



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

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

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

چکیده

کلیدواژه‌ها

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

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۱۷

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۱/۱۷

زمینه و هدف: سیستم‌های انتقال دارو با خاصیت کنترل رهایش DNA، امکان غلبه بر موانع 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 کوپلیمر PLA-PEG-PLA بر خصوصیات نانو ذرات حاصل بود.

روش کار: در این تحقیق با تغییر نسبت‌های PLA:PEG در کوپلیمر PLA-PEG-PLA نانو ذراتی با خاصیت کنترل اندازه، سرعت رهایش DNA و بازده انتقال siRNA-FAM با موفقیت سنتز شد. بدین منظور کوپلیمرهای مختلفی از PLA-PEG-PLA در حضور لاکتیک اسید، پلی اتیلن گلیکول به‌عنوان ماده اولیه و همچنین stannous octoate به‌عنوان کاتالیز سنتز شد. سپس DNA یا siRNA-FAM با استفاده از تکنیک double emulsion solvent evaporation technique توسط کوپلیمر PLA-PEG-PLA انکپسوله شد. خصوصیات نانو ذرات حاصل از قبیل اندازه، مرفولوژی، الگوی رهایش، سمیت 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 حاصل از DLS نشان داد با افزایش نسبت PLA در کوپلیمر PLA-PEG-PLA اندازه ذرات افزایش می‌یابد علاوه بر این نتایج ما نشان داد افزایش نسبت PLA در کوپلیمر PLA-PEG-PLA سبب کاهش سرعت رهایش DNA از نانو ذرات PLA-PEG-PLA/DNA می‌گردد. همچنین در این تحقیق تأثیر تغییر نسبت PLA:PEG بر بازده انتقال siRNA-FAM توسط میکروسکوپ فلورسانس و دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه گیری: بین افزایش نسبت PLA در کوپلیمر 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 به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 1.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/) صورت گرفته است.



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 tri 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](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



طرفی تزریق پیوسته دارو، خطراتی از قبیل جداسدگی شبکه را در پی خواهد داشت (۱۵). لذا طراحی نانوناقل‌هایی باقابلیت رهایش پیوسته و منظم، به منظور جلوگیری از عوارضی از قبیل دز بالا پس از تزریق و اثرات جانبی تزریقات پی‌درپی در این‌گونه 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 تخریب پذیری مناسبی نیز برخوردار هستند. به همین دلیل در گذشته تحقیقات متعددی به منظور انکپسوله سازی 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 آسیب پذیر 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 نسبت PLA بر خصوصیات رهایش، بازده انکپسولاسیون DNA، سمیت، مرفولوژی و همچنین بازده انتقال siRNA-FAM به سلول‌های MCF-7 انجام گرفت. بدین منظور سه کوپلیمر PLA-PEG-PLA با نسبت‌های متفاوتی از PLA و PEG سنتز شدند و پس از بارگذاری با DNA، خصوصیات فوق-الذکر به ترتیب توسط نانودراپ، 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 جهش یافته و معیوب، پنجره‌ای 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 اندام 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 تخریب پذیر و زیست سازگار مناسب، می‌تواند نتایج امیدوارکننده‌ای را جهت استفاده بالینی نانو ناقل‌ها در ژن درمانی در پی داشته باشد.

پلیمرهای چند قطعه‌ای حاوی قطعات آب دوست و آب گریز در محیط‌های آبی تشکیل میسل‌های پایداری را می‌دهند که از توانایی بالایی در انتقال و محافظت از داروهای انکپسوله شده، از قبیل DNA، RNA، پپتید، پروتئین و غیره، در برابر عوامل مخرب بیرونی برخوردار هستند (۵-۷) از طرفی پایداری مناسب میسل‌های تشکیل شده حاصل از کوپلیمرهای قطعه‌ای حاوی قطعات آب دوست و آب گریز، 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 شبکه بوده که نیاز به سطح پایداری از کورتیکواستروئیدها در ناحیه مورد درمان هست (۱۲)، در این بیماری به منظور جلوگیری از عوارض سیستمیک داروهای مورد استفاده، تزریق مستقیم به بافت چشمی انجام می‌گیرد (۱۳، ۱۴). از

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

بررسی ره‌ایش DNA پلاسمید از کopolymerهای PLA-PEG-PLA: میزان ره‌ایش DNA پلاسمیدی از کopolymerهای PLA-PEG-PLA، بر اساس مقایسه DNA آزاد شده از کopolymerهای PLA-PEG-PLA با DNA بارگذاری شده در هر کدام از این کopolymerها به دست آمد. بدین منظور یک میلی‌لیتر بافر TE به ۱۵ میلی‌گرم کopolymerهای PLA-PEG-PLA به‌طور جداگانه اضافه گردید. سوسپانسیون‌های حاصل به مدت ۱۵ دقیقه بر روی انکوباتور شیکر با درجه حرارت ۳۷ درجه و دور rpm ۴۵ نگهداری شدند. نانو ذرات PLA-DNA/PEG با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شده و پس از خارج کردن محلول رویی مجدداً یک میلی‌لیتر بافر (Tris/EDTA buffer) TE به هریک از تیمارها اضافه شد سپس سایر مراحل فوق‌الذکر برای زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه نیز انجام گردید.

بررسی سمیت کopolymerهای PLA-PEG-PLA (NBP 3-5): بررسی سمیت کopolymerهای PLA-PEG-PLA بر اساس تست MTT انجام گردید. بدین منظور ۰/۲ میلی‌لیتر از سلول‌های MCF-7 با تراکم 1×10^5 بر میلی‌لیتر به هر یک از چاهک‌های بلیت‌های ۹۶ خانه‌ای منتقل و در دمای ۳۷ درجه با CO_2 ۵ درصد نگهداری گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت، به هر یک از چاهک‌ها به ترتیب مقدار ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هر کدام از کopolymerهای PLA-PEG-PLA (NBP 3-5) اضافه گردید (تکرار=۳). سپس پس از گذشت

siRNA-FAM از میکروسکوپ فلورسانس و دستگاه فلئوسایتومتری استفاده گردید. ما اعتقاد داریم با به دست آوردن رابطه بین وزن ملکولی هر کدام از این قطعات بر فاکتورهای فوق‌الذکر، می‌توان در آینده میسل‌هایی با اندازه و سرعت ره‌ایش مطلوب و موردنظر، با کاربردهای درمانی متفاوت تولید نمود.

روش کار

سنتز کopolymer (NBP 3-5) PLA-PEG-PLA: کopolymerهای PLA-PEG-PLA با درصد متفاوت PLA و PEG (جدول ۱)، با استفاده از پلیمریزاسیون حلقه باز، در حضور L -لاکتاید و PEG به‌عنوان آغازگر و همچنین $Sn(Oct)_2$ به‌عنوان کاتالیزور سنتز شد (۲۱).

آماده سازی کمپلکس PLA-PEG-PLA/pDNA: آماده‌سازی کopolymerهای PLA-PEG-PLA (NBP 3-5) حاوی DNA پلاسمیدی بر اساس تکنیک Water-in-oil solvent diffusion technique انجام گردید. به‌منظور بررسی درصد بارگذاری هریک از کopolymerهای PLA-PEG-PLA (NBP 3-5)، پس جمع‌آوری نانو ذرات PLA-PEG-DNA/PLA محلول رویی هر یک از تیمارها به‌طور جداگانه جمع‌آوری، سپس عدد جذبی آن‌ها در ۲۶۰ نانومتر توسط نانودراپ 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 میلی‌گرم از هر کدام از نانو ذرات حاصل در ۱۰۰ میکرو لیتر بافر TE حل شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه نگهداری شد. سپس در دمای ۴ درجه با دور rpm ۱۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. ۳۰ میکرو لیتر از محلول رویی برداشته‌شده و توسط ژل آگارز ۰/۸ درصد به مدت ۲ ساعت در ۸۰V الکتروفورز گردید.

بررسی خصوصیات مرفولوژیکی و اندازه ذرات حاصل از برهمکنش PLA-PEG-PLA با DNA: به‌منظور

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

نام کopolymer PLA-PEG-PLA	درصد PEG/PLA در کopolymer PLA-PEG-PLA
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. انکپسولاسیون در کوپلیمرهای NBP-3 و NBP-5 به ترتیب ۴۸/۳۳ و ۳۸/۳۳ بود (شکل ۱).

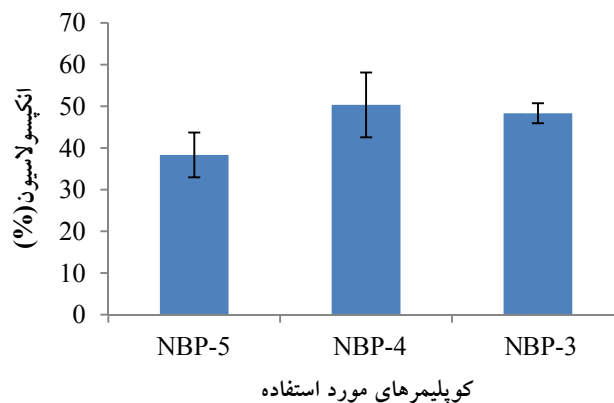
نتایج حاصل از بررسی اندازه ذرات حاصل از برهمکنش هر یک از کوپلیمرهای NBP 3-5 و همچنین اندازه ذرات حاصل از برهمکنش این کوپلیمرها با DNA توسط دستگاه DLS، نشان داد. با افزایش درصد PEG در کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA اندازه ذرات به طور محسوسی کاهش می یابد به نحوی که کمترین اندازه ذرات در نانو ذرات حاصل از برهمکنش کوپلیمر NBP-5 مشاهده شد (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 می دهد (شکل ۲).

تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) از نانو ذرات حاصل از برهمکنش کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA با pDNA نشان داد نانو ذرات حاصل در تمامی تیمارها دارای شکل کروی می باشند به نحوی 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

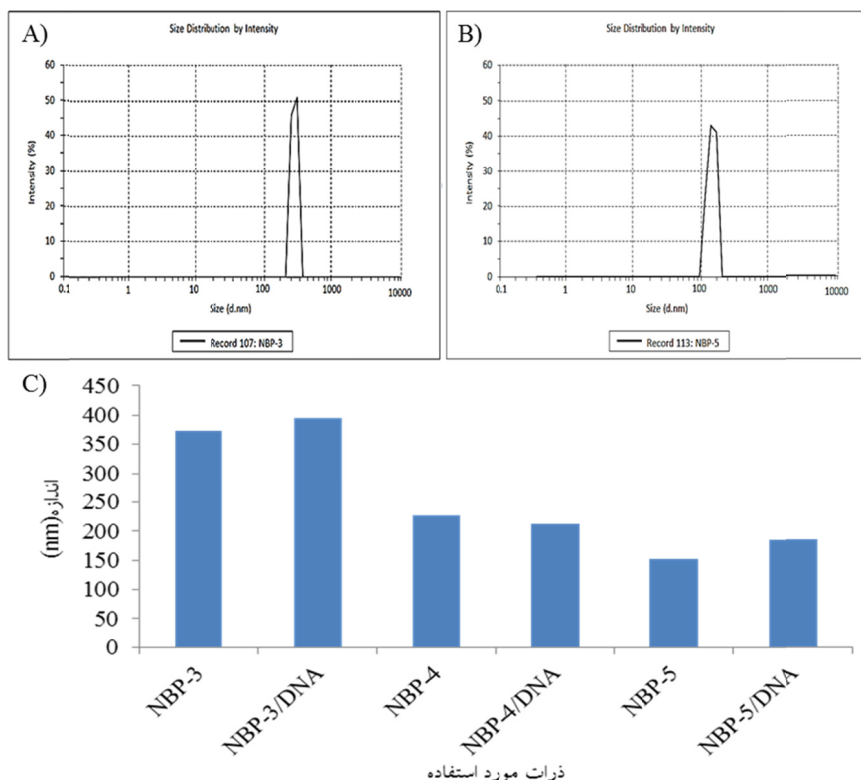
مدت زمان های ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت، بقای سلول ها با استفاده از تست MTT مورد سنجش قرار گرفت (۲۲). بررسی تأثیر نسبت های متفاوت PLA:PEG در کوپلیمر PLA-PEG-PLA بر بازده انتقال siRNA به سلول های MCF-7: بدین منظور ابتدا ۲ میلی لیتر از محیط کشت RPMI 1640 حاوی FBS ۱۰ درصد به هریک از چاهک های پلیت ۶ خانه اضافه شد سپس مقدار 2×10^5 سلول به هر چاهک اضافه گردید. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه و $5\% \text{CO}_2$ درصد نگهداری شدند. به منظور تهیه میسل های PLA-PEG-PLA/PEI/siRNA-FAM، ۱۰ میلی گرم از هر کدام از کوپلیمرهای NBP 3-5 به طور جداگانه با ۰/۱ میلی گرم siRNA-FAM و ۰/۱ میلی گرم PEI بارگذاری شد. سپس به هر چاهک به طور جداگانه ۵۰۰ میکرو لیتر PLA-PEG-PLA/PEI/siRNA-FAM از هر کدام از کوپلیمرها NBP 3-5 اضافه و پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و $5\% \text{CO}_2$ درصد نگهداری شدند. از میکروسکوپ فلورسانس به منظور بررسی نفوذ PLA-PEG-PLA/PEI/siRNA-FAM به سلول های MCF-7 استفاده گردید. همچنین به منظور بررسی تأثیر نسبت های PLA/PEG بر بازده انتقال siRNA به سلول های MCF-7 از دستگاه فلوسایتمتری استفاده گردید.

یافته ها

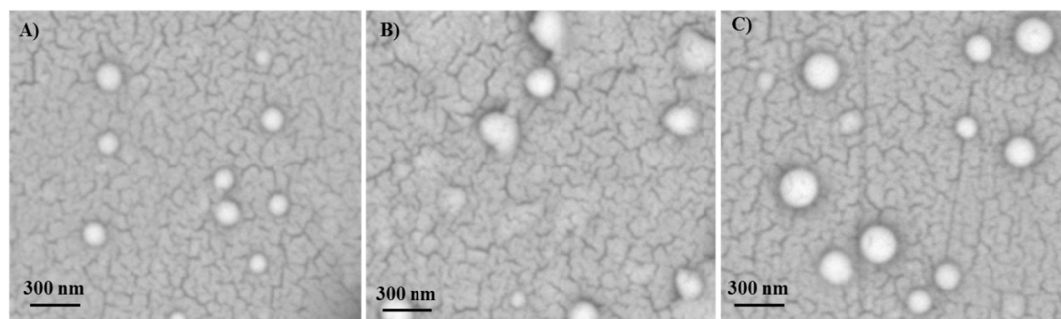
مطالعه خصوصیات مرفولوژیکی و درصد بارگیری pDNA توسط کوپلیمر PLA-PEG-PLA: نتایج



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



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



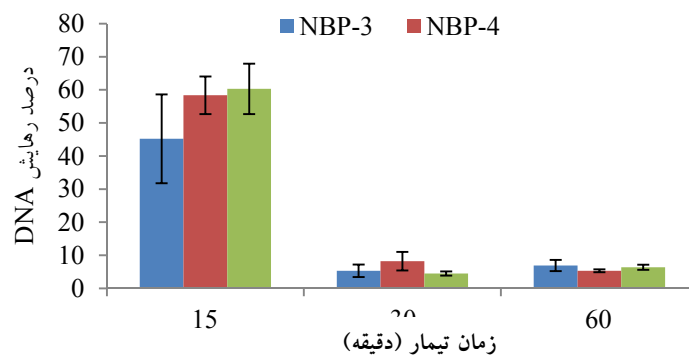
شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) از نانو ذرات حاصل از برهمکنش کوپلیمر PLA-PEG-PLA: به ترتیب (A) نانو ذرات حاصل از برهمکنش کوپلیمر NBP-5، (B) و (C) به ترتیب نانو ذرات حاصل از برهمکنش کوپلیمر NBP-4 و NBP-3

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).

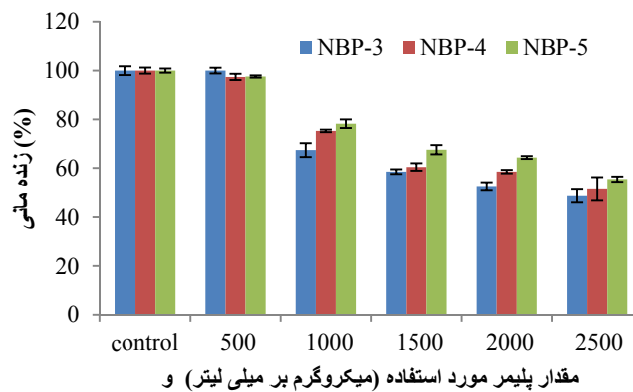
بررسی تأثیر نسبت PLA:PEG در کوپلیمر PLA-PEG-PLA بر بازده انتقال siRNA به سلول‌های

3-5: نتایج مقایسه میانگین داده‌های حاصل از بررسی الگوی رهایش DNA از کوپلیمرهای NBP 3-5 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-PLA (NBP 3-5): نتایج حاصل از تست MTT پس از تیمار سلول‌های MCF-7 با کوپلیمرهای NBP 3-5 در

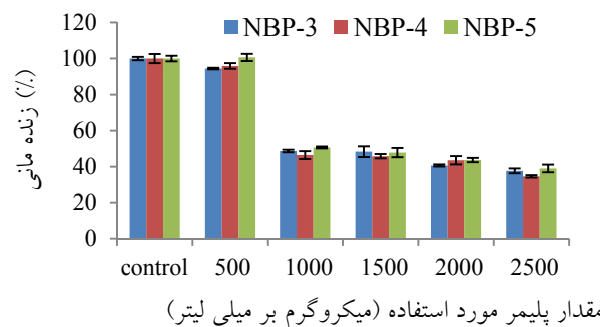


شکل ۴- مقایسه میانگین الگوی رهایش DNA از کopolymerهای 3-5 NBP



مقدار پلیمر مورد استفاده (میکروگرم بر میلی لیتر) و

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

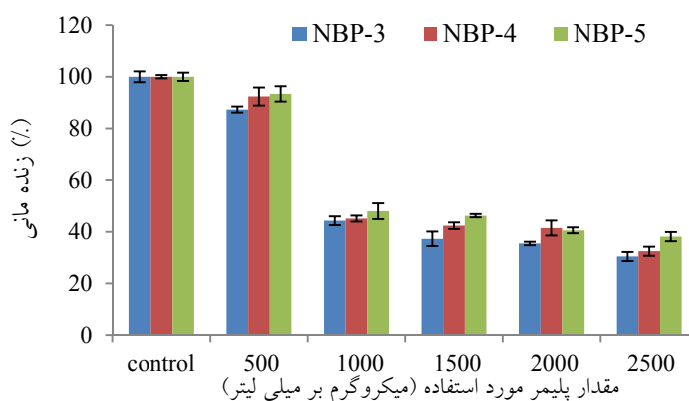


مقدار پلیمر مورد استفاده (میکروگرم بر میلی لیتر)

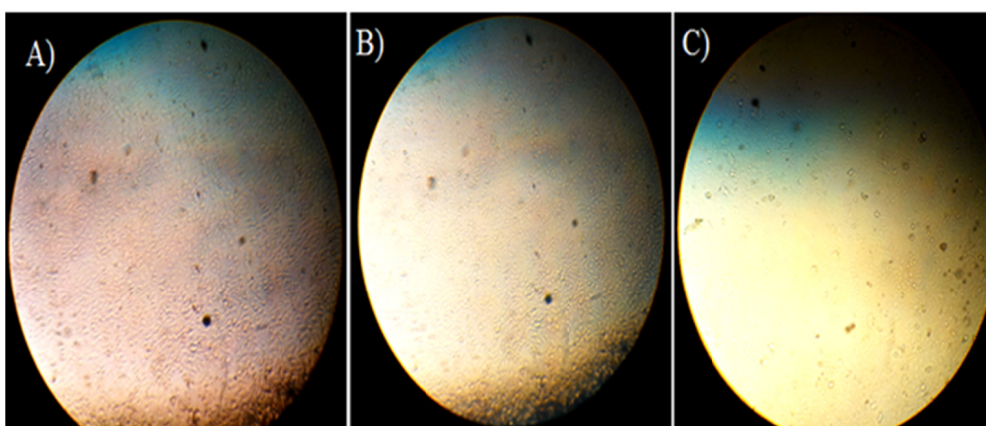
شکل ۶- مقایسه میانگین اثر کopolymer مختلف بر زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 در غلظت‌ها متفاوت در مدت‌زمان‌ها ۲۴ ساعت

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

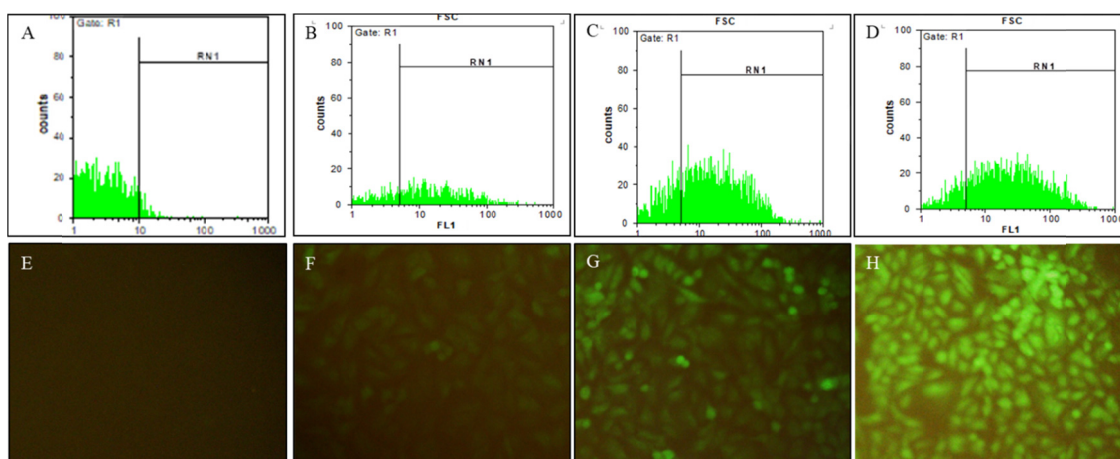
MCF-7 توسط نانو ذرات 3-5 NBP: تصاویر میکروسکوپ فلورسانس از سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانو ذرات PLA-PEG-PLA/PEI/siRNA-FAM نشان داد. با افزایش درصد PLA نسبت به PEG میزان ورود این میسل‌ها به سلول افزایش خواهد یافت به نحوی که در تیمار سلول‌های MCF-7 با میسل‌های NBP-3 بیشترین رنگ فلورسانس و در تیمار سلول‌های 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 زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 در غلظت‌ها متفاوت در مدت‌زمان‌ها ۴۸ ساعت



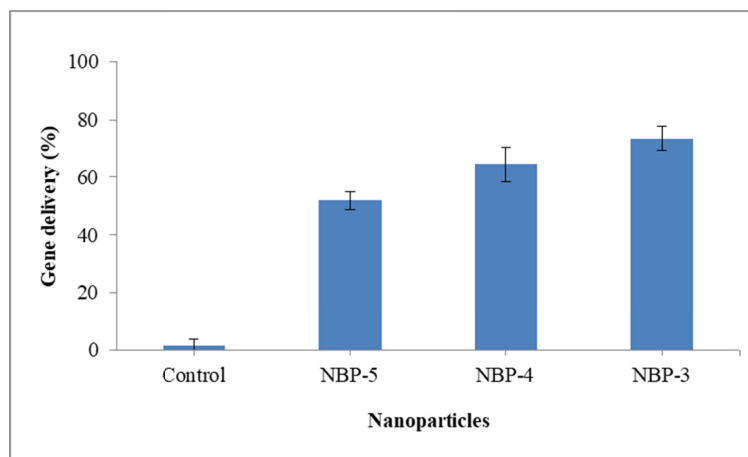
شکل ۸- تصویر میکروسکوپ نوری معکوس از سلول‌های شاهد A؛ و تیمار شده با غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از کوپلیمر NBP-4 در مدت‌زمان ۴۸ ساعت B و C.



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

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

بحث و نتیجه‌گیری
با توجه به صورت منحصربه‌فرد کوپلیمرهای قطعه‌ای حاوی قطعات PLA و PEG، از قبیل زیست‌سازگاری



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

PEG 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 دارورسانی 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 (۱۰، ۳۰). این ویژگی می‌تواند در درمان برخی از بیماری‌ها که نیاز به پیوسته رهایش دارد مطلوب باشد. میسل‌های حاصل از برهمکنش 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 مرفولوژیکی، سمیت، اندازه، رهایش و همچنین درصد بارگذاری DNA بود. تکنیک‌های متعددی به‌منظور انکپسوله کردن DNA درون میسل‌های PLA-PEG گزارش شده است (۱۱، ۱۷). 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. به‌طوری‌که گزارش شده است تکنیک double emulsion در مقایسه با تکنیک Emulsion-diffusion میسل‌های بزرگ‌تری را به وجود خواهند 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 برابر سیستم EPR برخوردار می‌باشند (۲۴، ۲۵). در این مطالعه با افزایش نسبت قطعه PLA به مقدار قابل توجهی اندازه ذرات حاصل افزوده یافت به‌طوری‌که بیشترین اندازه ذرات در کوپلیمر NBP-3 حاوی بیشترین درصد 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 (۱۰، ۳۸). 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 فلئوسایتومتتری، نشان داد با افزایش نسبت PLA در کوپلیمر PLA-PEG-PLA، بازده انتقال siRNA-FAM افزایش خواهد یافت (شکل ۹ و ۱۰). با توجه به اینکه انتقال PLA-PEG از طریق اینترکشن بین غشاء سلولی و میسل‌های PLA-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 انکپسوله سازی DNA توسط تکنیک Water-in-oil solvent diffusion technique 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-PEG-PLA، سمیت و همچنین توانایی نفوذ این 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-PEG-PLA/DNA با بفر PBS، کاهش یافت. با توجه به اهمیت مرفولوژی، اندازه، سمیت و همچنین سرعت رهایش نانو ناقل‌ها در دارورسانی لذا نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند با به دست آوردن رابطه بین اندازه

مقایسه با سایر میسل‌ها در ۱۵ دقیقه اول تیمار با PBS 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 کوپلیمرها، به دلیل افزایش نسبت PEG باشد.

همان طوری که در شکل ۴ دیده می‌شود، در ۱۵ دقیقه اول پس از تیمار میسل‌های PLA-PEG-PLA/DNA با بفر PBS بخش اعظمی از DNA انکپسوله شده در هر سه نوع کوپلیمر NBP 3-5 رهاسازی شد. با توجه به اینکه طی فرایند انکپسوله سازی DNA توسط کوپلیمرهای PLA-PEG-PLA، DNA می‌تواند در قسمت سطحی میسل یا هسته میسل انکپسوله 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-3، NBP-4 و NBP-5 مشاهده نگردید (شکل ۴) از دلایل کاهش سرعت رهایش DNA پس از مدت‌زمان ۱۵ دقیقه شاید بتوان به تداخل زنجیره PEG در رهایش DNA اشاره کرد.

پلیمرهای PEG و همچنین PLA به دلیل زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری 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 NBP 3-5 در غلظت‌ها و مدت‌زمان‌های متفاوت نشان داد، هیچ‌کدام از کوپلیمرهای NBP 3-5 تا غلظت مورد استفاده ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سمیت قابل ملاحظه‌ای نداشتند. همچنین در بین کوپلیمرهای NBP 3-5 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, Merkel 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 هرکدام از خصوصیات فوق الذکر، در طراحی میسل‌های با اندازه و همچنین سرعت رهایش موردنظر مطلوب باشد.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل که ما را در اجرای هر چه بهتر تحقیق یاری کردند صمیمانه سپاسگزاری می‌نماییم.

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. *BiolImpacts*; 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, Pajeroski 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. preparation 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.