ناقل‌های مورد استفاده در انتقال ژن، سمیت نسبتاً بالای این ناقل‌ها به خصوص نانو ناقل‌های کاتیونی هست (۴). لذا تحقیق بر روی پلیمرهای با زیست تخریب‌پذیر و زیست سازگار مناسب، می‌تواند نتایج امیدوار کننده‌ای را جهت استفاده بالینی نانو ناقل‌ها در ژن درمانی در پی داشته باشد.

پلیمرهای چند قطعه‌ای حاوی قطعات آب‌دوست و آب‌گریز در محیط‌های آبی تشکیل می‌شوند و پایداری را می‌دهند که از توانایی بالایی در انتقال و محافظت از داروهای انکپسوله شده، از قبیل RNA، DNA، پپتید، پروتئین و غیره، در برابر عوامل مخرب بیرونی برخوردار هستند (۷-۵) از طرفی پایداری مناسب میسل‌های تشکیل شده حاصل از کوپلیمرهای قطعه‌ای حاوی قطعات آب‌دوست و آب‌گریز، در سیستم گردش خون، به استفاده از آن‌ها در سیستم‌های دارورسانی جذابیت ویژه‌ای بخشیده است (۸، ۹). توانایی کوپلیمرهای قطعه در کنترل رهایش دارو، از طریق ترکیب قطعات متفاوت و همچنین تغییر وزن ملکولی هر یک از این قطعات، از دیگر تحقیقات انجام شده در سال‌های اخیر بوده است (۱۰، ۱۱). کنترل رهایش دارو یکی از مهم‌ترین فاکتورهای مورد بررسی جهت درمان برخی از بیماری‌ها از قبیل بیماری لکه زدی شبکیه بوده که نیاز به سطح پایداری از کورتیکوستروئیدها در ناحیه مورد درمان هست (۱۲)، در این بیماری به منظور جلوگیری از عوارض سیستمیک داروهای مورد استفاده، تزریق مستقیم به بافت چشمی انجام می‌گردد (۱۳، ۱۴). از

بررسی تأثیر درصد متفاوت PLA/PEG موجود در کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA (NBP 3-5)، بر خصوصیات مرفولوژی و همچنین اندازه ذرات حاصل از برهmeknesh PLA-PEG-DNA، با DNA پلاسمیدی LEO به ترتیب از میکروسکوپ نگاره (SEM) (مدل ZEN 3600 DLS) و دستگاه (1430VP) دستگاه استفاده گردید.

بررسی رهایش DNA پلاسمید از کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA: میزان رهایش DNA پلاسمیدی از کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA، بر اساس مقایسه آزادشده از کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA با DNA بارگذاری شده در هرکدام از این کوپلیمرها به ۱۵ دست آمد. بدین منظور یک میلی لیتر بافر TE به ۱۵ میلی گرم کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA به طور جداگانه اضافه گردید. سوسپانسیون‌های حاصل به مدت ۳۷ دقیقه بر روی انکوباتور شیکر با درجه حرارت ۴۵ rpm دور PLA و در دور ۱۳۰۰۰ rpm PEG-PLA/DNA دقیقه سانتریفوژ شده و پس از خارج کردن محلول رویی مجددً یک میلی لیتر بافر (Tris/EDTA buffer) TE به هریک از تیمارها اضافه شد سپس سایر مراحل فوق الذکر برای زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه نیز انجام گردید.

بررسی سمیت کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA (NBP 3-5): بررسی سمیت کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA بر اساس تست MTT انجام گردید. بدین منظور ۰/۲ میلی لیتر از سلول‌های MCF-7 با تراکم 1×10^5 بر میلی لیتر به هر یک از چاهک‌های بلیت‌های ۹۶ خانه‌ای منتقل و در دمای ۳۷ درجه با 5 CO_2 درصد نگهداری گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت، به هر یک از چاهک‌ها به ترتیب مقدار ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر از هرکدام از کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA (NBP 3-) (5) اضافه گردید (تکرار=۳). سپس پس از گذشت

siRNA-FAM از میکروسکوپ فلورسانس و دستگاه فلئوئسایتومتری استفاده گردید. ما اعتقادداریم با به دست آورن رابطه بین وزن ملکولی هرکدام از این قطعات بر فاکتورهای فوق الذکر، می‌توان در آینده میسل‌هایی با اندازه و سرعت رهایش مطلوب و موردنظر، با کاربردهای درمانی متفاوت تولید نمود.

روش کار

سنتر کوپلیمر (NBP 3-5) PLA-PEG-PLA با درصد متفاوت کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA (جدول ۱)، با استفاده از پلیمریزاسیون حلقه باز، در حضور L-لاکتايد و PEG به عنوان آغازگر و همچنین Sn(Oct)2 به عنوان کاتالیزور سنتر شد (۲۱).

:PLA-PEG-PLA/pDNA آماده سازی کمپلکس NBP 3-) PLA-PEG-PLA Water (5) حاوی پلاسمیدی بر اساس تکنیک- in-oil solvent diffusion technique به منظور بررسی درصد بارگذاری هریک از کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA ۳-5 NBP، پس جمع آوری نانو ذرات PLA/DNA محلول رویی هر یک از تیمارها به طور جداگانه جمع آوری، سپس عدد جذبی آن‌ها در ۲۶۰ نانومتر توسط نانودرایپ تعیین و با عدد جذبی DNA اولیه مورد استفاده در فرایند انکپسوله سازی مقایسه گردید (تکرار=۳). جهت مشاهده حفظ ساختار DNA در مراحل بارگذاری، ۲ میلی گرم از هرکدام از نانو ذرات حاصل در ۱۰۰ میکرو لیتر بافر حل شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه نگهداری شد. سپس در دمای ۴ درجه با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. ۳۰ میکرو لیتر از محلول رویی برداشته شده و توسط ژل آگارز ۰/۸ درصد به مدت ۲ ساعت در ۸۰ V الکتروفورز گردید.

بررسی خصوصیات مرفولوژیکی و اندازه ذرات حاصل از برهmeknesh PLA-PEG-PLA با DNA: به منظور

جدول ۱- نام کوپلیمرهای PLA و درصد PEG/PLA موجود در هر پلیمر

نام کوپلیمر PLA	درصد PEG/PLA در کوپلیمر
NBP 3	45%PLA-10%PEG2000-45%PLA
NBP 4	40%PLA-20%PEG2000-40%PLA
NBP 5	35%PLA-30%PEG2000-35%PLA

مقایسه میانگین جذب سه تکرار pDNA بارگذاری نشده در ۲۶۰ نانومتر و همچنین مقایسه آن با کل pDNA مورد استفاده در فرآیند انکپسوله سازی، نشان داد. بیشترین بازده انکپسوله سازی در کوپلیمر-NBP-4 (۵۰/۳۳ درصد) مشاهده شد. انکپسولاسانیون در کوپلیمرهای NBP-3 و NBP-5 به ترتیب ۴۸/۳۳ و ۳۸/۳۳ بود (شکل ۱).

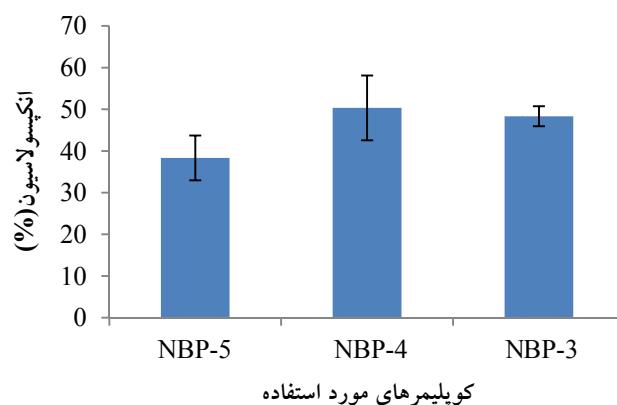
نتایج حاصل از بررسی اندازه ذرات حاصل از برهمکنش هر یک از کوپلیمرهای 3-5 و NBP-3 همچنین اندازه ذرات حاصل از برهمکنش این کوپلیمرها با DNA توسط دستگاه DLS، نشان داد. با کوپلیمرهای PLA-PEG در کوپلیمرهای-PLA افزایش درصد PEG از بارگذاری ۳-۵ کوپلیمرهای-PLA نسبت به کوپلیمرهای-PLA اندازه ذرات به طور محسوسی کاهش می‌یابد به‌نحوی که کمترین اندازه ذرات در نانو ذرات حاصل از ۱۵۲ نانومتر، همچنین این نتایج نشان داد انکپسوله سازی DNA توسط کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA اندازه ذرات حاصل را در مقایسه با نانو ذرات حاصل از برهمکنش PLA-PEG-PLA افزایش می‌دهد (شکل ۲).

تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) از نانو ذرات حاصل از برهمکنش کوپلیمرهای-PLA-PEG با pDNA نشان داد نانو ذرات حاصل در تمامی تیمارها دارای شکل کروی می‌باشند به‌نحوی که تغییر در درصد متفاوت PLA و PEG در این کوپلیمرها، تأثیری بر شکل نانو ذرات حاصل نداشت (شکل ۳). بررسی الگوی رهایش DNA از کوپلیمرهای NBP-

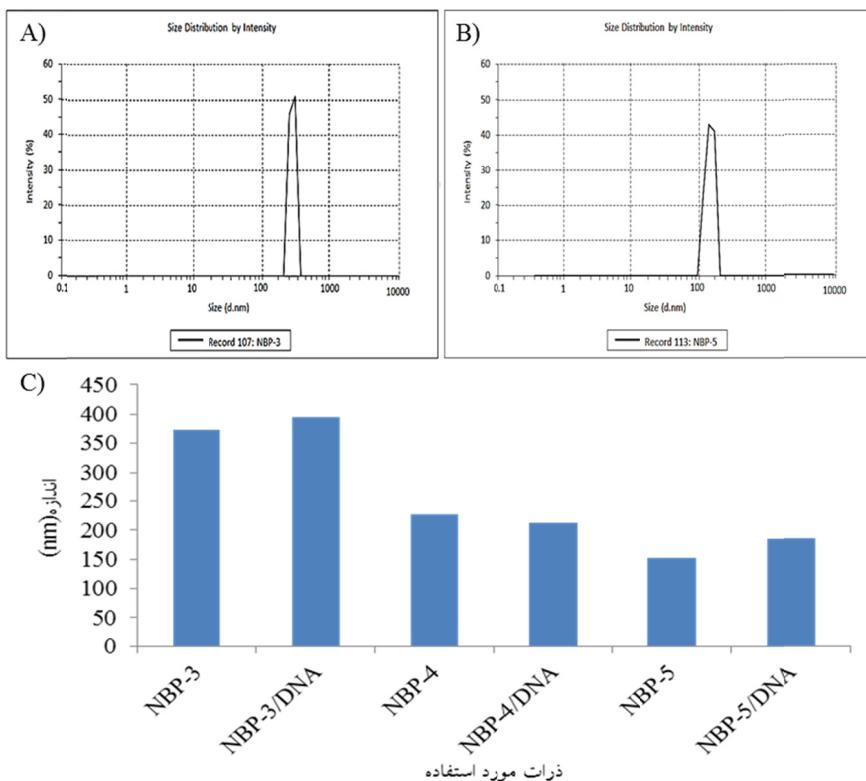
مدت زمان‌های ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت، بقای سلول‌ها با استفاده از تست MTT مورد سنجش قرار گرفت (۲۲). بررسی تأثیر نسبت‌های متفاوت PLA:PEG بر بازده انتقال siRNA-PLA-PEG-PLA به سلول‌های MCF-7: بدین منظور ابتدا ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت RPMI 1640 FBS ۱۰ درصد به هریک از چاهک‌های پلیت ۶ خانه اضافه شد سپس مقدار 2×10^5 سلول به هر چاهک اضافه گردید. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه و 5CO_2 درصد نگهداری شدند. به‌منظور تهیه میسل‌های PLA-PEG-PLA-PEI/siRNA-FAM، ۱۰ میلی‌گرم از هر کدام از کوپلیمرهای 3-5 NBP به‌طور جداگانه با ۰/۱ میلی‌گرم siRNA-FAM و ۰/۱ میلی‌گرم PEI بارگذاری شد. سپس به هر چاهک به‌طور جداگانه ۵۰۰ میکرو لیتر PLA-PEG-PLA/PEI/siRNA-FAM از هر کدام از کوپلیمرها ۳-۵ NBP اضافه و پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و 5CO_2 درصد نگهداری شدند. از میکروسکوپ فلورسانس به‌منظور PLA-PEG-PLA/PEI/siRNA-FAM بررسی نفوذ به سلول‌های MCF-7 استفاده گردید. همچنین به‌منظور بررسی تأثیر نسبت‌های PLA/PEG بر بازده انتقال siRNA به سلول‌های MCF-7 از دستگاه فلورسانس به‌منظور استفاده گردید.

یافته‌ها

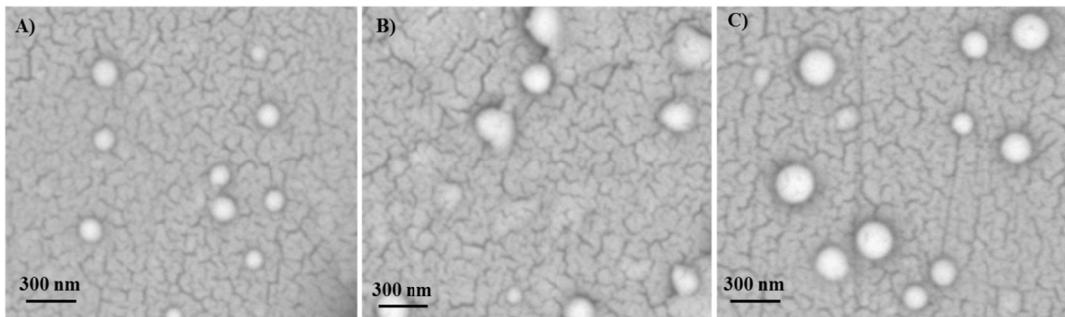
مطالعه خصوصیات مرفو‌لوژیکی و درصد بارگیری توسط کوپلیمر PLA-PEG-PLA pDNA: نتایج



شکل ۱ - مقایسه میانگین درصد بارگذاری DNA پلاسمید در کوپلیمرهای (NBP 3-5) PLA-PEG-PLA



شکل ۲- توزیع اندازه ذرات حاصل از برهمنکش کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA به صورت منفرد و در ترکیب با DNA: A و B) توزیع اندازه ذرات حاصل از برهمنکش کوپلیمرهای NBP-3 و NBP-5، C) مقایسه میانگین اندازه ذرات حاصل از برهمنکش کوپلیمرهای 3-5 NBP به صورت منفرد و در ترکیب با DNA



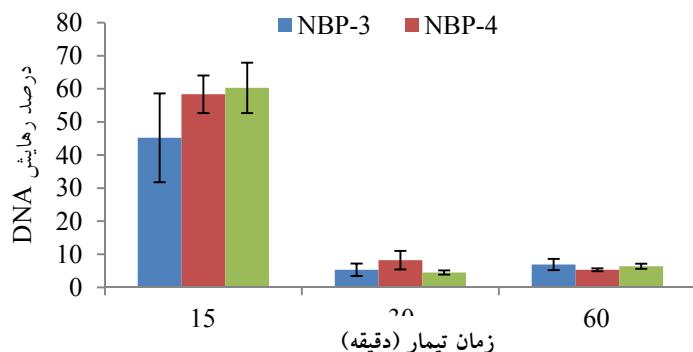
شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) از نانو ذرات حاصل از برهمنکش کوپلیمر PLA-PEG-PLA به ترتیب (A) نانو ذرات حاصل از برهمنکش کوپلیمر 5، B، NBP-3 و C) به ترتیب نانو ذرات حاصل از برهمنکش کوپلیمر 4 و NBP-3.

غلظت‌ها و مدت‌زمان‌های متفاوت نشان داد افزایش مدت‌زمان تیمار با این پلیمرها اثر سمیت آن‌ها را افزایش می‌دهد. همچنین این نتایج نشان داد با افزایش درصد PLA در کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA میزان سمیت نیز افزایش می‌یابد. استفاده از این پلیمرها در غلظت‌های کمتر از ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از سمیت پایینی برخوردار بودند (شکل ۵-۸).

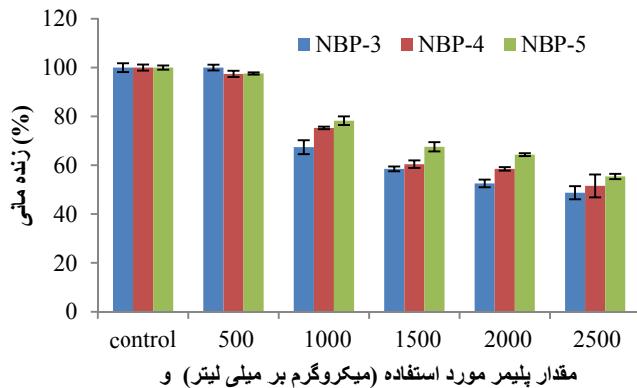
بررسی تأثیر نسبت PLA:PEG در کوپلیمر PEG-PLA بر بازده انتقال siRNA به سلول‌های

5-3. نتایج مقایسه میانگین داده‌های حاصل از بررسی الگوی رهایش DNA از کوپلیمرهای 3-5 NBP نشان داد رهایش DNA در ۱۵ دقیقه اول در هر سه نوع کوپلیمر به صورت انفجاری اتفاق افتاد این در حالی است پس از آن رهایش به صورت آهسته انجام گرفت (شکل ۴).

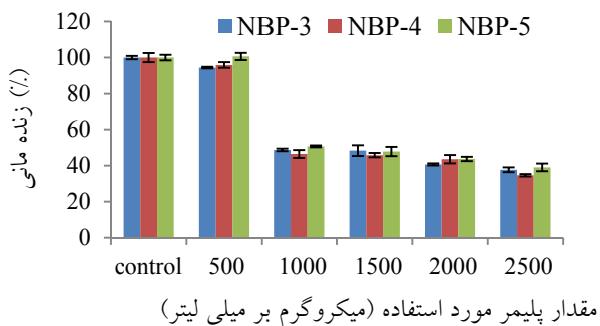
بررسی سمیت کوپلیمرهای PLA-PEG (NBP 3-5): نتایج حاصل از تست MTT پس از تیمار سلول‌های MCF-7 با کوپلیمرهای 5 NBP در



شکل ۴- مقایسه میانگین الگوی رهایش DNA از کوپلیمرهای ۳-۵



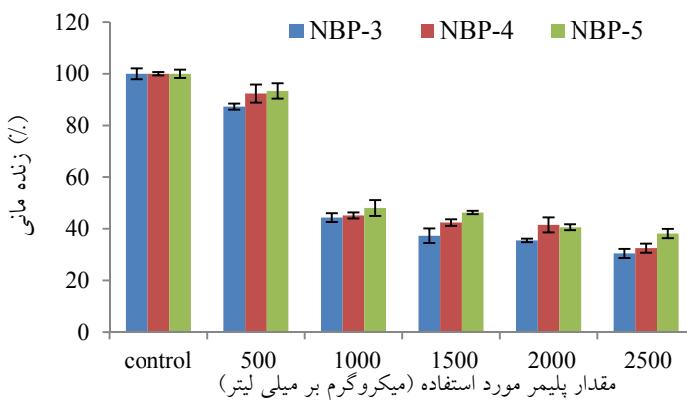
شکل ۵- مقایسه میانگین اثر کوپلیمر مختلف بر زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 در غلظت‌ها متفاوت در مدت‌زمان‌ها ۱۶ ساعت



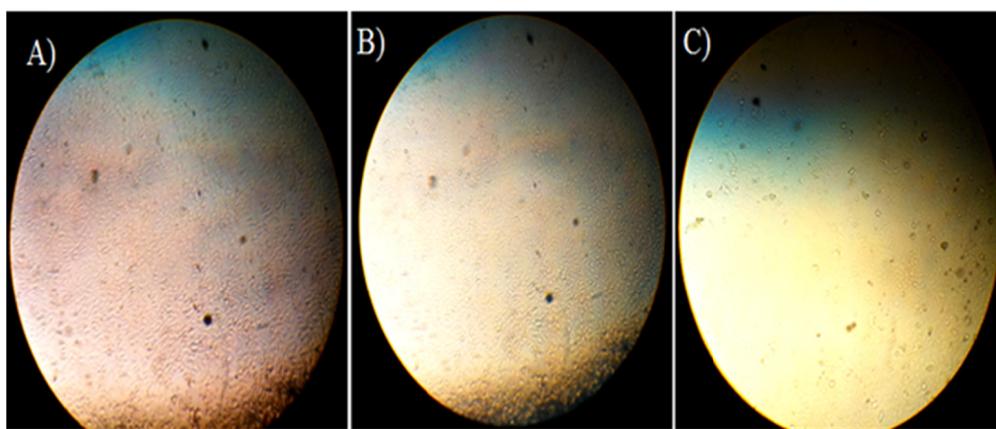
شکل ۶- مقایسه میانگین اثر کوپلیمر مختلف بر زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 در غلظت‌ها متفاوت در مدت‌زمان‌ها ۲۴ ساعت

سلول‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری نشان داد بیشترین میزان بازده انتقال در نانوذرات PLA-PEG-PLA/PEI/siRNA-FAM NBP-3 مشاهده شد (۷۳ درصد)، همچنین این نتایج نشان داد کمترین میزان بازده انتقال در نانوذرات NBP-5 مشاهده شد (۵۲ درصد) که این امر بیانگر تأثیر افزایش نسبت قطعه PLA در افزایش بازده انتقال siRNA-FAM (شکل ۱۰).

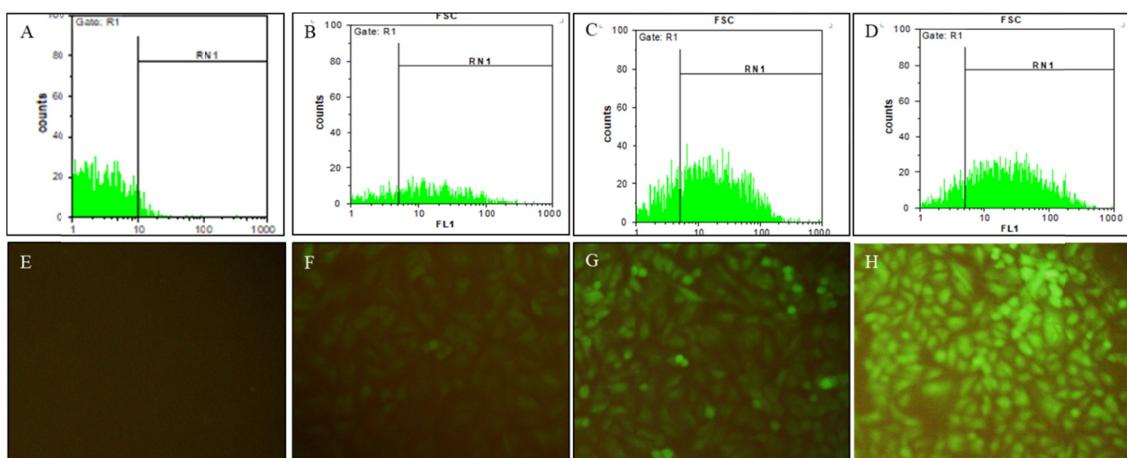
MCF-7 نانوذرات ۳-۵ NBP: تصاویر میکروسکوپ فلورسانس از سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوذرات PLA-PEG-PLA/PEI/siRNA-FAM نشان داد. با افزایش درصد FAM میزان ورود این میسل‌ها به سلول افزایش خواهد یافت به نحوی که در تیمار سلول‌های MCF-7 با میسل‌های NBP-3 بیشترین رنگ فلورسانس و در تیمار سلول‌های MCF-7 با میسل‌های NBP-5 کمترین رنگ فلورسانس مشاهده شد (شکل ۹). همچنین نتایج حاصل از مقایسه میانگین شمارش



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر کوپلیمر مختلف بر زندمانی سلول‌های MCF-7 در غلظت‌ها متفاوت در مدت‌زمان‌ها ۴۸ ساعت



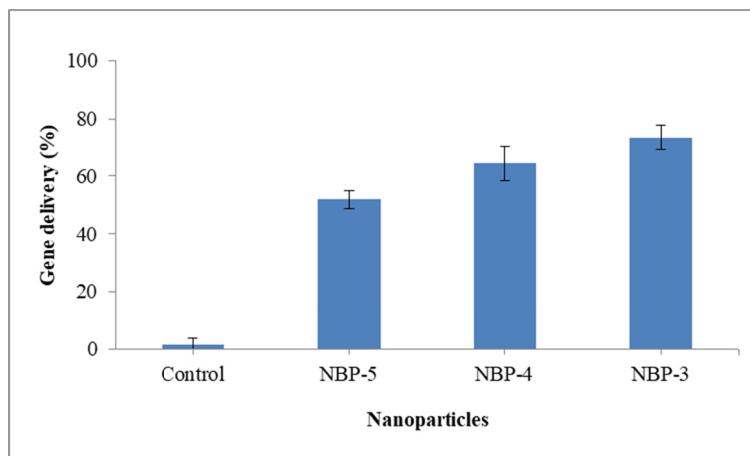
شکل ۸- تصویر میکروسکوپ نوری معکوس از سلول‌های شاهد A؛ و تیمار شده با غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از کوپلیمر NBP-4 در مدت‌زمان ۴۸ ساعت B و C.



شکل ۹- تصویر میکروسکوپ فلورسانس و دستگاه فلوسايتومتری مربوط به ورود siRNA-FAM بارگیری شده روی نانو ذرات PLA-PEG-PLA A و B، (C:D) سلول‌های شاهد SiRNA-FAM به صورت خالص و فاقد پوشش (E:F) و (G:H) به ترتیب دیاگرام و تصویر میکروسکوپ فلورسانس از سلول‌های تیمار شده با NBP-3، NBP-4، NBP-5 و

بالا، زیست‌تخریب‌پذیری مناسب، رهایش پیوسته، قابلیت در دستیابی به مرفو‌لوزی مناسب و غیره، هدف از این مطالعه بررسی تأثیر درصد قطعه PLA در

بحث و نتیجه‌گیری
با توجه به صورت منحصر به فرد کوپلیمرهای قطعه‌ای حاوی قطعات PLA و PEG، از قبیل زیست سازگاری



شکل ۱۰- مقایسه میانگین نتایج حاصل از دستگاه فلوسایتومتری از شمارش سلول‌های تیمار شده با نانوذرات NBP-3، NBP-4 و NBP-5 حاوی PEI/siRNA-FAM

اندازه میسل‌های حاصل نیز کاهش یافت (شکل ۲).

توانایی میسل‌ها در ایجاد اشکال متفاوت از طریق تغییر در تکنیک تهیه میسل، نوع و تعداد بلوک‌های تشکیل‌دهنده کوپلیمر، طول هر زنجیره، تقارن یا عدم تقارن زنجیره‌ها و غیره از دیگر مزایایی استفاده از میسل‌ها هست که کاربرد بالقوه‌ای در داروسانی خواهد داشت (۲۶-۲۹). تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی نگاره از میسل‌های حاصل از کوپلیمرهای متفاوت PLA-PEG-PLA (NBP 3-5)، نشان داد، میسل‌های حاصل در هر سه نوع کوپلیمرهای NBP-3، NBP-4 و NBP-5 دارای شکل کروی می‌باشند (شکل ۳) این تصاویر نشان داد تغییر در نسبت قطعات PLA و PEG تأثیر چندانی بر شکل میسل‌های حاصل نداشته است.

توانایی کوپلیمرهای حاوی قطعات PLA و PEG در کنترل رهایش دارو در تحقیقات متعددی به اثبات رسیده است (۳۰، ۱۰). این ویژگی می‌توان در درمان برخی از بیماری‌ها که نیاز به پیوسته رهایش دارد مطلوب باشد. میسل‌های حاصل از برهمنکش کوپلیمر PLA-PEG-PLA دارای لایه داخلی PLA و پوسته PEG هست، با توجه به خاصیت آب‌دوستی PEG، با افزایش وزن ملکولی این پلیمر نسبت به PLA انتظار می‌رود، پایداری میسل‌های PLA-PEG در محیط‌های آبی کاهش یابد؛ که این موضوع سبب افزایش سرعت در رهایش DNA می‌گردد. میسل‌ها NBP-5 در

کوپلیمر PLA-PEG-PLA بر خصوصیات مرفوولژیکی، سمیت، اندازه، رهایش و همچنین درصد بارگذاری DNA بود. تکنیک‌های متعددی به منظور انکپسوله کردن DNA درون میسل‌های PLA-PEG گزارش شده است (۱۷، ۱۱). در این تحقیق از تکنیک Water-in-oil solvent diffusion technique به دلیل تولید ذرات با اندازه کوچک‌تر، درصد بالای انکپسولاسیون و رهایش مناسب DNA، استفاده گردید. از عوامل مؤثر در اندازه نهایی میسل‌های حاصل از کوپلیمرهای حاوی PLA و PEG می‌توان به تکنیک تهیه میسل و همچنین تعداد قطعات هر کوپلیمر اشاره کرد. به طوری که گزارش شده است تکنیک double Emulsion-diffusion میسل‌های بزرگ‌تر را به وجود خواهد آورد (۱۱). همچنین اندازه میسل‌های حاصل از کوپلیمرهای ستاره‌ای چهار قطعه‌ای در مقایسه با میسل‌های حاصل از کوپلیمرهای دی و تری قطعه‌ای، کوچک‌تر بود. میسل‌های با اندازه کوچک‌تر در مقایسه با میسل‌های بزرگ‌تر از پایداری بالاتری در برقراری EPR برخوردار می‌باشند (۲۵، ۲۴). در این مطالعه با افزایش نسبت قطعه PLA به مقدار قابل توجهی اندازه ذرات حاصل افزوده یافت به طوری که بیشترین اندازه ذرات در کوپلیم NBP-3 که حاوی بیشترین درصد ذرات در PLA بود مشاهده شد این در حالی بود که بین اندازه ذرات و نسبت قطعه PEG رابطه معکوسی وجود داشت به نحوی که با افزایش نسبت

این پلیمرها را با محدودیت مواجه ساخته است لذا اخیراً پوشش پلیمرها کاتیونی با استفاده از پلیمرهای زیست سازگار از قبیل PEG و PLA، به منظور کاهش سمیت آن‌ها و همچنین کنترل رهایش DNA بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۳۸، ۳۹). میسل‌ها از طریق اینترکشن با غشاء سلولی، میزان جذب دارو به سلول‌های پستانداران را به میزان چند برابر افزایش می‌دهند (۲۵، ۳۹). نتایج حاصل از تصویربرداری سلول‌های MCF-7 توسط میکروسکوپ فلورسانس و همچنین نتایج حاصل از دستگاه فلئوسایتومتری، نشان داد با PLA-PEG-PLA افزایش نسبت PLA در کوپلیمر (۳۰) می‌باشد. بازده انتقال siRNA-FAM خواهد یافت (شکل ۹ و ۱۰). با توجه به اینکه انتقال PLA-PEG از PLA-PEG طریق اینترکشن بین غشاء سلولی و میسل‌های PEG انجام می‌گیرد (۲۵). لذا به نظر میرسد یکی از دلایل کاهش درصد انتقال در پلیمرهای با درصد PEG بیشتر، تمایل کمتر آن‌ها در اینترکشن با غشاء سلولی و یا کاهش درصد بارگذاری FITC باشد.

در این تحقیق سه نوع کوپلیمر PLA-PEG-PLA با درصد PLA و PEG متفاوت، بر اساس روش پلیمریزاسیون حلقه باز، سنتز گردید. سپس جهت Water-in-oil DNA توسط تکنیک solvent diffusion technique زیست سازی DNA به کار گرفته شد. نتایج حاصل از دستگاه DLS، تست MTT و همچنین میکروسکوپ فلورسانس نشان داد، بین افزایش اندازه میسل‌های حاصل از انکپسوله سازی DNA توسط PLA میسل‌ها به سلول‌های MCF-7، با افزایش نسبت PLA در این کوپلیمرها رابطه مستقیمی وجود دارد به نحوی که با افزایش نسبت PLA در کوپلیمر PLA-PEG-PLA، اندازه میسل‌های حاصل، سمیت و توانایی نفوذ این میسل‌ها به سلول افزایش می‌یابد. این در حالی بود که با افزایش درصد PLA در کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA سرعت رهایش DNA در ۱۵ دقیقه اول پس از تیمار میسل‌های PLA-DNA با بافر PBS، کاهش یافت. با توجه به اهمیت مرغولوزی، اندازه، سمیت و همچنین سرعت رهایش نانو ناقل‌ها در دارورسانی لذا نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند با به دست آورن رابطه بین اندازه

PBS با سایر میسل‌ها در ۱۵ دقیقه اول تیمار با رهایش بیشتری را نشان داد (شکل ۴). لذا به نظر می‌رسد علت افزایش سرعت رهایش DNA در کوپلیمر NBP-5 ناپایداری بیشتر آن در مقایسه با سایر کوپلیمرهای، به دلیل افزایش نسبت PEG باشد. همان‌طوری که در شکل ۴ دیده می‌شود، در ۱۵ دقیقه اول پس از تیمار میسل‌های PLA-PEG DNA با بافر PBS بخش اعظمی از NBP-3 می‌توان در قسمت سطحی میسل یا هسته انکپسوله شده در هر سه نوع کوپلیمر ۳-۵ رهاسازی شد. با توجه به اینکه طی فرایند انکپسوله PLA-PEG-PLA DNA توسط کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA می‌توان در قسمت سطحی میسل از اینکپسوله گردد لذا به نظر می‌رسد علت رهایش زیاد در زمان اولیه مربوطه به DNA متصل شده به PEG و قسمت‌های سطحی PLA باشد. این در حالی بود که در مدت زمان‌های ۳۰ دقیقه و ۶۰ دقیقه تفاوت محسوسی در سرعت رهایش بین کوپلیمرهای مختلف NBP-4، NBP-3 و NBP-5 مشاهده نگردید (شکل ۴) از دلایل کاهش سرعت رهایش DNA پس از مدت زمان ۱۵ دقیقه شاید بتوان به تداخل زنجیره PEG در رهایش DNA اشاره کرد.

پلیمرهای PEG و همچنین PLA به دلیل زیست سازگاری و زیست تخریب‌پذیری بالا به طور گسترده‌ای در مهندسی بافت و دارورسانی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۱-۳۳). نمودار مقایسه میانگین حاصل از تست زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 تیمار شده با کوپلیمرهای ۳-۵ NBP در غلظت‌ها و مدت‌زمان‌های متفاوت نشان داد، هیچ کدام از کوپلیمرهای ۳-۵ NBP تا غلظت مورد استفاده ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سمیت قابل ملاحظه‌ای نداشتند. همچنین در بین کوپلیمرهای ۳-۵ NBP تفاوت زیادی در اختلاف سمیت مشاهده نشد با این حال به نظر میرسد با افزایش میزان PLA در مقایسه با PEG مقدار کمی بر سمیت کوپلیمرها افزوده می‌گردد (شکل ۵ الی ۸). در بین ناقل‌های ژنی، جهت انتقال ژن به سلول‌های پستانداران، نانو ناقل‌های کاتیونی از قبیل PEI، PAMAM و غیره از بازده ترانسفکشن بالایی برخوردار می‌باشند (۳۴، ۳۵)؛ اما سمیت بالای این پلیمرها به دلیل آسیب به غشاء سلولی، (۳۶، ۳۷) استفاده بالینی

mPEG-PLA polymers: Investigation of conjugate linker and polymer composition on stability, metabolism, antioxidant activity and pharmacokinetic profile. *PloS One*; 2015.10(3): e0118824.

10. Abebe Daniel G, Kandil R, Kraus T, Elsayed M, Merkell OM, Fujiwara T. Three-Layered Biodegradable Micelles Prepared by Two-Step Self-Assembly of PLA-PEI-PLA and PLA-PEG-PLA Triblock Copolymers as Efficient Gene Delivery System. *Macromol biosci*; 2015.15(5):698-711.

11. Perez C, Sanchez A, Putnam D, Ting D, Langer R, Alonso MJ. Poly (lactic acid)-poly (ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *J Control Release*; 2001.75(1):211-224.

12. Jonas JB, Kreissig I, Degenring R. Repeated intravitreal injections of triamcinolone acetonide as treatment of progressive exudative age-related macular degeneration. *Graef Arch Clin Exp*; 2002. 240(10):872-873.

13. Tamura H, Miyamoto K, Kiryu J, Miyahara S, Katsuta H, Hirose F, et al. Intravitreal injection of corticosteroid attenuates leukostasis and vascular leakage in experimental diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 2005.46(4):1440-1444.

14. Young S, Larkin G, Branley M, Lightman S. Safety and efficacy of intravitreal triamcinolone for cystoid macular oedema in uveitis. *Clin Exp Ophthalmol*; 2001.29(1):2-6.

15. van Kooij Rothova BA, de Vries P. The pros and cons of intravitreal triamcinolone injections for uveitis and inflammatory cystoid macular edema. *Ocul Immunol Inflamm*; 2006.14(2):73-85.

16. Tamboli V, Mishra GP, Mitra AK. Novel pentablock copolymer (PLA-PCL-PEG-PCL-PLA)-based nanoparticles for controlled drug delivery: effect of copolymer compositions on the crystallinity of copolymers and in vitro drug release profile from nanoparticles. *Colloid Polymer Sci*; 2013.291(5):1235-1245.

17. Vila A, Sanchez A, Pérez C, José Alonso M. PLA-PEG nanospheres: new carriers for transmucosal delivery of proteins and plasmid DNA. *Polymer Adv Technol*; 2002.13(10-12):851-858.

18. Zou W, Liu Ch, Chen Zh. Preparation and characterization of cationic PLA-PEG nanoparticles for delivery of plasmid DNA. *Nanoscale Res Lett*; 2009.4(9):982.

19. Hu Y, Jiang X, Ding Y, Zhang L, Yang C, Zhang J, et al. Preparation and drug release behaviors of nimodipine-loaded poly (caprolactone)-poly (ethylene oxide)-polylactide amphiphilic copolymer nanoparticles. *Biomaterials*; 2003.24(13):2395-2404.

20. Hu Y, Xie J, Tong YW, Wang CH. Effect of PEG conformation and particle size on the cellular

قطعات تشکیل دهنده PLA-PEG-PLA و هر کدام از خصوصیات فوق الذکر، در طراحی میسل های با اندازه و همچنین سرعت رهایش مورد نظر مطلوب باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات سلوول های بنیادی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل که ما را در اجرای هر چه بهتر تحقیق باری کردنده صمیمانه سپاسگزاری می نماییم.

References

1. Bishop CJ, Majewski RL, Guiriba TR, Wilson DR, Bhise NS, Quiñones-Hinojosa A, et al. Quantification of cellular and nuclear uptake rates of polymeric gene delivery nanoparticles and DNA plasmids via flow cytometry. *Acta Biomater*; 2016. 37:120-130.
2. Chen J, Guo Zh, Tian H, Chen X. Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. *Mol Ther Methods Clin Dev*; 2016.3:16023.
3. Pathak RK, Kolishetti N, Dhar S. Targeted nanoparticles in mitochondrial medicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomed Nanobiotechnol*; 2015.7(3):315-329.
4. Kafil V, Omidi Y. Cytotoxic impacts of linear and branched polyethylenimine nanostructures in A431 cells. *BioImpacts*; 2011.1(1):23-30.
5. Liu G, Ma S, Li S, Cheng R, Meng F, Liu H, et al. The highly efficient delivery of exogenous proteins into cells mediated by biodegradable chimaeric polymersomes. *Biomaterials*; 2010.31(29):7575-7585.
6. Lomas H, Canton I, MacNeil S, Du J, Armes SP, Ryan AJ, et al. Battaglia. Biomimetic pH sensitive polymersomes for efficient DNA encapsulation and delivery. *Adv Mat*; 2007.19(23): 4238-4.
7. Lomas H, Du J, Canton I, Jeppe Madsen P, Warren NJ, et al. Efficient Encapsulation of Plasmid DNA in pH-Sensitive PMPC-PDPA Polymersomes: Study of the Effect of PDPA Block Length on Copolymer-DNA Binding Affinity. *Macromol Biosci*; 2010.10(5):513-530.
8. Locatelli E, Franchini MC. Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system. *J Nanopart Res*; 2012.14(12):1-17.
9. Siddalingappa B, Benson HA, Brown DH, Batty KT, Chen Y. Stabilization of resveratrol in blood circulation by conjugation to mPEG and

- uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells J Control Release; 2007.118(1):7-17.
21. Asadi H, Hamidi M. Preparation of biodegradable nanoparticles of tri-block PLA-PEG-PLA copolymer and determination of factors controlling the particle size using artificial neural network. J Microencapsul; 2011.28(5):406-416.
 22. Hashemi M, Karami-Tehrani F, Ghavami S. Cytotoxicity effect of Cladribine on the MCF-7 human breast cancer cell line. Iran Biomed J; 2004.8(1):7-12.
 23. He G, Venkatraman SS. ABA and BAB type triblock copolymers of PEG and PLA: a comparative study of drug release properties and "stealth" particle characteristics. Int J Pharm; 2007.334(1):48-55.
 24. Jie P, Venkatraman SS, Min F, Freddy BY, Huat GL. Micelle-like nanoparticles of star-branched PEO-PLA copolymers as chemotherapeutic carrier. J Control Release; 2005.110(1):20-33.
 25. Ma P, Mumper RJ. Paclitaxel nano-delivery systems: a comprehensive review. J Nanomed Nanotechnol; 2013.4(2):100.
 26. Cai S, Vijayan K, Cheng D, Lima EM, Discher DE. Micelles of different morphologies—advantages of worm-like filomicelles of PEO-PCL in paclitaxel delivery. Pharm Res; 2007.24(11):2099-2109.
 27. Discher BM, Won YY, Ege DS, Lee JC, Bates FS, Discher DE, et al. Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers. Science; 1999.284(5417):1143-1146.
 28. Rajagopal K, Mahmud A, Christian DA, Pajerowski JD, Brown AEX. Curvature-coupled hydration of semicrystalline polymer amphiphiles yields flexible worm micelles but favors rigid vesicles: polycaprolactone-based block copolymers. Macromolecules; 2010.43(23):9736-9746.
 29. Wu X, Li S, Coumes F, Darcos V, Lai J, Himb K. Modeling and self-assembly behavior of PEG-PLA-PEG triblock copolymers in aqueous solution. Nanoscale; 2013.5(19):9010-9017.
 30. Danafar H, Rostamizadeh K. Drug-conjugated PLA-PEG-PLA copolymers: a novel approach for controlled delivery of hydrophilic drugs by micelle formation. Pharm Dev Technol; 2015:1-11.
 31. Chen H, He S. PLA-PEG coated multifunctional imaging probe for targeted drug delivery. Mol Pharm; 2015.12(6):1885-1892.
 32. Frounchi M, Shamshiri S. Magnetic nanoparticles-loaded PLA/PEG microspheres as drug carriers. J Biomed Mater Res A; 2015.103(5):1893-1898.
 33. Scaffaro SR. reparation of three-layered porous PLA/PEG scaffold: relationship between morphology, mechanical behavior and cell permeability. J Mech Behav Biomed Mater, 2016. 54:8-20.
 34. Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Göpferich A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. Eur J Pharm Biopharm; 2005.60(2):247-266.
 35. Urbiola K, Blanco-Fernández L, Navarro G, Rödl W, Wagner E, Ogris M, et al. Evaluation of improved PAMAM-G5 conjugates for gene delivery targeted to the transferrin receptor. Eur J Pharm Biopharm; 2015.94:116-122.
 36. Hong S, Bielinska AU, Mecke A, Keszler B, Beals JL, Shi X, et al. Interaction of poly (amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: hole formation and the relation to transport. Bioconjug Chem; 2004.15(4):774-782.
 37. Seungpyo H, Leroueil PR, Janus EK, Peters JL, Kober MM, Islam MT, et al. Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. Bioconjug Chem; 2006.17(3):728-734.
 38. Bivas-Benita M, Romeijn S, Junginger HE, Borchard G. PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium. Eur J Pharm Biopharm; 2004.58(1):1-6.
 39. Lim WT, Tan EH, Toh CK, Hee SW, Leong SS, Ang PC, et al. Phase I pharmacokinetic study of a weekly liposomal paclitaxel formulation (Genexol®-PM) in patients with solid tumors. Ann Oncol; 2009:315.