

## بررسی تاثیر پلیمر PLL بر خصوصیات و کارایی انتقال ژن توسط دی بلاک کوپلیمر زیست

## تخریب پذیر PLA-PEG

سید احمد موسوی سوها M.Sc، هاشم یعقوبی Ph.D.\*

- گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: [yaghoubi\\_h@iauardabil.ac.ir](mailto:yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۴

## چکیده

**هدف:** مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر انکیپسوله سازی همزمان DNA با نسبت های متفاوت PLL توسط کوپلیمر PLA-PEG بر افزایش کارایی انتقال ژن به سلول های پستانداران و خصوصیتی از قبیل زیست سازگاری، محافظت از DNA در برابر آنزیم های برشی، سرعت رهایش DNA، اندازه و پتانسیل ذاتی ذرات انجام گرفت.

**مواد و روش ها:** نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA با نسبت های متفاوت PLL، بر اساس تکنیک انتشار حلال تهیه شدند. سپس درصد رهایش DNA، اندازه و پتانسیل ذاتی ذرات در بافر سالیین فسفات با pH=7/4 مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** با افزایش درصد PLL در نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA اندازه و پتانسیل ذاتی ذرات حاصل افزایش یافت. آنالیز ژل الکتروفورز از DNA استخراج شده از نانوذرات PLA-PEG/DNA و PLA-PEG/PLL/DNA پس از تیمار با آنزیم DNase I، بیانگر توانایی کوپلیمر PLA-PEG و PLA-PEG/PLL در محافظت از DNA بود. بررسی فلوسایتومتری و میکروسکوپ فلورسنس تایید کرد که بازده انتقال ژن با افزایش نسبت PLL در نانوذرات PLA-PEG / PLL / DNA بهبود می یابد. علاوه بر این بازده انتقال ژن یک و نیم برابر بیشتر از پروتئین DNA / PLL در محیط سرمی است.

**نتیجه گیری:** نتایج این تحقیق نشان داد نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA از توانایی بالایی در انتقال ژن به سلول های MCF-7 در مقایسه با کمپلکس PLL/DNA در محیط های حاوی سرم برخوردار می باشند.

**واژگان کلیدی:** PLA-PEG، PLL، زیست سازگاری، رهایش DNA و انتقال ژن

## مقدمه

امروزه تحقیق در زمینه ژن درمانی به عنوان یک عامل بالقوه جهت درمان بیماری‌های حیاتی انسان از قبیل سرطان، اختلالات ژنتیکی و غیره به سرعت در حال انجام است (۱). استفاده از ویروس‌ها در ژن رسانی با بازده نسبتاً بالایی انجام می‌گیرد اما با این حال همیشه امکان جهش در این ویروس‌ها از نگرانی‌های ژن درمانی می‌باشد (۲). لذا با توجه به اهمیت ژن درمانی، توسعه یک سیستم بالقوه که از توانایی انتقال ژن به سلول‌ها یا بافت خاص در بدن که از لحاظ ایمنی نیز خطرناک نباشد ضروری به نظر می‌رسد در میان ناقل‌های غیر ویروسی انتقال ژن. پلیمرها کاتیونی از قبیل پلی اتیلن‌ایمین (PEI)، پلی ال لایزین (PLL) و پلی ۲-دی متیل امینواتیل متاکریلات (PDMAEMA) به دلیل بازده انتقال بالای ژن بارها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۳-۵). اکثر پلیمرها کاتیونی که در انتقال ژن مورد استفاده قرار می‌گیرند زیست تخریب پذیر نبوده و در صورت استفاده در ژن رسانی خطر انباشتگی آنها در بدن وجود دارد (۶). از جمله پلیمرهای کاتیونی مورد استفاده در این زمینه می‌توان به پلی ال لایزین (PLL) اشاره کرد (۷). گروه‌های آمین در این پلیمر دارای بار کاتیونی بالایی می‌باشند که می‌توانند با بار منفی گروه فسفات در DNA برهمکنش الکترواستاتیک داده و ذراتی بین ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر بوجود آورند. این ذرات از توانایی بالایی جهت ورود به سلول طی پدیده آندوسیتوز برخوردارند (۸). از معایب استفاده از پلی کاتیون‌هایی از قبیل PEI و PLL در انتقال ژن می‌توان به سمیت بالا و پایداری کم آنها در برابر سیستم ایمنی بدن اشاره کرد (۹ و ۱۰). به منظور غلبه بر این مشکلات از روش‌های متعددی از جمله اتصال کوالانت PEG به پلی کاتیون‌ها استفاده شده است. این عمل سبب افزایش پایداری نانوذرات در سیستم گردش خون می‌شود. با این حال وجود زنجیره PEG با ایجاد ممانعت فضایی جهت برهم‌کنش مناسب پلی کاتیون با DNA، مانع از متراکم شدن مناسب DNA می‌شود (۱۲).

و (۱۱). علاوه بر این کمپلکس پلی کاتیون/DNA در برابر پلی آنیون‌هایی همچون گلیکوز آمینوگلیکان و سولفات دکستران از پایداری پایینی برخوردار است (۹ و ۱۳). استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر از قبیل پلی لاکتیک اسید (PLA) و پلی لاکتیک کوگلاپکولیک اسید (PLGA) به دلیل تخریب زیستی و حذف محصول حاصل در چرخه اسید سیتریک، دارای زیست سازگاری مناسبی می‌باشند. سرعت تخریب پذیری در پلیمرهای زیست تخریب پذیر با توجه به وزن ملکولی، نوع پلیمر و نسبت پلیمر (در کوپلیمرها) می‌تواند از چند روز تا چند سال متغیر باشد (۶). اندازه بزرگ ذرات حاصل، بازده کم انکپسولاسیون DNA و تمایل برهمکنش هیدروفوبیک بین پروتئین‌های پلاسما با این پلیمرها که سبب شناسایی و حذف ذرات توسط سیستم رتیگولاندوتلیال (RES) می‌شود، از جمله موانع کاربرد این پلیمرها در ژن رسانی هستند (۱۴ و ۱۶). اصلاح سطحی پلیمرهای آبگریز از قبیل PLA، توسط پلی اتیلن گلیکول آبدوست و تولید پلیمر دوگانه دوست PLA-PEG علاوه بر کاهش اندازه ذرات حاصل، به دلیل افزایش آبدوستی، انکپسولاسیون DNA و زمان گردش در خون را در مقایسه با PLA تنها افزایش می‌دهد (۱۵). نتایج تحقیقات گذشته نشان داده است پوشش کمپلکس PEI/DNA توسط کوپلیمر PLA-PEG با تشکیل یک هسته آبگریز نفوذ ناپذیر مانع از نفوذ پلی آنیون به کمپلکس PEI/DNA شده و علاوه بر افزایش پایداری کمپلکس تاثیر سمیت PEI را نیز کاهش می‌دهد (۹). با توجه به بازده بالای پلیمر PLL در انتقال ژن و همچنین زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و پایداری بالای کوپلیمرهای PLA-PEG در برابر سیستم ایمنی بدن، این تحقیق با هدف بررسی راه کاری که بتوان از مزایای پلیمرهای PLL، PEG و PLA به طور توأم در ژن رسانی استفاده نمود، انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

جهت بررسی پایداری نانوذرات PLA-PEG/DNA و PLA-PEG/PLL/DNA در برابر هضم آنزیمی یک میلی‌گرم از نانوذرات PLA-PEG/DNA و PLA-PEG/PLL/DNA حاوی مقدار متفاوت از پلیمر PLL (۲۵، ۵۰، و ۷۵ میکروگرم PLL بر میلی‌گرم PLA-PEG) با آنزیم DNase I (0.2 U/ $\mu$ g DNA) و بافر هضم (Tris-HCl ۵۰ میلی مولار و  $MgCl_2$  ۱۰ میلی مولار) به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد نگهداری شدند. کوپلیمر PLA-PEG و پلیمر PLL با اضافه کردن هیپارین در غلظت نهایی ۱ درصد و نگهداری به مدت ۴ ساعت بر روی انکوباتور شیکردار با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۲۰ rpm، جداسازی شدند. جداسازی شده توسط فریزدراینگ تغلیظ شده و توسط ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت.

#### سمیت نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA: به منظور

محاسبه سمیت پلیمر PLL، کمپلکس PLL/DNA و نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA ابتدا سلول‌های MCF-7 با تراکم ۷۰۰۰ سلول در هر ویال به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای منتقل شدند سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی اکسید کربن ۵ درصد نگهداری شدند. به هر یک از چاهک‌ها به‌طور جداگانه پلیمر PLL، PLL/DNA و نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA با مقدار متفاوت PLL در سه تکرار اضافه شد سپس مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در شرایط فوق‌الذکر نگهداری شدند. جهت محاسبه درصد زنده مانی سلول‌ها از تست MTT استفاده شد (۱۷). بدین منظور محیط کشت رویی سلول‌ها خالی شد و ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT تهیه شده در بافر سالین فسفات (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۳ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. محلول MTT از چاهک‌ها خارج شد سپس کریستال‌های فومازین تشکیل شده در هر چاهک، توسط ۲۰۰ میکرولیتر

#### آماده سازی و بررسی خصوصیات نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA

به منظور تهیه نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA از تکنیک double emulsion solvent evaporation technique استفاده شد (۱۶) به‌طور خلاصه ۳۰ میلی‌گرم از کوپلیمر PLA-PEG به همراه مقدار متفاوتی از پلیمر PLL (۱۵۰، ۷۵۰، ۱۵۰۰ و ۲۲۵۰ میکروگرم) در یک میلی‌لیتر کلروفرم حل شد (۵، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکروگرم PLL بر میلی‌گرم PLA-PEG) سپس به مدت ۳۰ ثانیه با ۰/۲ میلی‌لیتر بافر TE حاوی ۲۵۰ میکروگرم DNA (پلاسمید pEGFP-N1) و ۲ میلی‌گرم BSA سونیکه شد (Sonicator® XL, Misonix, NY). محلول حاصل با ۱/۵ میلی‌لیتر محلول PVA یک درصد ترکیب و به مدت ۲ دقیقه روی یخ سونیکه شد. ۲۵ میلی‌لیتر از محلول PVA ۰/۳ درصد توسط سرنگ و به آرامی به محلول فوق‌الذکر تزریق گردید سپس به منظور حذف کلروفرم به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق با دور بالا مخلوط شد. نانوذرات حاصل در ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۱ ساعت جمع‌آوری شدند سپس سوپرناتانت به منظور محاسبه درصد بارگذاری جداسازی شد و میزان DNA موجود در آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتری (طول موج ۲۶۰ nm) تعیین و با DNA مورد استفاده در فرآیند بارگذاری مقایسه شد. نانوذرات باقی مانده به منظور حذف DNA بارگذاری نشده و PVA سه مرتبه توسط آب استریل مورد شستشو قرار گرفتند سپس توسط روش فریزدرای خشک شدند.

به منظور محاسبه خصوصیات مرفولوژیکی نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)(LEO 1430VP) استفاده شد همچنین اندازه و پتانسیل ذرات حاصل در بافر PBS با pH=7/4 توسط دستگاه DLS (Malvern Instruments, UK) مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی اثر محافظتی نانوذرات PLA-PEG/DNA و PLA-PEG/PLL/DNA از DNA در برابر هضم آنزیمی

۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد، محیط رویی سلول‌ها با محیط جدید RPMI-1640 حاوی FBS ۱۰ درصد جایگزین شد و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط فوق‌الذکر نگهداری شد. جهت بررسی تاثیر پلیمر PLL بر کارایی ترانسفکشن نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA از میکروسکوپ فلورسانس و دستگاه فلورسایومتر استفاده شد.

#### آنالیز آماری

تمامی فاکتورهای کمی مورد بررسی در این تحقیق با حداقل ۳ تکرار انجام گرفت. تجزیه تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و از طریق تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) انجام گرفت. از آزمون چندمرحله‌ای دانکن در سطح ۵ درصد به منظور بررسی مقایسه میانگین استفاده شد سپس میانگین هر یک از تیمارها به همراه انحراف استاندارد ( $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ) بیان شد.

#### نتایج

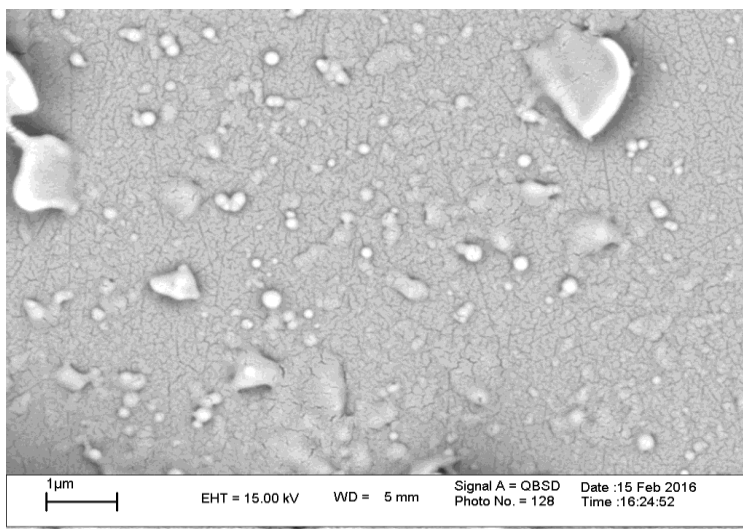
#### بررسی خصوصیات نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA (مورفولوژی، اندازه، پتانسیل زتای و بازده انکپسوله سازی)

مورفولوژی نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA (۲۵ میکروگرم PLL در یک میلی‌گرم PLA-PEG) در شکل ۱ نشان داده شده است تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) نشان داد. نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA دارای شکل کروی و سطح صاف هستند (شکل ۱).

DMSO حل شد و نهایتاً جذب نوری هر کدام از نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. الگوی رهایش DNA در شرایط درون شیشه‌ای از نانوذرات PLA-PEG/DNA و PLA-PEG/PLL/DNA یک میلی‌گرم از هر کدام از نانوذرات PLA-PEG/DNA و PLA-PEG/PLL/DNA حاوی مقدار متفاوت پلیمر PLL (۵، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکروگرم PLL بر میلی‌گرم PLA-PEG) در بافر PBS با  $\text{pH}=7.4$  و بر روی انکوباتور شیکر با دور ۱۰۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نانوذرات در مدت زمان‌های مورد نظر (۱، ۳، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز) توسط سانتریفوژ جداسازی شد (دور  $16602 \times g$  و مدت زمان ۱ ساعت) و مقداری از سوپرناتانت حاصل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول ۲۶۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت.

#### ترانسفورماسیون سلول‌های MCF-7 با استفاده از

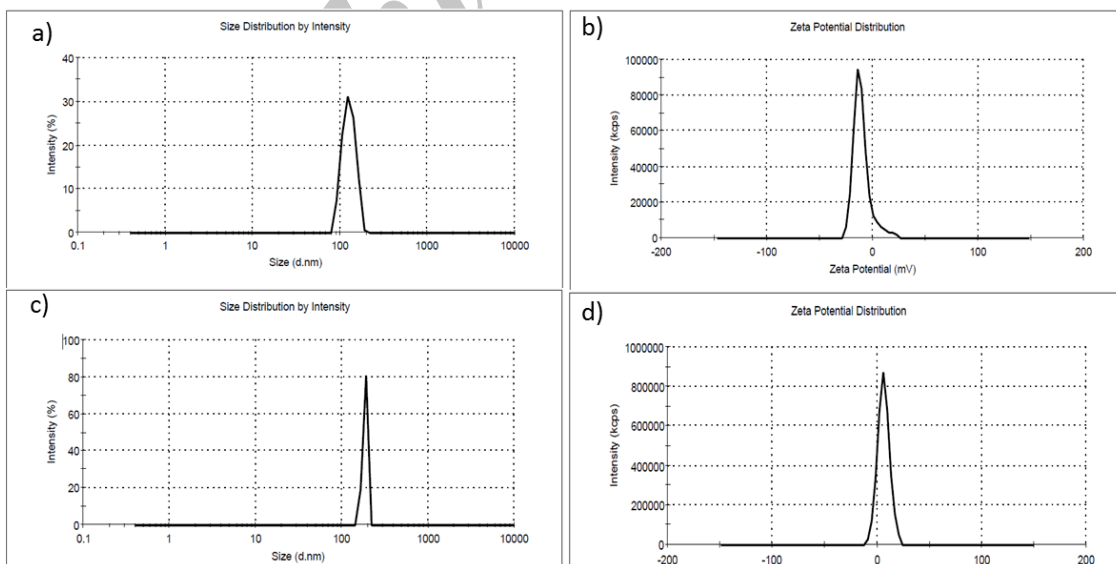
نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA سلول‌های MCF-7 با تراکم ۲۰۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 حاوی FBS ۱۰ درصد به هریک از چاهک‌های پلیت‌های ۲۴ خانه ای منتقل شدند سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت به هر چاهک به‌طور جداگانه یک میلی‌گرم نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA (pEGFP-N1) حاوی مقدار متفاوت PLL (۵، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکروگرم PLL بر میلی‌گرم PLA-PEG) در سه تکرار اضافه شد. از DNA پلاسمیدی فاقد پوشش (pEGFP-N1) به‌عنوان کنترل منفی، و از PLL/DNA به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. پس از نگهداری سلول‌ها به مدت ۷ ساعت در دمای



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA (۲۵ میکروگرم PLL بر یک میلی گرم PLA-PEG)

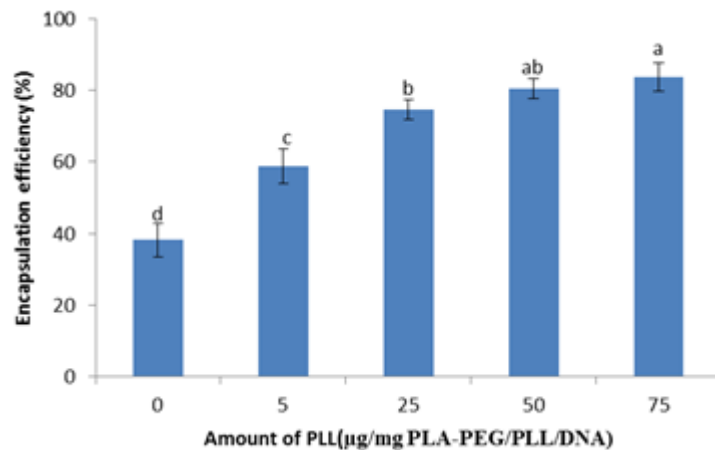
پتانسیل ذتای نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA در مقایسه با افزایش اندازه ذرات، بیشتر بود به نحوی که با افزایش میزان PLL میزان بار سطحی ذرات از ۱۰/۶ mV - در نانوذرات بدون PLL (PLA-PEG/DNA) به ۶/۱۲ mV در نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA حاوی ۷۵ میکروگرم PLL بر میلی گرم PLA-PEG، افزایش یافت.

در این تحقیق اندازه و پتانسیل ذتای ذرات توسط DLS نشان داد با افزایش میزان PLL در نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA بر اندازه و پتانسیل ذتای ذرات افزوده می شود به نحوی بیشترین اندازه و پتانسیل ذتای ذرات در نانوذرات با ۷۵ میکروگرم PLL در میلی گرم PLA-PEG/PLL/DNA مشاهده شد (به ترتیب ۲۳۸ نانومتر و ۶/۱۲ mV) (شکل ۲). تاثیر افزایش مقدار PLL بر



شکل ۲: تاثیر PLL بر اندازه و پتانسیل زتا نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA (a-b) و پتانسیل ذتای نانوذرات PLA-PEG/DNA (c-d)؛ توسط دستگاه DLS؛ (۷۵ میکروگرم PLL بر میلی گرم PLA-PEG/PLL/DNA حاوی ۷۵ میکروگرم PLL بر میلی گرم PLA-PEG)

معنی‌داری میزان انکپسوله سازی DNA را افزایش داد به طوری که بیشترین بازده انکپسوله سازی در نسبت ۷۵ میکروگرم PLL در هر میلی گرم نانوذرات-PLA PEG/PLL/DNA مشاهده شد (۸۳/۷۲ درصد) (شکل ۳).



شکل ۳: تاثیر PLL در انکپسوله سازی DNA درون کوپلیمر PLA-PEG (حروف الفبا نشان دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد)

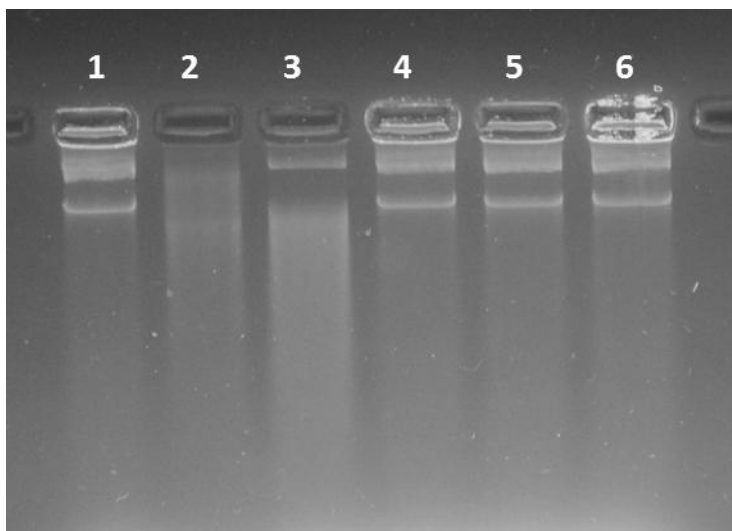
نشان‌دهنده عدم پوشش مناسب توسط نانوذره PLA-DNA PEG/DNA می‌باشد. با مقایسه DNA شاهد با DNA استخراج شده از نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA پس از تیمار با آنزیم DNase I تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد که این امر بیانگر توانایی نانوذرات PLA-DNA PEG/PLL/DNA در محافظت از DNA در برابر هضم آنزیمی، در مقایسه با DNA شاهد می‌باشد (شکل ۴).

تاثیر افزایش مقدار PLL در نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA بر کارایی انکپسوله سازی DNA در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد بازده انکپسوله سازی DNA توسط کوپلیمر PLA-PEG بدون استفاده همزمان از پلیمر PLL (PLA-PEG/DNA) ۳۸/۱۹ درصد بود. استفاده هم زمان پلیمر PLL به‌طور

#### پایداری نانوذرات PLA-PEG/DNA و PLA-

#### PEG/PLL/DNA در برابر هضم آنزیمی

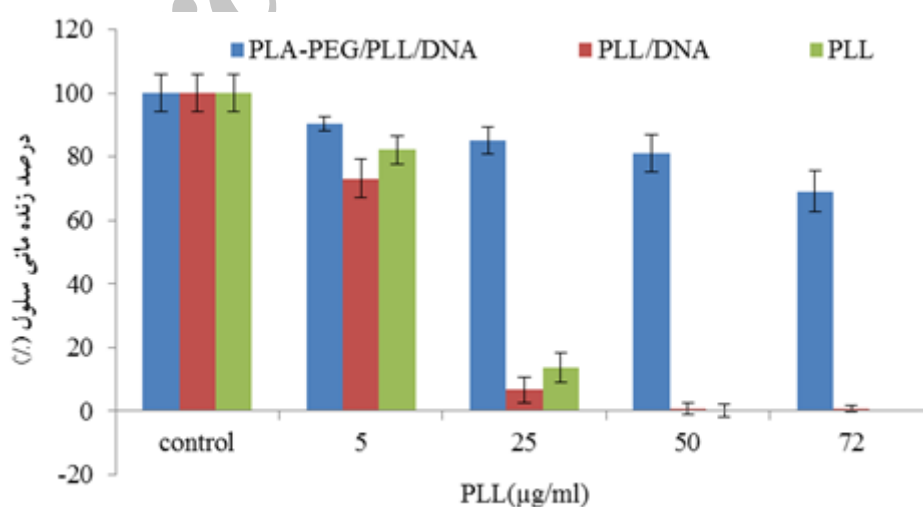
شکل ۴ پایداری نانوذرات PLA-PEG/DNA و PLA-PEG/PLL/DNA حاوی مقدار متفاوت PLL در برابر هضم آنزیم DNase I نشان می‌دهد در چاهک اول DNA شاهد تیمار شده با DNase I هیچ‌گونه بانندی از DNA مشاهده نشد که بیانگر تخریب کامل DNA توسط آنزیم DNase I می‌باشد. همچنین تصویربرداری ژل آگارز نشان داد در چاهک ۲ DNA پلاسمیدی مقداری با DNase I هضم شده است که احتمالاً



شکل ۴: پایداری نانوذرات PLA-PEG/DNA و PLA-PEG/PLL/DNA حاوی مقدار متفاوت PLL در برابر هضم آنزیم DNAs I؛ چاهک اول شاهد، چاهک دوم DNA تیمار شده با آنزیم DNAs I، چاهک سوم نانوذرات PLA-PEG/DNA تیمار شده با آنزیم DNAs I به مدت یک ساعت، چاهک ۴-۶ نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA حاوی نسبت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکروگرم PLL بر میلی‌گرم PLA-PEG تیمار شده با آنزیم DNAs I به مدت یک ساعت زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 را از ۸۲/۲۳ (PLL) و ۷۳/۱۵ (PLL/DNA) به ۰/۴۸ (PLL) و ۰/۷۸ درصد (PLL/DNA) کاهش داد این در حالی بود که حداکثر کاهش زنده‌مانی در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA ۶۹/۰۳ درصد بود که در نانوذرات حاوی ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر PLL مشاهده شد (شکل ۵).

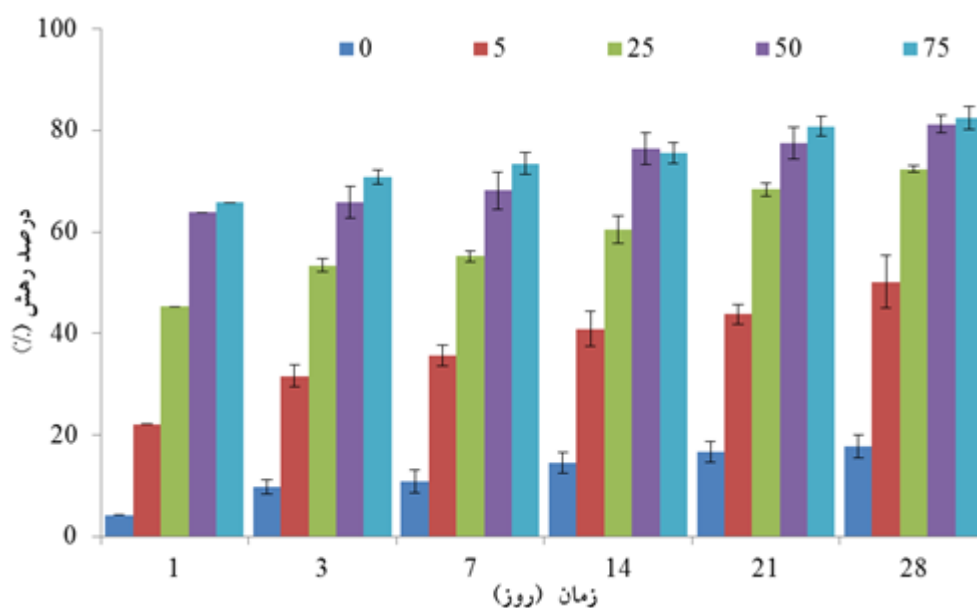
#### سمیت نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA

مقایسه میانگین نتایج حاصل از بررسی سمیت پلیمر PLL، کمپلکس PLL/DNA و نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA توسط تست MTT نشان داد که افزایش غلظت پلیمر PLL به صورت مجزا و یا در ترکیب با DNA (کمپلکس PLL/DNA) از ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب درصد



شکل ۵: سمیت نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA حاوی غلظت‌های متفاوت PLL

PEG/DNA برابر با ۱۷/۷۸ درصد و بیشترین درصد ره‌ایش DNA انکپسوله شده در نانوذرات PLA-PEG/DNA حاوی ۷۵ میکروگرم PLL مشاهده شد (۸۲/۴۵ درصد). همچنین این نتایج نشان داد با افزایش میزان PLL در نانوذرات PLA-PEG/DNA درصد ره‌ایش انفجاری (۲۴ ساعت اول) افزایش و از درصد ره‌ایش آهسته DNA کاسته می‌شود (شکل ۶).



شکل ۶: ره‌ایش DNA از نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA حاوی مقدار متفاوت PLL (۰، ۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ میکروگرم PLL بر میلی‌گرم PLA-PEG) در زمان‌های متفاوت

MCF-7 برخوردار نبود. نتایج دستگاه فلورسایتومتری نشان داد با افزایش نسبت PLL در نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA بر بازده انتقال ژن افزوده شد اگرچه بیشترین بیان ژن GFP در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA حاوی ۵۰ میکروگرم PLL بر میلی‌گرم PLA-PEG مشاهده شد (۳۳/۸۸ درصد) با این وجود در مقایسه با بازده انتقال ژن توسط نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA حاوی ۷۵ میکروگرم PLL در میلی‌گرم PLA-PEG (۲۹/۷۲ درصد) دارای تاثیر معنی داری نبود. همچنین این نتایج نشان داد کمپلکس PLL/DNA از بازده انتقال ژن پایینی در مقایسه با نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA حاوی ۲۵،

### الگوی ره‌ایش DNA از نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA

نتایج مقایسه میانگین ره‌ایش DNA از نانوذرات PLA-PEG/DNA و PLA-PEG/PLL/DNA، نشان داد با افزایش میزان PLL در نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA درصد بیشتری از DNA انکپسوله شده ره‌اسازی می‌گردد. به طوری که کمترین درصد ره‌ایش DNA انکپسوله شده، در نانوذرات PLA-

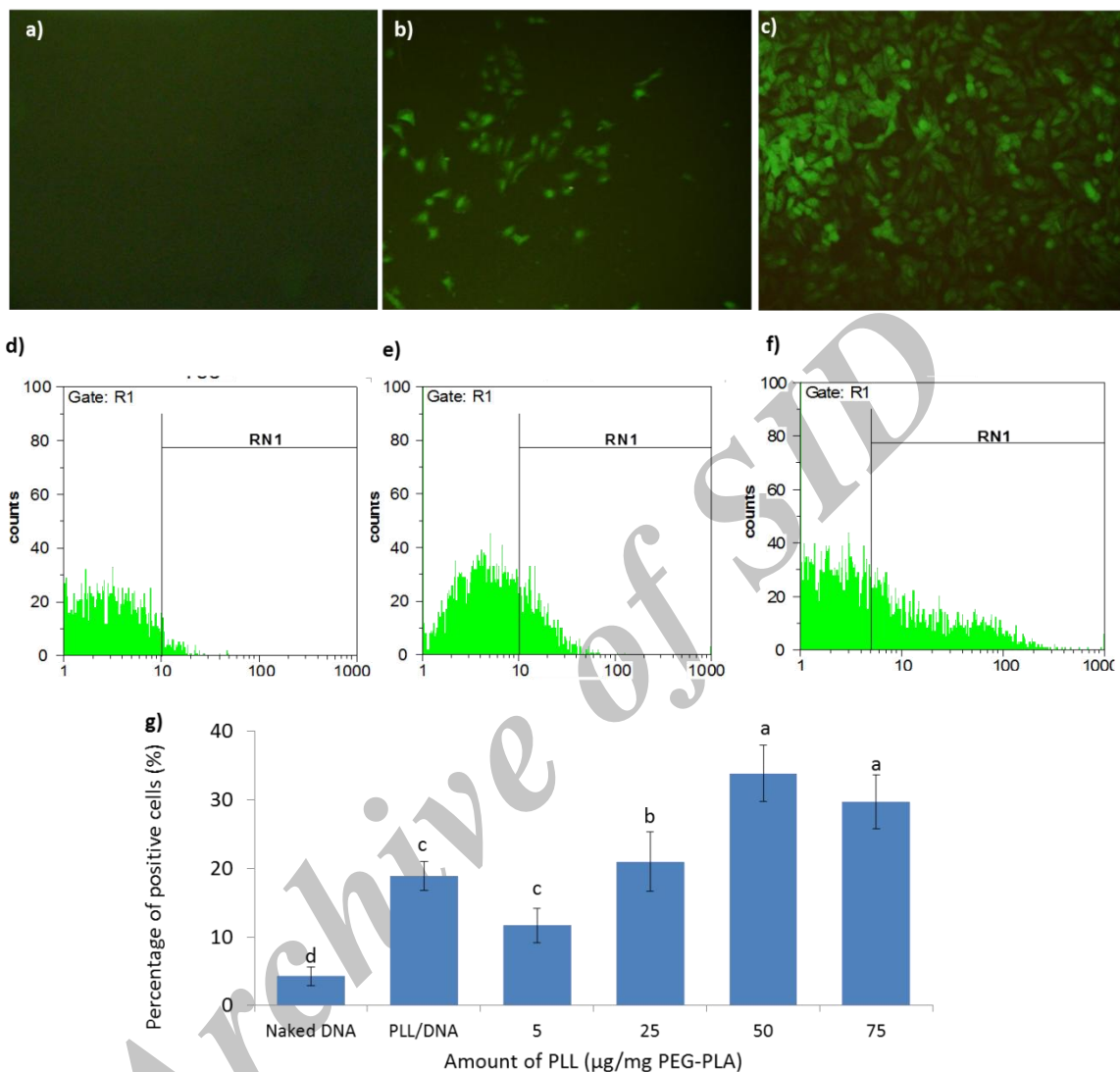
### ترانسفورماسیون سلول‌های MCF-7 با استفاده از نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA

توانایی نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA در انتقال و ره‌ایش DNA به سلول‌های MCF-7 توسط میکروسکوپ فلورسانس و دستگاه فلورسایتومتر به اثبات رسید (شکل ۷). تصویر میکروسکوپ فلورسانس نشان داد در برخی از سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA، نشر سبز رنگ مشاهده شد که نشان دهنده توانایی این نانوذرات در انتقال و ره‌ایش DNA درون این سلول‌ها بود این در حالی بود که DNA فاقد پوشش در محیط حاوی سرم از توانایی انتقال به سلول‌های



در مقایسه با PLL/DNA از ۱۸/۸۸ درصد به ترتیب به ۳۳/۸۸ و ۲۹/۷۲ درصد افزایش یافت (بیش از ۱/۵ برابر).

۷۵ و ۵۰ میکروگرم PLL بر میلی‌گرم PLA-PEG برخوردار است به نحوی که در نسبت های ۷۵ و ۵۰ میکروگرم PLL بر میلی‌گرم PLA-PEG بازده انتقال ژن



شکل ۷: ترانسفکشن سلول‌های MCF-7 توسط کمپلکس PLL/DNA و نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA؛ (a-c) به ترتیب تصویر میکروسکوپ فلورسنس از سلول‌های شاهد، تیمار شده با کمپلکس PLL/DNA و نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA حاوی ۵۰ میکروگرم PLL بر میلی‌گرم PLA-PEG؛ (d-f) به ترتیب میکروگراف فلوسایتومتری از سلول‌های شاهد، تیمار شده با کمپلکس PLL/DNA و نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA حاوی ۵۰ میکروگرم PLL بر میلی‌گرم PLA-PEG؛ (g) بازده ترانسفکشن در سلول‌های MCF-7 توسط نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA

#### بحث

یافته و معیوب، و یا از طریق انتقال siRNA با هدف جلوگیری از بیان ژن‌های مضر پنجره‌ای نو به سوی درمان

انتقال اسید نوکلئیک به سلول‌ها و همچنین بافت‌های آسیب دیده با هدف ژن‌درمانی و درمان ژن‌های جهش

همچنین بازده انتقال ژن می‌توان در آینده میسل‌هایی با بازده انتقال مناسب، سمیت کم و اندازه مورد نظر، با کاربردهای درمانی متفاوت تولید نمود.

اهمیت مورفولوژی ذرات در انتقال و رهش ژن و دارو هم به صورت تجربی و هم به صورت محاسباتی مشخص شده است. نتایج این تحقیقات نشان داده است نانوذراتی که دارای ساختار کروی هستند از توانایی بیشتری در انتقال دارو نسبت به سایر نانوذرات برخوردارند (۱۹ و ۱۸). مورفولوژی نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA حاصل از میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA دارای شکل کروی و سطح صاف هستند. اندازه و پتانسیل ذرات از دیگر فاکتورهای مهم در دارو و ژن رسانی است به گونه‌ای که در برخی از سلول‌ها تنها ذرات زیر میکرومتر قادر به انتقال هستند. (۲۱ و ۲۰). کاهش اندازه ذرات علاوه بر افزایش بازده انتقال ژن، امکان شناسایی آن‌ها را توسط سیستم رتیکولاندوتلیال کاهش داده، و بدین ترتیب سبب افزایش طول عمر ذرات، در سیستم گردش خون می‌شود (۲۲). تعیین بار سطحی ذرات جهت پیش‌بینی پایداری آن‌ها در سیستم گردش خون، خودتجمعی و بازده انتقال ژن ضروری به نظر می‌رسد. افزایش بار کاتیونی ذرات علاوه بر ایجاد دافعه بین ذرات هم‌بار و جلوگیری از خودتجمعی آن‌ها، با برهمکنش الکترواستاتیک ذرات با غشای سلولی سبب افزایش بازده انتقال ژن می‌گردد (۲۳). با افزایش میزان PLL در نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA بر اندازه و پتانسیل ذرات افزوده می‌شود به نحوی بیشترین اندازه و پتانسیل ذرات در نانوذرات با ۷۵ میکروگرم PLL در میلی‌گرم PLA-PEG/PLL/DNA مشاهده شد. تاثیر افزایش مقدار PLL بر پتانسیل ذرات نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA در مقایسه با افزایش اندازه ذرات، بیشتر بود به نحوی که با افزایش میزان PLL میزان بار سطحی ذرات از  $10/6 \text{ mV}$  در نانوذرات بدون PLL به  $6/12 \text{ mV}$  در نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA حاوی

بسیاری از بیماری‌ها گشوده است. نانوکوتورهای کاتیونی از قبیل PLL از بازده بالایی جهت انتقال ژن به سلول‌های یوکاریوتی برخوردارند با این وجود یکی از موانع استفاده بالینی از این نانوناقل‌ها در انتقال نوکلئیک اسید، سمیت نسبتاً بالای این ناقل‌ها می‌باشد (۱۶). لذا تحقیق بر روی پلیمرهای با زیست تخریب پذیر و زیست سازگار مناسب، می‌تواند نتایج امیدوار کننده‌ای را جهت استفاده بالینی نانوناقل‌ها در ژن درمانی در پی داشته باشد. پلیمرهای چند قطعه‌ای حاوی قطعات آبدوست و آبگریز 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 (۶). توانایی کوپلیمرهای قطعه در کنترل رهش 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 (۹). با وجود مزایای متعدد کوپلیمرهای زیست تخریب پذیر از قبیل PLA-PEG، بازده پایین این نانوکوتورها در انتقال ژن، استفاده از این کوپلیمرها را در ژن‌درمانی با محدودیت روبه‌رو ساخته است.

با توجه به مزایای ذکر شده پلیمرهای PLA-PEG از قبیل زیست‌سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و همچنین توانایی در کنترل رهش تدریجی دارو، همچنین با توجه به بازده بالایی انتقال ژن توسط PLL و نظر به اینکه تاکنونی تحقیقی به منظور بررسی تاثیر استفاده هم‌زمان از پلیمر PLL و کوپلیمر PLA-PEG بر بازده انتقال ژن و همچنین زیست‌سازگاری، سرعت رهش، بازده انکپسولاسیون و غیره انجام نگردیده است لذا این تحقیق با هدف بررسی استفاده هم‌زمان از پلیمر PLL و کوپلیمر PLA-PEG جهت انتقال ژن به سلول‌های MCF-7 انجام گرفت چون با به‌دست آوردن رابطه بین نسبت پلیمر PLL و کوپلیمر PLA-PEG در نانوذرات PLA-PEG/PLL بر خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و

نتایج حاصل از تحقیقات مشابه به نظر می‌رسد فشرده سازی و کاهش سطح تماس DNA توسط کوپلیمر PLA-PEG و پلیمر PLL مانع از اتصال آنزیم‌های محدود کننده و همچنین برخورد مستقیم امواج فراصوت با DNA می‌شود.

تعامل‌های الکترواستاتیکی پلیمرهای کاتیونی و سطح آنیونی سلولی، از اهمیت بسیار بالایی برای جذب کمپلکس‌های DNA-نانوحامل به درون سلول‌ها برخوردار است. اما این برهمکنش‌های غشایی به نظر می‌رسد که از لحاظ سمیت نیز مهم باشد چرا که باعث آسیب مستقیم به سلول‌های هدف می‌شوند (۲۲). پوشاندن گروه‌های سطحی به طور موفقیت آمیزی برای کاهش سمیت نانوناقل‌ها کاتیونی استفاده شده است. برای مثال اتصال کوالانسی یک گروه اسید اوریک یا پلی‌اتیلن‌گلیکول به سطح نانوناقل‌ها می‌تواند سمیت آن‌ها را کاهش دهد (۲۸) با این وجود اتصال کوالانت PEG در برهم‌کنش مناسب DNA با پلیمر اختلال ایجاد می‌کند و مانع از فشرده سازی مناسب DNA می‌شود (۳۰ و ۲۹).

Alshamsan و همکاران (۱۷) در تحقیق مشابه گزارش کردند پوشش PEI توسط PLGA سبب کاهش معنی‌دار سمیت PEI-PLGA در مقایسه با PEI می‌شود آنها یکی از دلایل این کاهش سمیت را رهش کم PEI در سلول‌ها در هنگام بررسی سمیت PEI و PEI-PLGA دانستند با توجه به اینکه در این تحقیق ۷۵/۸۲ درصد از DNA انکپسوله شده در نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA حاوی ۷۵ میکروگرم PLL بر میلی‌گرم PLA-PEG، در ۲۴ ساعت اول پس از تیمار با بافر فسفات رهاسازی شد. لذا به نظر نمی‌رسد رهش دیر هنگام باعث کاهش سمیت PLL باشد. تحقیقات گذشته در زمینه بررسی علت سمیت پلیمرهای کاتیونی بر سلول‌های پستانداران، نشان داد ایجاد حفره و نازک شدن غشای سلولی در اثر برهم‌کنش غشای سلولی با پلی‌کاتیون‌ها علت اصلی سمیت این پلیمرها می‌باشد (۳ و ۴). لذا به نظر می‌رسد

۷۵ میکروگرم PLL بر میلی‌گرم PLA-PEG، افزایش یافت.

وجود گروه کربوکسیل در قطعات PLA، و همچنین گروه فسفات موجود در فسفات DNA می‌تواند از دلایل پتانسیل منفی در نانوذرات PLA-PEG/DNA باشد. افزایش میزان PLL با خنثی سازی بار منفی DNA و PLA سبب افزایش پتانسیل ذاتی نانوذرات می‌شود.

انکپسوله سازی ماکرومولکول‌های آبدوست از قبیل DNA به دلیل بار منفی و آبدوستی زیاد درون هسته آگریز از قبیل PLA مشکل می‌باشد با این حال تکنیک‌های متفاوتی جهت افزایش بازگذاری DNA گزارش شده است (۹). باتوجه به وجود بار منفی در گروه فسفات DNA و همچنین گروه کربوکسیل در PLA، شاید بتوان یکی از دلایل افزایش بازده انکپسوله سازی DNA در حضور PLL را خنثی سازی بار منفی DNA در اثر برهم‌کنش با PLL و در نتیجه کاهش دافعه بین DNA و قطعه PLA دانست.

یکی از مشکلات انتقال ژن به سلول‌های پستانداران چه در شرایط زنده و چه در شرایط آزمایشگاهی تخریب DNA توسط آنزیم‌های محدود کننده می‌باشد. به طوری که گزارش شده است در انتقال ژن از مسیر وابسته به آندوسیتوز بیش از ۹۹ درصد DNA وارد شده به سلول توسط مکانیزم دفاعی سلول از بین می‌رود (۲۴ و ۲۵).

نتایج تحقیقات گذشته نشان داده است پلی‌کاتیون‌ها در اثر کمپلکس با DNA ممانعت فیزیکی جهت اتصال آنزیم‌های محدود کننده ایجاد کرده و بدین ترتیب DNA را از هضم توسط این آنزیم‌ها محافظت می‌نمایند (۲۶ و ۲۷). همچنین Abebe و همکاران (۹) گزارش کردند که پوشش PEI/DNA توسط کوپلیمر PLLA-PEG مانع از رهاسازی زودهنگام DNA از PEI، در برابر پلی آنیون‌ها موجود در محیط می‌گردند آن‌ها پیشنهاد کردند لایه نفوذ ناپذیر PLA از نفوذ پلی آنیون‌ها به کمپلکس PEI/DNA ممانعت می‌کند. لذا با توجه به

سبب بزرگتر شدن ذرات شده و عبور این وکتورها را از غشا و یا ارائه ژن به هسته را با محدودیت روبرو می‌کند. همچنین برهمکنش این وکتورها با پروتئین‌های پلازما سبب شناسایی سریع آن‌ها توسط سیستم ایمنی بدن شده و موجب حذف سریع آن‌ها و در نتیجه کاهش بازده انتقال ژن در شرایط زنده می‌گردد (۹ و ۶). نتایج این تحقیق نشان داد نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA در محیط حاوی سرم از توانایی بالایی جهت انتقال ژن به سلول‌های MCF-7 برخوردارند. وجود PEG به عنوان پوسته خارجی در این نانوذرات مانع از تعاملات غیر اختصاصی با سرم شده و تجمع ذرات را به حداقل می‌رساند (۳۳).

### نتیجه گیری

هدف از انجام تحقیق حاضر پیشنهاد یک سیستم میسلی چند کاره جهت انتقال ژن بود که مزایایی پلیمرهای کاتیونی، زیست تخریب پذیر و دوگانه دوست را به طور توأم داشته باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد استفاده هم‌زمان از پلیمرهای PLL و PLA-PEG علاوه بر کاهش سمیت PLL و بهبود رهایش DNA از کوپلیمر PLA-PEG، از DNA در برابر آسیب‌های ناشی از هضم آنزیمی محافظت می‌نماید. علاوه بر این نتایج این تحقیق نشان داد نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA از توانایی بالایی در انتقال ژن به سلول‌های MCF-7 در مقایسه با کمپلکس PLL/DNA در محیط‌های حاوی سرم برخوردار می‌باشند.

### تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه پایان نامه کارشناسی ارشد می باشد. نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل به‌خاطر فراهم کردن امکانات انجام این تحقیق و نیز از تمام کسانی که در انجام این پروژه همکاری و حمایت نمودند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

### منابع

یکی از دلایل کاهش سمیت نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA در مقایسه با PLL و DNA، کاهش سطح تماس PLL با غشای سلولی باشد. توانایی کوپلیمرهای حاوی قطعات PLA و PEG در کنترل رهش دارو در تحقیقات متعددی به اثبات رسیده است (۳۱ و ۹). این ویژگی می‌تواند در درمان برخی از بیماری‌ها از قبیل بیماری لکه زدی شبکه که نیاز به سطح پایداری از کورتیکواستروئیدها در ناحیه مورد درمان می‌باشد، مطلوب باشد (۳۲). نتایج این تحقیق نشان داد رهایش DNA از نانوذرات PLA-PEG/DNA و PLA-PEG/PLL/DNA، ابتدا به صورت انفجاری و سپس به‌صورت آهسته رخ داد. به‌طوری که بیش از ۵۰ درصد از DNA رهاسازی شده در مدت زمان ۲۸ روز، در ۲۴ ساعت اول رهاسازی شد.

تاثیر استفاده هم‌زمان از پلیمرهای آبدوست به‌همراه پلیمرهای قطعه‌ای متشکل از قطعات آبدوست و آبگریز بر افزایش سرعت رهایش DNA به اثبات رسیده است. ایجاد کانال‌های آبی درون ماتریکس توسط پلیمرهای آبدوست، یکی از عوامل افزایش سرعت رهایش DNA گزارش شده است (۱۶ و ۱۷). نتایج این تحقیق نشان داد با افزایش نسبت PLL در نانوذرات PLA-PEG/PLL/DNA درصد رهایش انفجاری افزایش و از درصد رهش آهسته کاسته شد. با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می‌رسد بتوان با تغییر نسبت پلیمر PLL بر کوپلیمر PLA-PEG سرعت و الگوی رهایش DNA را بسته به هدف مورد نظر کنترل نمود.

انتقال DNA فاقد پوشش به درون سلول، به‌دلایلی از جمله اندازه و پتانسیل سطحی نامناسب، هضم زود هنگام DNA توسط مکانیزم دفاعی سلول طی انتقال درون سلولی و تحت سلولی و غیره مشکل می‌باشد (۲۵ و ۲۴).

نانوحامل‌های کاتیونی از قبیل PLL و لیپوزوم‌های کاتیونی تمایل به جذب آنیونی پروتئین‌های موجود در سرم دارند که این عمل علاوه بر رهایش زود هنگام DNA،

- heparin and serum. *Journal of Controlled Release*. 2001; 76(1):169-181.
11. Rackstraw BJ, Martin AL, Stolnik S, Roberts CJ., et al. Microscopic Investigations into PEG- Cationic Polymer-Induced DNA Condensation. *Langmuir*. 2001; 17(11): 3185-3193.
  12. Petersen H, Fechner PM, Martin AL, Kunath K, et al. Polyethylenimine-graft-poly (ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system. *Bioconjugate chemistry*. 2002; 13(4): 845-854.
  13. Ruponen M, Rönkkö S, Honkakoski P, Pelkonen J, et al. Extracellular glycosaminoglycans modify cellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(36): 33875-33880.
  14. Perez C, Sanchez A, Putnam D, Ting D, et al. Poly (lactic acid)-poly (ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *Journal of controlled Release*. 2001; 75(1): 211-224.
  15. Riley T, Govender T, Stolnik S, Xiong CD, et al. Colloidal stability and drug incorporation aspects of micellar-like PLA-PEG nanoparticles. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 1999; 16(1): 147-159.
  16. Patil Y, Panyam J. Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing. *International journal of pharmaceutics*. 2009; 367(1): 195-203.
  17. Alshamsan A, Haddadi A, Hamdy S, Samuel J, et al. STAT3 silencing in dendritic cells by siRNA polyplexes encapsulated in PLGA nanoparticles for the modulation of anticancer immune response. *Molecular pharmaceutics*. 2010; 7(5): 1643-1654.
  18. Fan LT, Singh S. K. Diffusion-controlled release. In *Controlled Release* (pp. 9-88). 1989; Springer Berlin Heidelberg.
  19. Venkataraman S, Hedrick JL, Ong ZY, Yang C, et al. The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2011; 63(14): 1228-1246.
  20. Bala I, Hariharan S, Kumar MR. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2004; 21(5): 25-31.
  21. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to
  1. Wirth T, Ylä-Herttuala, S. Gene therapy used in cancer treatment. *Biomedicines*. 2014; 2(2): 149-162.
  2. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003; 302(5644): 415-421.
  3. Hong S, Leroueil PR, Janus EK, Peters JL, et al. Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. *Bioconjugate chemistry*. 2006; 17(3): 728-734.
  4. Hong S, Bielinska AU, Mecke A, Keszler B, et al. Interaction of poly (amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: hole formation and the relation to transport. *Bioconjugate chemistry*. 2004; 15(4): 774-782.
  5. Agarwal S, Zhang Y, Maji S, Greiner A. PDMAEMA based gene delivery materials. *Materials Today*. 2012; 15(9): 388-393.
  6. Zou W, Liu C, Chen Z, Zhang N. Preparation and characterization of cationic PLA-PEG nanoparticles for delivery of plasmid DNA. *Nanoscale research letters*. 2009; 4(9): 982.
  7. Xia J, Chen J, Lin L, Guo Z, et al. Sulfathiazole grafted PEG-PLL as pH-sensitive shielding system for cationic gene delivery. *Polymer Bulletin*. 2016; 73(12): 3503-3511.
  8. Merkel OM, Urbanics R, Bedöcs P, Rozsnyay Z, et al. In vitro and in vivo complement activation and related anaphylactic effects associated with polyethylenimine and polyethylenimine-graft-poly (ethylene glycol) block copolymers. *Biomaterials*. 2011; 32(21): 4936-4942.
  9. Abebe DG, Kandil, R, Kraus T, Elsayed M, et al. 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. *Macromolecular bioscience*. 2015; 15(5): 698-711.
  10. Moret I, Peris JE, Guillem VM, Benet M, et al. Stability of PEI-DNA and DOTAP-DNA complexes: effect of alkaline pH,

- cells and tissue. *Advanced drug delivery reviews*. 2003; 55(3): 329-347.
22. Chen J, Tian B, Yin X, Zhang Y, et al. Preparation, characterization and transfection efficiency of cationic PEGylated PLA nanoparticles as gene delivery systems. *Journal of Biotechnology*. 2007; 130(2): 107-113.
23. Shim G, Kim MG, Park JY, Oh Y. K. Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2013; 8(2): 72-80.
24. Kichler A, Leborgne C, Coeytaux E, Danos O. Polyethyleniminemediated gene delivery: a mechanistic study. *The journal of gene medicine*. 2001; 3(2): 135-144.
25. Ogris M, Wagner E. Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. *Drug Discovery Today*. 2002; 7(8): 479-485.
26. Navarro G, de ILarduya CT. Activated and non-activated PAMAM dendrimers for gene delivery in vitro and in vivo. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2009; 5(3): 287-297.
27. Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker JR. The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine dendrimers: mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and transcriptional activity of the complexed DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*. 1997; 1353(2): 180-190.
28. Wen Y, Pan S, Luo X, Zhang W, et al. PEG-and PDMAEG-graft-modified branched PEI as novel gene vector: synthesis, characterization and gene transfection. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2010; 21(8-9): 1103-1126.
29. Kamiya H, Akita H, Harashima H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in gene therapy. *Drug discovery today*. 2003; 8(21): 990-996.
30. Salcher EE, Wagner E. Chemically programmed polymers for targeted DNA and siRNA transfection. In *Nucleic Acid Transfection* (pp. 227-249). 2010; Springer Berlin Heidelberg.
31. Anaraki NA, Rad LR, Irani M, Haririan I. Fabrication of PLA/PEG/MWCNT electrospun nanofibrous scaffolds for anticancer drug delivery. *Journal of Applied Polymer Science*. . 2015; 132, 41286.
32. Jonas JB, Kreissig I, Degenring R. Repeated intravitreal injections of triamcinolone acetonide as treatment of progressive exudative age-related macular degeneration. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2002; 240(10): 872-873.
33. Olbrich C, Bakowsky U, Lehr CM, Müller RH, et al. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. *Journal of controlled release*. 2001; 77(3): 345-355.

## Study the effect of PLL polymer on gene delivery efficiency by biodegradable PLA-PEG di-block copolymers

mosavi sooha SA, M.Sc, yaghoubi H, Ph.D\*

- Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

\* Email corresponding author: [yaghoubi\\_h@iauardabil.ac.ir](mailto:yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir)

Received: 15 Aug. 2017

Accepted: 14 Nov. 2017

### Abstract

**Aim:** The present study aims to investigate the effect of simultaneous encapsulation of DNA with different ratio of PLL via PLA-PEG copolymer, on gene delivery efficiency into mammalian cells. Some characteristics such as biocompatibility, DNA protecting against restriction enzymes, DNA release rate, size and zeta potential were also investigated .

**Material and Methods:** PLA-PEG/PLL/DNA nanoparticles with different ratio of PLL were prepared by double emulsion-solvent evaporation technique. Then, the release percentage of DNA and the zeta potential of particles in Phosphate Saline buffer (PH=7) were measured.

**Results:** Increasing the PLL percentage in the PLA-PEG/PLL/DNA nanoparticles resulted in enhancement of particles size and zeta potential. Gel electrophoresis analysis of DNA extracted from PLA-PEG/DNA and PLA-PEG/PLL/DNA nanoparticles after treatment with DNase I enzyme indicates the ability of PLA-PEG and PLA-PEG/PLL copolymers in DNA protection. The flow cytometry and fluorescent microscopy study confirmed that gene transfer efficiency was improved by increasing the ratio of PLL in PLA-PEG/PLL/DNA nanoparticles. Moreover we found that gene transfer efficiency was one and half fold higher than PLL/DNA complex in the serum medium.

**Conclusion:** The results showed that PLA-PEG nanoparticles in the serum medium have higher potential gene delivery to the MCF-7 cells in comparison with PLA-PEG/PLL/DNA nanoparticles.

**Keywords:** PLA-PEG, PLL, biocompatibility, DNA release, gene delivery