Archive of SID

تهیه و ارزیابی نانوحامل های پلیمری حاصل از اتصال پلی اتیلن ایمین به پلی ال لیزین با استفاده از لینکر ۱۰ کربنه به منظور انتقال ژن به سلول یوکاریوتی

سعیده عسکریان[۱]، رضا کاظمی اسکویی[۱]، خلیل آبنوس[۲]، محمد رمضانی[۲*]

۱- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۲- گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: فقدان یک حامل ژن رسان کارآمد همواره بزرگترین چالش در ژن درمانی بوده است. دو پلیمر پلی اتیلن ایمین (PEI) و پلی ال لیزین (PLL) بیشترین حامل های غیر ویروسی هستند که مورد مطالعه قرار گرفته اند. این مطالعه با هدف تهیه و ارزیابی نانوحامل های پلیمری حاصل از اتصال پلی اتیلن ایمین به پلی ال لیزین با استفاده از لینکر ۱۰ کربنه به منظور انتقال ژن به سلول یوکاریوتی انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی، دو مدل نانوحامل سنتز شدند، مولکول PLL با وزن مولکولی بالا (۳۰-۷۰ کیلو دالتون) به عنوان مرکز ذره در نظر گرفته شد و سپس به میزان ۱۰ و ۵۰ درصد آمین های نوع اول PLL با لینکر ۱۰ کربنه جایگزین شدند. سپس PEI با وزن مولکولی متوسط (۲۵ کیلو دالتون) با واسطه لینکرها به PLL متصل گردید. خصوصیات فیزیکو شیمیایی حامل های سنتز شده، سمیت سلولی و قابلیت انتقال ژن در سلول های نوروبلاستوما موشی (Neuro2A) مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: حامل های سنتز شده همگی قادر به تشکیل پلی پلکس در ابعاد نانو (۹۶-۱۲۲ نانومتر) بودند و حامل PLL-L10%-PEI قادر به افزایش ترانسفکشن نسبت به پلیمر های پایه اش (PEI و PLL) بود، در حالیکه که سمیت سلولی کمتری نیز نسبت به PEI دست ورزی نشده نشان داد ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نانو ذره (PLL-L10%-PEI) به عنوان بهترین نانوذره حاصله در این مطالعه با بار ذره ای ۸/۵+ میلی ولت و اندازه ذره ای ۱۱۶ نانومتر می باشد. این نانوحامل در عین حال که سبب افزایش کارآیی ترانسفکشن می شود، سمیت سلولی را نیز کاهش می دهد. از این رو این نانوحامل برای مقاصد ژن رسانی به سلول های مختلف پیشنهاد می شود.

کلید واژه‌ها: ژن رسانی، نانوذرات، نانوحامل غیر ویروسی، پلی الی لیزین، پلی اتیلن ایمین.

*آدرس نویسنده مسئول: گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
آدرس پست الکترونیک: Ramezanim @mums.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تاکنون مطالعات کارآزمایی بالینی بسیاری درباره سرطان، بیماری های تک ژنی و بیماری های قلب و عروقی انجام شده است، اما دو چالش مهم در ژن درمانی، فقدان حاملین ژن رسان کارآمد و روش انتخاب درون تنی مناسب می باشد (۱). راهبردها و حاملین انتقال ژن مختلفی در مطالعات ژن درمانی در حال استفاده است که به دو دسته سیستم های ویروسی و غیر ویروسی دسته بندی می شوند. حاملین ویروسی در کارآزمایی های بالینی، منجمله نقص ایمنی شدید (SCID) (۲)، لکودیستروفی وابسته به X (X-ALD) (۳) و بیماری لبر (۴) در حال استفاده می باشند. گرچه حاملین ویروسی کارایی بالا و سریعی در ژن رسانی نشان داده اند اما استفاده از آنها در سال های اخیر به دلیل بروز اشکالاتی کاهش یافته است. این مشکلات شامل ظرفیت پایین آنها (قابلیت انتقال ژن های بزرگ برای کاربردهای بالینی ضروری است)، احتمال فعال کردن پرتو آنکوژن ها به دلیل ورود تصادفی شان به ژنوم، القا پاسخ های ایمنی قوی (که تزریق های مکرر را محدود می کند) و مشکلات در تولید انبوه آنها می باشد (۵). نگرانی های ایمنی زایی در مورد حاملین ویروسی، سبب مطرح شدن حامل های غیر ویروسی شده است. گرچه کارایی انتقال ژن (ترانسفکشن) حاملین غیر ویروسی در مقایسه با حاملین ویروسی پایین تر است، اما مزایایی منجمله قابلیت انتقال قطعات بزرگ ژنی، خطر عفونت زایی پایین، هزینه تولید اندک، ایمنی زایی کم و قابل قبول را دارا می باشند (۶). به دلیل انعطاف پذیری ساختار و سهولت طراحی حامل های غیر ویروسی، تلاش های زیادی برای بهبود کارایی ترانسفکشن به منظور غلبه بر نقاط ضعف آنها، صورت گرفته است. انواع مختلفی از نانوذرات پلیمری برای تحویل ژنی مورد بررسی قرار گرفته اند، که می‌توان به پلی اتیلن ایمین (PEI) (۷)، پلی آمیدوآمین شاخه دار (PAMAM) (۸)، پلی بتا آمینو استر، پلی پروپیل ایمین (PPI) (۹) و پلی ال لیزین (PLL) (۱۰) اشاره نمود. از میان پلیمرهای کاتیونی پلی اتیلن ایمین و پلی ال لیزین از محبوبیت بیشتری برخوردار هستند زیرا این دو پلیمر بار مثبت قابل توجهی دارند (البته این امر تاحد زیادی بستگی به وزن مولکولی آنها دارد) و به طور ذاتی تمایل دارند به اولیگونوکلئوتید ها و سطح سلولی متصل شوند، به علاوه هر دو پلیمر قادر هستندکه با اتصال به DNA آن را به خوبی متراکم کنند و از تجزیه آنزیمی محافظت نمایند (۱۱). با وجود اینکه PEI ظرفیت بافری خوبی نشان می‌دهد و می‌تواند به آسانی سبب تخریب لیزوزومی و آزاد سازی محموله اش در سیتوپلاسم سلولی شود، اما PLL ظرفیت بافری ضعیفی نشان می‌دهد و قادر نیست پدیده "اسفنج پروتونی را فعال نماید. در مقابل PLL زیست تجزیه‌پذیر است، اما PEI با توجه به وزن مولکولی اش و غلظت مورد استفاده، مراتبی از سمیت سلولی را نشان می‌دهد (۱۲).

هر دو پلیمر PEI و PLL دارای مشکلاتی هستند که استفاده از آنها را به عنوان حاملین ژنی محدود می نماید، هدف این مطالعه طراحی و تهیه یک نانوحامل جدید با استفاده از لینکر ۱۰ کربنه (۱۰- برمو دکانوئیک اسید)، به منظور استفاده از نقاط قوت و جبران نقاط ضعف این دو پلیمر می باشد. در ادامه ویژگی های بیوفیزیکی، قابلیت انتقال ژن (ترانسفکشن) و سمیت سلولی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی می باشد. مواد مورد استفاده در این مطالعه شامل، پلی اتیلن ایمین شاخه دار (وزن مولکولی ۲۵ کیلو دالتون)، پلی ال لیزین (وزن مولکولی ۳۰-۷۰ کیلو دالتون، شرکت پلی ساینس، آمریکا)، لینکر ۱۰ کربنه (۱۰-برومو دکانوئیک اسید، ۹۵٪)، ماده ۱-اتیل-۳- (۳-دی متیل آمینوپروپیل)کربودی ایمید هیدروکلراید (EDC)، دی متیل سولفوکسید (DMSO)، معرف ۳-(۴و۵-دی متیل تترازولیل)-۲و۵-دی فنیل تترازولیوم یا MTT (شرکت سیگما آلدریچ، آمریکا)، محیط کشت DMEM، سرم گاوی، پنی سیلین، استرپتوماسین، گلوتامین، تریپسین (شرکت گیبکو، آلمان)، پلاسمید pEGFPN1 (شرکت پرومگا، آمریکا) و رده سلول Neuro2A (نوروبلاستوما موشی) از انستیتو پاستور ایران می باشد.

سنتز نانوحامل ها

ابتدا پلی ال لیزین (PLL) با وزن مولکولی بالا (۳۰-۷۰ کیلو دالتون) در دی متیل سولفوکسید (DMSO) حل گردید. برای پوشش دادن ۱۰٪ و ۵۰٪ آمین های نوع اول PLL، مقادیر محاسبه شده از لینکر ۱۰ کربنه (۱۰-برومو دکانوئیک اسید) در DMSO حل شد و به صورت قطره قطره در مدت ۲ ساعت به محلول PLL در حین همزدن (بر روی همزن مغناطیسی) اضافه گردید. واکنش به مدت ۲۴ ساعت، در دمای محیط ادامه داده

www.SID.ir

Archive of SID

شد و سپس برای حذف مواد واکنش داده نشده، محلول حاصله با استفاده از کیسه دیالیز (شرکت اسپکترا/پورمیمبرین)، با حد آستانه ۸۰۰۰ به مدت ۳ روز در محیط آبی دیالیز گردید. مقادیر مورد نیاز از پلی اتیلن ایمین شاخه دار (وزن مولکولی ۲۵ کیلو دالتون) در آب دوبار تقطیر حل شد و سه برابر مقدار (در این مطالعه ۱۴ میلی گرم) از EDC که قبلا در ۱ میلی لیتر آب حل شده بود به صورت قطره قطره در مدت نیم ساعت به محلول PEI اضافه گردید. محلول PLL متصل به لینکر به صورت قطره قطره به محلول PEI حاوی EDC در مدت ۲ ساعت در حال همزدن (بر روی استیرر) اضافه گردید، واکنش به مدت ۲۴ ساعت، در دمای محیط ادامه داده شد و سپس برای حذف مواد واکنش داده نشده، محلول حاصله با استفاده از کیسه دیالیز (شرکت اسپکترا/پورمیمبرین)، با حد آستانه ۲۵۰۰۰ به مدت ۳ روز در محیط آبی دیالیز گردید. پس از دیالیز، محلول باقی مانده (PEI-L-PLL) به منظور تولید یک پودر خشک با استفاده از دستگاه فریز درایر، لیوفیلیز شد و سپس با غلظت ۱ میلی گرم/ میلی لیتر در آب برای انجام آزمایشات تهیه شد. به منظور تایید سنتز، از طیف سنجی تشدید مغناطیس هسته ای (H NMR) نیز استفاده شد. نمونه های PEI و PLL و نانوحامل های سنتز شده در آب حل شدند و با استفاده از اسپکترومتر (شرکت بروکر، آلمان) در دمای ۲۰ درجه و ۳۰۰ مگاهرتز مورد بررسی قرار گرفتند تغییرات شیمیایی به صورت، قسمت در میلیون (ppm) نمایش داده شده است.

تهیه کمپلکس های حامل/پلاسمید (پلی پلکس)

مقادیر مورد نیاز از نانوحامل های سنتز شده بر حسب نسبت حامل به پلاسمید (C/P) برای مقادیر۲، ۴ و۶ را در محیط کشت سلولی بدون سرم (pH۷/۴) حل نموده و با مقادیر مورد نیاز از پلاسمید حل شده در محیط کشت بدون سرم مخلوط گردید و برای تشکیل پلی پلکس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد.

تعیین اندازه ذره ای و پتانسیل زتا پلی پلکس ها

اندازه ذرات و بار سطحی برای پلی پلکس ها، با استفاده از تکنیک پراکندگی نور دینامیکی (Dynamic Light Scattering) و دستگاههای لیزر داپلر سرعت سنج (Laser Doppler Velocimeter) و دستگاه زتا سایزر (Z-sizer) (ساخت شرکت مالورن، انگلستان) اندازه گیری شد. مقدار مورد نظر از پلیمرهای سنتز شده در ۱۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر فیلتر شده در pH فیزیولوژیکی (۷/۴pH) رقیق شد و با ۱۵۰ میکرولیتر محلول pDNA (غلظت ۱ میلی گرم/ میلی لیتر پلاسمید) مخلوط گردید و برای تشکیل پلی پلکس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قراد داده شد. سپس ۷۰۰ میکرولیتر آب اضافه شد و اندازه و پتانسیل زتا ذرات اندازه گیری شد. مقادیر گزارش شده پس از سه بار اندازه گیری، بصورت میانگین و انحراف معیار نشان داده شده است.

استخراج پلاسمید

پلاسمید pEGFPN1 (کد کننده پروتئین GFP، تحت پروموتر سایتومگالوویروسی) درون باکتری اشرشیاکلی DH5α منتقل گردید و با استفاده از کیت استخراج پلاسمید عاری از آندوتوکسین (شرکت کیاژن، آلمان) طبق دستور شرکت سازنده استخراج گردید. غلظت و درجه خلوص پلاسمیدهای حاصله در طول موج A260 و نسبت A260/280 با استفاده از اسپکتوفتومتر (شرکت فارما اسپکت، ژاپن) بررسی گردید. پلاسمید های با خلوص بالا و در بیشترین حالت سوپرکویل پس از تایید با الکتروفورز برای آزمایشات بعدی انتخاب شدند.

کشت سلولی

سلول های Neuro2A (نوروبلاستومای موشی) با مشخصات سلولی ATCC:CCL-131 در محیط کشت DMEM (حاوی ۱gr/l گلوکز، ۲ میلی مولار گلوتامین) با ۱۰٪ سرم گاوی (FBS)، محلول آنتی بیوتیکهای پنی سیلین ۱۰۰(واحد/میلی-لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰میکروگرم/میلی لیتر) و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. سلول ها به تعداد ۱۰۰۰۰سلول در هر چاهک در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و قبل از انجام تست های سمیت و ترانسفکشن به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور کشت سلولی قرار داده شدند.

بررسی سمیت سلولی

پلی پلکس هایی حاوی ۰.۴ میکرو گرم پلاسمید به ازای هر چاهک پلیت ۹۶ خانه در C/P های مختلف ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۶ (w/w) تهیه شد. پلی پلکس ها در محیط کشت بدون آنتی بیوتیک در حجم ۲۰ میکرولیتر تهیه و پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط به هر چاهک اضافه گردید. پس از ۴ ساعت محیط سلول ها خارج شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط گرم حاوی سرم و آنتی بیوتیک به هر چاهک اضافه گردید. پلیت به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور کشت سلول

www.SID.ir

قرار داده شد. به منظور بررسی فعالیت متابولیک MTT مقدار ۲۰ میکرولیتر از معرف MTT با غلظت ۵ میلی گرم/میلی لیتر به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه گردید. پس از آن محلول رویي را به طور کامل خارج نموده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد، پس از ۵ دقیقه جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده ازدستگاه پلیت ریدر (شرکت تکان، سویس) بررسی گردید. فعالیت متابولیسم نسبی به صورت درصد جذب سلول های تیمار شده با نانوحامل نسبت به سلول های کنترل با استفاده از فرمول زیر بیان شد. مقادیر گزارش شده پس از سه بار اندازه گیری، به عنوان میانگین و انحراف معیار ارائه گردیده است.

درصد بقا سلولی= جذب سلول های تیمارشده/ جذب سلول های کنترل ×۱۰۰

بررسی ترانسفکشن

آزمایش های ترانسفکشن (انتقال ماده ژنی) در شرایط مشابه با همان مقدار پلی پلکس های مورد استفاده برای آزمایش سمیت سلولی انجام گرفت. پلی پلکس هایی با نسبت C/P های مختلف ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۶ به سلول ها اضافه گردید. همانند آزمایش سمیت سلولی پس از مجاورت ۴ ساعته پلی پلکس ها با سلول محیط آنها با محیط کامل تعویض گردید. پس از ۲۴ ساعت محیط سلولها خارج شد و سلول ها با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر بافرلیز کننده (پرومگا، آلمان) تخریب شدند تا محتوی پروتئینی آنها آزاد شود. جذب فلورسنت در طول موج ۴۶۰نانومتر/ ۵۱۰ نانومتر با استفاده از دستگاه فلورسنت اسپکتوفتومتر (شرکت پرکین المر، آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت. از سلول های سبز رنگی که ترانسفکت شده بودند نیز با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (مدل جولی، شرکت نانوتک، آمریکا) عکس برداری شد.

آنالیز آماری

داده های ترانسفکشن، سمیت سلولی و سایز ذرات به صورت میانگین سه تکرار به همراه انحراف معیار بیان شده اند و مقایسه آماری به روش One-way ANOVA انجام شد. جهت مشخص نمودن اختلاف بین گروهها از آزمون Tukey Kramer استفاده شد. مقادیری از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد که حداقل، درجه اطمینان ۹۵٪ را داشته باشند. به عبارت دیگر، در این تحقیق، حداکثر میزان عدم اطمینان پذیرفته شده ۵٪ (P<۰/۰۵) می باشد.

نتایج و بحث

در این مطالعه، پلی الی لیزین (PLL) با وزن مولکولی بالا (۳۰-۷۰ کیلو دالتون) به عنوان هسته نانوحامل در نظر گرفته شد و در ادامه ۱۰ و ۵۰ درصد آمین های نوع اول آن با لینکر ۱۰ کربنه (۱۰-برمو دکانوئیک اسید) جایگزین گردید. سپس پلی اتیلن ایمین (PEI) با وزن مولکولی متوسط (۲۵ کیلو دالتون) از طریق برهمکنش با لینکر ها به PLL ملحق شد. طبق مطالعات گذشته اینطور به نظر می رسد که PLL در محیط DMSO ساختار α-مارپیچ مانندی به خود می گیرد (۱۳) و اتصال گروه های آمین به لینکر ۱۰ کربنه امکان اتصال گروه های دیگر را به آن بیشتر مهیا می سازد. بدین ترتیب دو نانوحامل حاصل گردید که بر حسب درصد اتصال لینکر به صورت PLL-L10%-PEI و PLL-L50%-PEI نام گذاری گردید.

یک حامل ژن رسان کارآمد، باید اندازه مناسب و تراکم بار کافی داشته باشد تا بتواند به خوبی با DNA بر همکنش داده و آنرا از مخاطرات خارج سلولی حفظ نماید (۱۴)، در مطالعات پیشین اندازه مناسب برای پلی پلکس ها برای اهداف ژن رسانی در حدود ۳۰-۵۰۰ نانومتر مطرح شده است (۱۵، ۱۶). در این مطالعه اندازه پلی پلکس ها با روش پراکندگی نور دینامیکی و لیزر داپلر سرعت سنج بررسی شد. پس از اتصال PEI به لینکر، بار مثبت ذره نسب به PLL افزایش یافت (P<۰/۰۰۱) که احتمالا به دلیل افزایش گروه های آمین ماحصل اتصال PEI می باشد. پلیمر های حاصل، بار ذره ای قابل قبولی از خود نشان دادند. همانطور که انتظار می رفت با اتصال دو پلیمر، ما شاهد افزایش اندازه نانو پلی پلکس های PLL-L10%-PEI و PLL-L50%-PE (P<۰/۰۵) نسبت به PLL و PEI پایه بودیم (جدول ۱). این طیف از اندازه، اجازه می دهد تا نانوذرات به داخل سلول ها از طریق مکانیسم آندوسیتوز وارد شوند (۱۷).

بررسی خصوصیات بیوفیزیکی نانوحامل ها با استفاده از NMR حضور هر دو پلیمر PEI و PLL را در نانوحامل سنتز شده را تایید می نمود گرچه به دلیل حضور گروه های عاملی بسیار و همپوشانی قله ppm ۲/۶ مربوط به پرتون موجود در هردو پلیمر، برآورد میزان اتصال PEI به PLL قابل ارزیابی نبود.

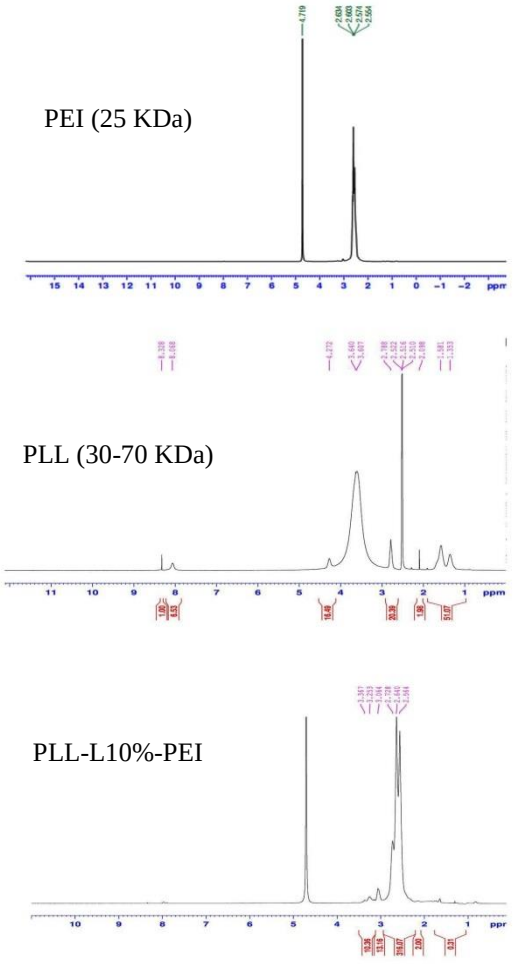
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار اندازه ذرات و بار سطحی نانو پلکس ها

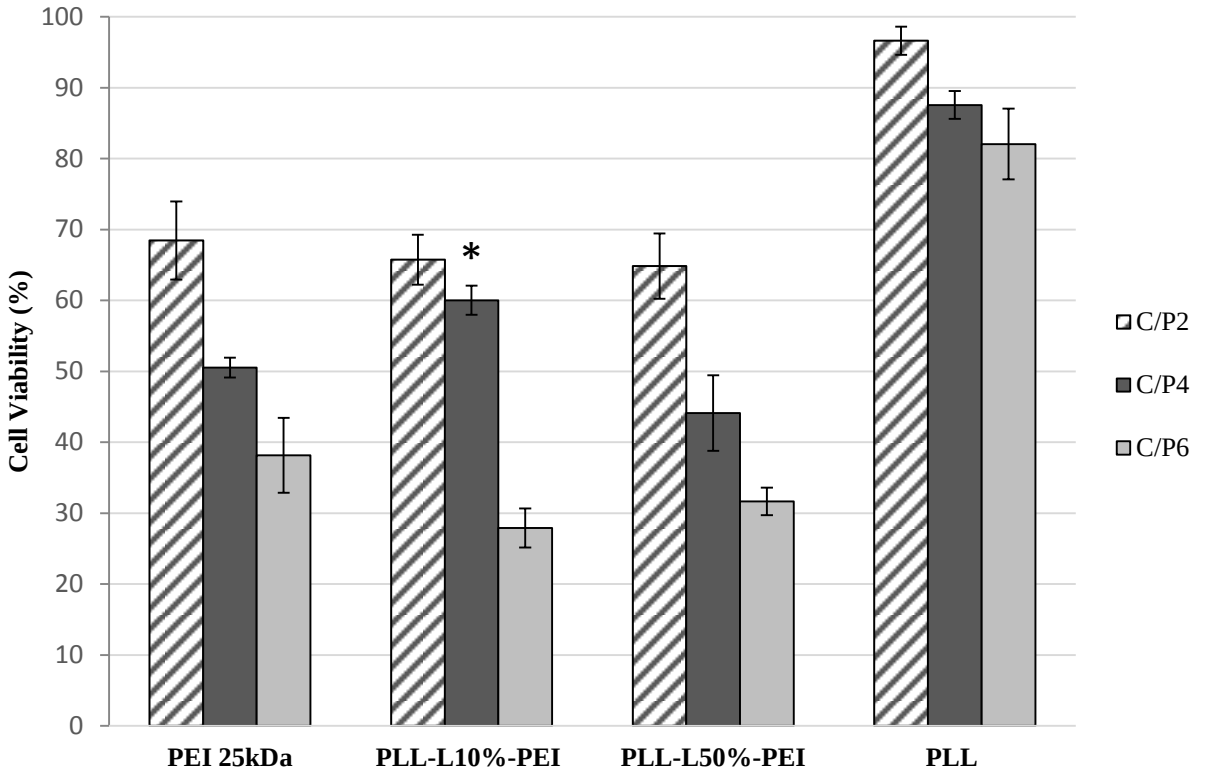
نانوحامل	اندازه پلی پلکس (nm)	پتانسیل زتا پلی پلکس (mV)
PEI (25 KDa)	۱۱۳ ± ۲/۶۱	+۲۲ ± ۱/۲۱
PLL (30-70 KDa)	۹۶/۳ ± ۱/۷	+۵/۳ ± ۱/۸
PLL-L10%-PEI	۱۱۶/۵ ± ۳/۸	+۸/۵± ۱
PLL-L50%-PEI	۱۲۲/۵ ± ۲/۳	+۱۲/۵ ± ۱/۵

هرچند PEI و PLL بیشترین پلیمرهایی هستند که به عنوان حاملین غیر ویروسی استفاده شده اند، اما نواقصی دارند که کاربرد آنها را محدود نموده، PLL ترانسفکشن و پایداری پایینی دارد در حالیکه PEI با وجودی که به خوبی پدیده اسفنج پروتونی را فعال میکند اما زیست سازگار نیست و سمیت سلولی نسبتا بالایی را نشان می دهد (۱۸). بر خلاف PEI، پلیمر PLL زیست سازگار می باشد و برای کاربردهای درون تنی (in vivo) مناسب است و برای جبران نقص آن، مطالعات بسیاری برای افزایش کارایی ترانسفکشن PLL صورت گرفته که می توان به سنتز حامل هایی بر پایه قند پلولان Pullulan-g-PLL (۱۹) و استفاده از پلی اتیلن گلیکول و فولات PEG-PLL-FOL (۲۰) اشاره نمود. وزن های مولکولی مختلفی از PEI از حدود ۶۰۰ دالتون تا ۱۵۰۰ کیلو دالتون وجود دارد (۲۱) و به نظر می رسد سمیت سلولی به وزن مولکولی PEI و نوع سلول هدف بستگی دارد (۲۲). سمیت نانوحامل های سنتز شده با روش MTT و در نسبت های مختلف ۱:۲،۱:۴ و ۱:۶ از حامل به پلاسمید (C/P) در رده سلول نوروبلاستومای موشی (Neuro2a) مورد ارزیابی قرار گرفت. تقریبا در تمامی پلی پلکس ها با افزایش نسبت پلیمر، کاهش قابلیت بقا سلولی مشاهده می شود. با این حال نانو پلکس PLL-L10%-PEI در C/P4 سمیت سلولی کمتری ($P<۰/۰۵$) نسبت به PEI دست ورزی نشده در همین غلظت نشان میدهد، در حالیکه با افزایش درصد پوشش دهی آمین های PLL به ۵۰ درصد (با PEI) سمیت سلولی مقدار کمی افزایش را نشان می‌دهد (گرچه معنی دار نمی باشد). همانطور که انتظار می رفت PLL تقریبا هیچ سمیت سلولی در تمامی C/P ها نشان نمی دهد. سمیت سلولی بالای PEI مرتبط با بار بالای این پلیمر می باشد که سبب برهمکنش های قوی با غشای سلولی و آسیب به سلول می شود (۲۳).



نمودار ۱. نمودار H NMR برای پلیمر های پایه (PEI و PLL) و نانو حامل سنتز شده PLL-L10% -PEI

www.SID.ir



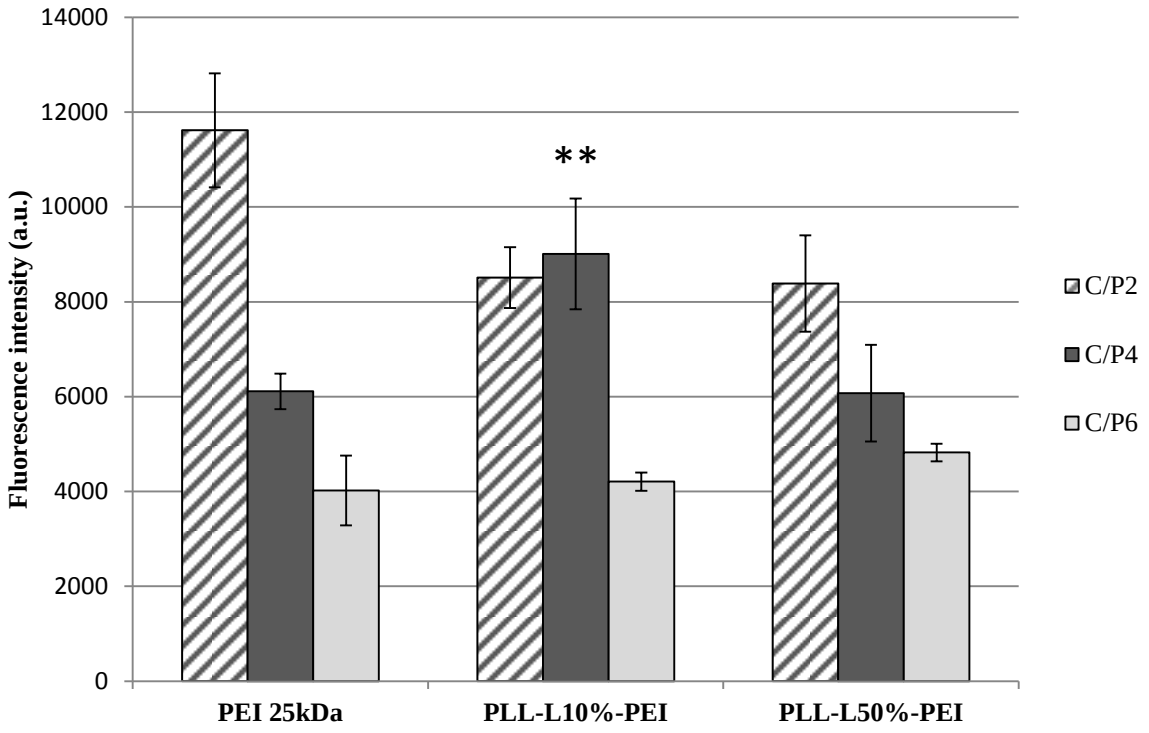
نمودار ۲. بررسی سمیت سلولی پلی پلکس های سنتز شده با نسبت C/P های مختلف ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۶ در سلول های Neuro2a

تمام آزمایشات در سه تکرار انجام شد و داده ها به بصورت میانگین و انحراف معیار نشان داده شده است P<۰/۰۵* مقایسه با PEI دستورزی نشده می باشد. مطالعات گذشته گزارش نموده اند که کارآیی ترانسفکشن با افزایش وزن مولکولی PEI افزایش می‌یابد (۲۴) و در مقابل مطالعات دیگری نیز کاهش قابلیت ترانسفکشن PEI را با افزایش وزن مولکولی مطرح نموده اند (۲۵). ترانسفکشن در سلول های Neuro2a در شرایط مشابه با آزمایش سمیت سلولی انجام شد و بیان پروتئین سبز رنگ GFP در سلول های ترانسفکت شده با دستگاه فلوریمتر بررسی شد. نانوحامل سنتز شده PPL-L10%-PEI در C/P4 بیشترین ترانسفکشن را نسبت به PEI پایه نشان داده است، این امر احتمالا با کاهش سمیت این پلیمر نسبت به PEI دست ورزی نشده در این غلظت مرتبط می باشد. این نتایج، فرضیه ما را که با کاهش سمیت، قابلیت ترانسفکشن افزایش می یابد را تایید می کند. قابلیت انتقال ژنی PLL بسیار پایین بود به طوری که میزان بیان پروتئین سبز رنگ GFP در سلول های ترانسفکت شده کمتر از حد آستانه تشخیص دستگاه فلوریمتر بود، بنابراین در شکل ۳ ترانسفکشن PLL نشان داده نشده است.

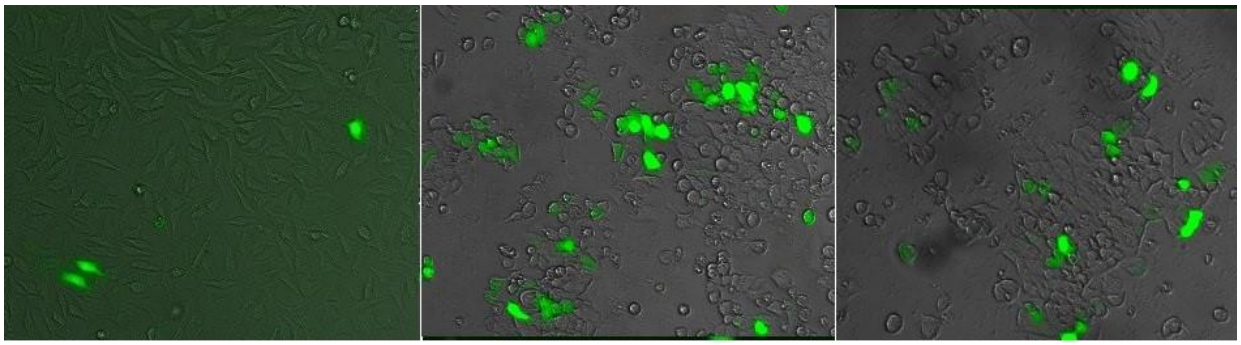
تمام آزمایشات در سه تکرار انجام شد و داده ها بصورت میانگین و انحراف معیار نشان داده شده است. P<۰/۰۵** در مقایسه با PEI دستورزی نشده می باشد.

در مطالعه مشابهی، پلیمر PLL به طور مستقیم با یکسری واکنش شیمیایی پیچیده به PEI خطی با وزن مولکولی پایین (۲۲۰۰ دالتون) متصل شده است، نتایج این تحقیق نیز کاهش سمیت و افزایش ترانسفکشن را نسبت به پلیمر های پایه شان نشان داده اند (۲۶). به علاوه در مطالعه دیگری PEI با وزن مولکولی ۲۵ کیلو دالتون از طریق واکنش های پلیمریزاسیون حلقه باز (Ringopening Polymerization) به ε-بنزیل اکسیکربونیل-لیزین متصل نموده اند و بر خلاف مطالعه ما، نسبت های مختلف از لیزین را به هسته پلی اتیلن ایمینی متصل نموده اند و پلاسمید منتقل شده (حاوی ژن CASP3) با این حامل به خوبی توانست مرگ برنامه ریزی سلول (آپوپتوز) را در شرایط درون تنی (In vivo) القا نماید (۲۷).

www.SID.ir



نمودار ۳. بررسی کارایی ترانسفکشن پلی پلکس های سنتز شده با نسبت C/P های مختلف ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۶ در سلول‌های Neuro2a



PLL PLL-L10%-PEI PEI

شکل ۴. تصویر سلول های ترانسفکت شده با نانو پلی پلکس های PEI ، PLL و PLL-L10% -PEI با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت

نتیجه‌گیری

در این مطالعه نانو حامل هایی با اتصال نسبت های مختلفی از PEI به PLL با کمک لینکر های ۱۰ کربنه تهیه گردید. خصوصیات آنها مانند اندازه ذرات، بار سطحی و ... مورد بررسی قرار گرفت. نانوذرات حاصله دارای بار ذره ای قابل قبول و اندازه ذره ای مناسب (۹۶-۱۲۲ نانومتر) و در مقیاس نانو بودند و به نظر می رسید برای انتقال ژن مناسب باشند. یکی از نانوحامل ها با ۱۰ درصد پوشش آمین PLL به نام PLL-L10% -PEI، با توجه به کاهش سمیت نسبت به PEI دست ورزی نشده، توانست ترانسفکشن بیشتری نسبت به پلیمر های پایه اش از خود نشان دهد. نتایج این مطالعه این نانوذره سنتز شده را به عنوان نانوحاملی برای مقاصد ژن رسانی به سلول های مختلف پیشنهاد می‌دهد.

تشکر و قدردانی

این طرح با همکاری کارشناسان محترم آزمایشگاه های پژوهشکده بوعلی، دانشکده داروسازی و دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شده است.

References

1. Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. International journal of pharmaceutics. 2014;459(1):70-83.

www.SID.ir

2. Charrier S, Poletti V, Martin S, Gjata B, Hebben M, Vignaud A, et al. 690. Development of a Clinical Lentiviral Vector for Gene Therapy of SCID-X1. Molecular Therapy. 2016;24:S273-S4.

3. Gong Y, Mu D, Prabhakar S, Moser A, Musolino P, Ren J, et al. Adenoassociated virus serotype 9-mediated gene therapy for x-linked adrenoleukodystrophy. Molecular Therapy. 2015;23(5):824-34.

4. Bainbridge JW, Mehat MS, Sundaram V, Robbie SJ, Barker SE, Ripamonti C, et al. Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis. New England Journal of Medicine. 2015;372(20):1887-97.

5. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. Nature Reviews Genetics. 2003;4(5):346-58.

6. Ramamoorth M, Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy-an overview. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR. 2015;9(1):GE01.

7. Yamano S ،Dai J, Hanatani S, Haku K, Yamanaka T, Ishioka M, et al. Long-term efficient gene delivery using polyethylenimine with modified Tat peptide. Biomaterials. 2014;35(5):1705-15.

8. Askarian S, Abnous K, Ayatollahi S, Farzad SA, Oskuee RK, Ramezani M. PAMAM–pullulan conjugates as targeted gene carriers for liver cell. Carbohydrate polymers. 2017;157:929-37.

9. Alavi SJ, Gholami L, Askarian S, Darroudi M, Massoudi A, Rezaee M, et al. Hyperbranched–dendrimer architectural copolymer gene delivery using hyperbranched PEI conjugated to poly (propyleneimine) dendrimers: synthesis, characterization, and evaluation of transfection efficiency. Journal of Nanoparticle Research. 2017;19(2):49.

10.Takeda KM, Yamasaki Y, Dirisala A, Ikeda S, Tockary TA, Toh K, et al. Effect of shear stress on structure and function of polyplex micelles from poly (ethylene glycol)-poly (L-lysine) block copolymers as systemic gene delivery carrier. Biomaterials. 2017;126:31-8.

11.Vaidyanathan S, Chen J, Orr BG, Banaszak Holl MM. Cationic polymer intercalation into the lipid membrane enables intact polyplex DNA escape from endosomes for gene delivery. Molecular pharmaceutics. 2016;13(6):1967-78.

12. Farrell L-L, Pepin J, Kucharski C, Lin X, Xu Z, Uludag H. A comparison of the effectiveness of cationic polymers poly-L-lysine (PLL) and polyethylenimine (PEI) for non-viral delivery of plasmid DNA to bone marrow stromal cells (BMSC). European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. 2007;65(3):388-97.

13. Mirtič A, Grdadolnik J. The structure of poly-L-lysine in different solvents. Biophysical chemistry. 2013;175:47-53.

14. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions. Small. 2010;6(1):12-21.

15. Gebhart CL, Kabanov AV. Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. Journal of Controlled Release. 2001;73(2):401-16.

16. Niebel Y, Buschmann MD, Lavertu M, De Crescenzo G. Combined analysis of polycation/ODN polyplexes by analytical ultracentrifugation and dynamic light scattering reveals their size, refractive index increment, stoichiometry, porosity, and molecular weight. Biomacromolecules. 2014;15(3):940-7.

17. Albanese A, Tang PS, Chan WC. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. Annual review of biomedical engineering. 2012;14:1-16.

18. Günther M, Lipka J, Malek A, Gutsch D, Kreyling W, Aigner A. Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting in vivo and

www.SID.ir

siRNA delivery to the lung. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2011;77(3):438-49.

19. Park JS, Park J-K, Nam J-P, Kim W-S, Choi C, Kim M-Y, et al. Preparation of pullulan-g-poly (L-lysine) and it's evaluation as a gene carrier. Macromolecular research. 2012:1-6.

20.Boddu SH, Vaishya R, Jwala J, Vadlapudi A, Pal D, Mitra A. Preparation and characterization of folate conjugated nanoparticles of doxorubicin using PLGA-PEG-FOL polymer. Med Chem. 2012;2(4):68-75.

21.Neu M, Fischer D, Kissel T. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly (ethylene imine (and its derivatives. The journal of gene medicine. 2005;7(8):992-1009.

22.Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsässer H-P, Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. Pharmaceutical research. 1999;16(8):1273-9.

23.Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, Hunter AC, Debska G, Szewczyk A. A two-stage poly (ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. Molecular Therapy. 2005;11(6):990-5.

24.Godbey W, Wu KK, Mikos AG. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly (ethyleneimine) as a gene delivery vehicle. Journal of biomedical materials research. 1999;45(3):268-75.

25.Parhiz H, Hashemi M, Hatefi A, Shier WT, Farzad SA, Ramezani M. Molecular weight-dependent genetic information transfer with disulfide-linked polyethylenimine-based nonviral vectors. Journal of biomaterials applications. 2013;28(1):112-24.

26.Dai J, Zou S, Pei Y, Cheng D ،Ai H, Shuai X. Polyethylenimine-grafted copolymer of poly (l-lysine) and poly (ethylene glycol) for gene delivery. Biomaterials. 2011;32(6):1694-705.

27.Tian H, Lin L, Jiao Z, Guo Z, Chen J, Gao S, et al. Polylysine-modified polyethylenimine inducing tumor apoptosis as an efficient gene carrier. Journal of controlled release. 2013;172(2):410-8.

www.SID.ir

Archive of SID
Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2017; 5(4): 12-21

Preparation and evaluation of nano copolymer of PEI conjugated PLL via 10-carbon linkers for gene delivery into eukaryotic cells

Saeedeh Askarian[1], Reza Kazemi Oskuee[1], Khalil Abnous[2], Mohammad Ramezani[2,*]

1- Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
2- Pharmaceutical Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

***Corresponding Address:** Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
Email address: Ramezanim@mums.ac.ir

Abstract

Background & Aim: A lack of efficient gene-delivery carriers has always been the biggest challenge in gene therapy. Polyethylenimine (PEI) and poly (L-lysine) (PLL) are the most studied non-viral gene carriers. The purpose of this study is to prepare new nano-carriers, by conjugating these two polymers via 10 carbon linkers (10-bromodecanoic acid), in order to take advantage of them and compensate their deficiencies for gene delivery aims.

***Methods*:** In this experimental study, two types of copolymers were synthesized. In the first step, a high molecular weight PLL (30-70 kDa) was considered as the core of the particle, and then the 10-carbon linkers were attached to the PLL relative to 10% and 50% of the PLL's amines. After that, the PEI polymer with an average molecular weight of 25 KDa was conjugated to PLL via linkers. The physiochemical properties of the synthesized carriers, cytotoxicity and gene transfer efficiency were evaluated in mouse neuroblastoma cells (Neuro2A).

***Results*:** The synthesized carriers were able to form polyplexes in nano-scale size (96-122 nm), and the carrier PLL-L10%-PEI was able to increase transfection relative to its base polymers (PEI and PLL); moreover, it also showed less cellular cytotoxicity in comparison with unmodified PEI.

***Conclusion*:** The best obtained nanoparticle in this study showed an acceptable charge (+8 mV) and proper nano-scale size (116 nm). This nano-copolymer increases the efficiency of transfection while it reduces cytotoxicity. Therefore, this nano-carrier is suggested for further gene delivery purposes to various cells.

***Keywords*:** Gene delivery, Nanoparticles, Non-viral vector, Poly (L-lysine), Polyethylenimine

www.SID.ir