Assessment of biodegradability and cytotoxicity of mPEG-PCL diblock copolymers and PCL-PEG-PCL tri block copolymers on HEK293 cells

Kheiri Manjilli H., PhD[1], Danafar H., PhD[2], Sharafi A., PhD[3]

1. Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Nanotechnology, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Nanotechnology, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran (Corresponding Author),Tel:+98-24-33473635, danafar@zums.ac.ir
3. Pharmaceutical Biotechnology Depertment, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

ABSTRACT

Background and Aim: Knowledge of biodegradability and biocompatibility rate in drug delivery systems is very important.

Material and Method: This study PCL–PEG–PCL and MPEG-PCL copolymers were synthesized by ring-opening copolymerization. HNMR, FTIR, DSC and GPC techniques were used to confirm successful synthesis and determination of the characteristics of the copolymers. We evaluated biocompatibility by MTT assay on the basis of cytotoxicity effect of these copolymers on HEK293 cells. Biodegradation was evaluated by GPC technique.

Results: The results of HNMR and FTIR confirmed synthesis of diblock and tri block copolymers. Using DSC technique, melting point of tri block and diblock copolymers were 55 ℃ and 58.68℃ and also the average molecular weights of these copolymers were 16,000 and 12,223 Dalton, respectively. The degradation of these copolymers were performed in buffer solution and at the end of the 31st day, molecular weights of diblock and tri block Copolymers were 7852 and 9586 Dalton respectively. Based on IC_{50} , diblock and tri block copolymers had no toxic effects on HEK293 cells and are biocompatibile .

Conclusion: diblock and tri block copolymers had high rates of biodegradability and because of not having toxic effects on normal renal cells, they were biocompatible.

Keywords: Copolymer, Cytotoxicity, Biocompatibility, Biodegradability.

Received: Nov 7, 2016 **Accepted:** Feb 28, 2017

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:27 +0430 on Tuesday September 19th 2017

Archive of SID

www.SID.ir

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و دوم / مرداد و شهریور ۱۳۹۶/۱۲۵-۱۱۳

بررسی تخریب پذیری و سمیت سلولی کوپلیمرهای دوتایی mPEG-PCL و سه تایی PCL-PEG-PCL بر روی سلولهای نرمال کلیه

حمیدرضا خیری منجیلی[۱]، حسین دانافر[۱]، علی شرفی[۲]

۱. استادیار گروه نانوتکنولوژی دارویی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

۲. استادیار گروه نانوتکنولوژی دارویی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران (مولف مسوول)، تلفن ثابت:۰۲۴-۳۳۴۷۳۶۳۵، danafar@zums.ac.ir

۲. استاد یار گروه بیوتکنولوژی دارویی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: در سیستم های دارورسانی با استفاده از کوپلیمرها دانستن میزان تخریب پذیری و زیست سارگاری پلیمرها از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

روش بررسی: در این پروژه ابتدا کوپلیمرهای PCL-PEG-PCL و کوپلیمرهای mPEG-PCL به روش پلیمریزاسیون حلقه گشایی سنتز و از تکنیکهای مختلفی همچون GPC, HNMR, FT-IR, وDSC برای تایید سنتز موفقیت آمیز و تعیین ویژگیهای آنها استفاده گردید.تخریب پذیری کوپلیمرها با استفاده از تکنیک GPC و از روی میزان کاهش جرم و زیست سازگاری کوپلیمرها با استفاده از سمیت سلولی این کوپلیمرها با استفاده از MTT assay بر روی سلولهای نرمال کلیه(HEK 293) انجام گرفت.

یافته ها: نتایج HNMR و FTIR صحت تشکیل کوپلیمرهای سه تایی و دوتایی سنتز شده را تایید نموده و با استفاده از تکنیک DSC نقطه ذوب کوپلیمرهای سه تایی و دوتایی به ترتیب در ^{0}C 55 و °C ۵۸/۶۸می باشد و همچنین این کوپلیمرها به ترتیب ارای جرم مولکولی میانگین ۱۶۰۰۰و۱۲۲۲۳ دالتون می باشد. تخریب پذیری این کوپلیمرها در محیط بافری صورت گرفت که در انتهای روز ۳۱ جرم مولکولی پلیمردوتایی و کوپلیمر سه تایی به ترتیب در حدود ۷۸۵۲ و ۹۵۸۶ دالتون می باشد. از روی میزان IC_{50} محاسبه برای هرترکیب بر روی سلولهای کلیه(HEK 293) نشان داده شده که کوپلیمرهای دو تایی و سه تایی هیچ گونه سمیتی نداشته اند و کاملا زیست سازگار هستند.

نتیجه گیری:این کوپلیمرهای سه تایی و دوتایی زیست تخریب پذیری بالایی داشتند و همچنین با توجه به نداشتن هیچ گونه سمیت سلولی روی سلولهای نرمال کلیه از لحاظ زیستی نیز زیست سازگار می باشند.

واژگان کلیدی: کوپلیمر، زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، سمیت سلولی

وصول مقاله:۹۵/۸/۱۷ اصلاحیه نهایی:۹۵/۱۲/۹ پذیرش:۹۵/۱۲/۱۰

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:27 +0430 on Tuesday September 19th 2017

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:27 +0430 on Tuesday September 19th 2017

مقدمه

واژه زیست تخریب پذیر یا Biodegradable به معنی موادی است که به سادگی توسط فعالیت موجودات زنده به زیرواحدهای سازنده خود تجزیه شده و بنابراین در محیط باقی نمی مانند(۱). پلیمرهای زیست تخریب پذیر، مزایای متعددی نسبت به پلیمرهای غیر زیست تخریب پذیر برای دارورسانی کنترل شده دارند(۲). پلیمرهای زیست تخریب پذیر طبیعی و مصنوعی دارای خواص مطلوب مانند زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و مقاومت مکانیکی بالا هستند(۳). آنها سمیت ناچیز دارند و نیز تخریب آنها غیر سمی است(۴). با توجه به خواص مکانیکی مناسب، آنها برای طیف گسترده‌ای از مشخصات مناسب هستند(۶و۵). نانو ذرات پلیمری که برای سیستم‌های داروسازی به کار می‌روند لازم است از پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر[1] و زیست سازگار تشکیل شده و دارای اندازه ذرات معین و توزیع اندازه‌ی باریکی باشند تا حامل دارویی پس از رهش دارو بتواند براحتی از بدن دفع شود(۷). قطر حامل‌های دارویی یک پارامتر تعیین کننده در شدت و سرعت حذف آن‌ها از سیستم گردش خون و نحوه‌ی توزیع آن‌ها در بدن می‌باشد و همچنین اندازه ذرات بر روی مقدار بارگذاری دارو و سرعت رهش آن تأثیر دارد(۸). پلیمرهای زیست تخریب پذیر، مزایای متعددی نسبت به پلیمرهای غیر زیست تخریب پذیر برای دارورسانی کنترل شده دارند(۹). پلیمرهای زیست تخریب پذیر طبیعی مانند ژلاتین، آلبومین، کیتوزان و پلیمرهای زیست تخریب پذیر مصنوعی از جمله PCL(پلی کاپرولاکتون)،PEO(پلی‌اتیلن‌اکسید) و پلی استرهای آلیفاتیک مانند PLA(پلی لاکتیک اسید)، PGA(پلی گلیکولیک اسید) و PLGA(پلی لاکتیک-گلیکولیک اسید) به طور کامل برای سیستم‌های دارورسانی مورد بررسی قرار گرفته‌اند(۱۲-۱۰). امروزه باتوجه به ویژگی‌های متنوع و خاص کوپلیمرها توجه زیادی به کاربرد آنها در زمینه‌های مختلف بویژه دارورسانی شده است(۱۴و۱۳). ازجمله‌ی این کوپلیمرها می‌توان به کوپلیمرهای mPEG-PCL و PCL-PEG-PCL اشاره کرد که به دلیل خاصیت دوگانه دوستی قادر است انواع ذرات پلیمری را با تغییر نسبت جزء آبگریز به آبدوست ایجاد کند(۱۱و ۱۰و ۸). از خصوصیات بارز این کوپلیمرها زیست تخریب پذیری آنها می‌باشد که در محیط بدن به متابولیتهای غیر سمی با قابلیت جذب در بدن تبدیل می‌شود(۱۶و۱۵). از این کوپلیمر برای ایجاد سیستم‌های حامل دارو، آهسته رهش استفاده می‌شود. کوپلیمرهای mPEG-PCL و PCL-PEG-PCL با رفتار دوگانه دوست برای تشکیل مایسل‌های با ساختار هسته- پوسته مورد استفاده قرار می‌گیرند(۱۸-۱۶). این حاملهای پلیمری به عنوان حامل داروهای آبگریز، باعث افزایش زمان گردش در خون و کاهش جذب نانوذرات توسط کبد می‌شوند(۲۳-۱۹).Wan و همکارانش در سال ۲۰۱۰ زیست سازگار بودن و تخریب پذیری کوپلیمرهای سه تایی بر پایه پلی اتیلن گلیکول را در سیستمهای in vivo در موش صحرایی بررسی نمودند (۲۰). در یک کار مشابه Kheiri وهمکارانش زیست سازگار بودن و تخریب پذیری کوپلیمرهای دوتایی بر پایه پلی اتیلن گلیکول با پلی کاپرولاکتون را در سیستمهای in vivo در موش صحرایی بررسی نمودند(۱۱). با در نظر گرفتن مزایا و ویژگیهای نانوساختارهای پلیمری بنظر می رسد بررسی زیست تخریب پذیری و زیست سازگاری این پلیمرها می تواند راهکار نوینی برای اثر بخشی همراه با عوارض کمتر و فراهمی زیستی بالاتر فرا روی محققین قرار دهد.

روش بررسی

سنتز کوپلیمر سه تایی PCL-PEG-PCL و دوتایی mPEG-PCL:

[1] Biodegradable

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:27 +0430 on Tuesday September 19th 2017

نوع مطالعه از نوع مطالعات آزمایشگاهی بوده که زیر شاخه مطالعه تجربی می باشد که کاربرد این مطالعه در زیست فن آوری و همچنین مطالعات کشت سلولی می باشد.کوپلیمر سه تایی PCL-PEG-PCL ازطریق پلیمریزاسیون حلقه گشایی کاپرولاکتون در حضور پلی اتیلن گلیکولبه عنوان مولکول آغازگر و کاتالیست اکتانات قلع سنتز گردید (۱۶). بدین صورت که مقدار ۳g از PEG با جرم مولکولی g/mol ۶۰۰۰ در داخل یک بالن دو دهانه وارد کرده و تحت خلاء و دمای °C ۸۰ به مدت ۳۰ دقیقه خشک نموده سپس نیتروژن را به داخل بالن حاوی PEG که تحت همزدن مغناطیسی است وارد کرده و دمای آن در حمام روغن به °C ۱۲۰ رسانده شد. در ادامه g ۶ از مونومر کاپرولاکتون را به ظرف واکنش اضافه کرده و بعد از ذوب شدن کامل کاپرولاکتون، کاتالیست را به اندازه µl ۱۰۰ به آن افزوده و اجازه داده شد تا واکنش در دمای °C ۱۲۰ به مدت ۱۲ ساعت پیش رود سپس سیستم را سرد کرده و کوپلیمر را داخل کلروفرم حل و در داخل دی اتیل اتر سرد رسوب داده شد. رسوب حاصله توسط کاغذ صافی جمع آوری و خشک گردید. لازم به ذکر است مثل روش بالا کوپلیمر دو تایی mPEG-PCL نیز ساخته شد(۱۰).

آنالیز کوپلیمرهای سه تایی PCL-PEG-PCLو کوپلیمرهای دوتایی mPEG-PCL:

برای تعیین ساختار کوپلیمر سه تایی PCL-PEG-PCL وکوپلیمرهای دوتایی mPEG-PCL از دستگاه ^1H NMR استفاده شده است. طیف‌های NMR با دستگاه Bruker 400MHz و در دمای °C ۲۵ گرفته شدند. کلروفرم دوتره($CDCl_3$) به عنوان حلال و تری میتل سیلان(TMS) به عنوان استاندارد داخلی به کار برده شده‌اند. برای تائید تشکیل این کوپلیمرها از طیف FT-IR استفاده شده است. طیف FT-IR نمونه‌های مختلف با استفاده از دستگاه اسپکتروسکوپی FT-IR(Tensor 27, Bruker) ثبت گردید.برای مطالعه رفتار حرارتی از آنالیز DSC استفاده شد. نمونه‌ها با سرعت °C/min ۱۰ حرارت داده شده و اندازه‌گیری در محدوده° ۲۰۰ – ۲۵۰ با استفاده از دستگاه (Mettler Toledo, Star SW 9.30) ساخت انگلیس انجام گرفت. جرم مولکولی میانگین و توزیع جرم مولکولی کوپلیمرها توسط آنالیز ژل کروماتوگرافی بررسی گردید. نمونه در داخل تتراهیدروفوران کاملاً خالص حل شده و پس از تزریق به ستون و مقایسه با نمودار کالیبراسیونی که با استفاده از پلی استایرن‌های استاندارد با جرم مولکولی های بین g/mol ۴۵۰۰ تا g/mol ۲۹۰۰۰ رسم شده، جرم مولکولی و پلی دیسپرسیتی کوپلیمر سنتز شده محاسبه شد. برای انجام آنالیز GPC از دستگاه Knaure ساخت آلمان با دتکتور ضریب شکست با یک ستون با مشخصات(4.6*30 mm)و فاز متحرکی که شامل تتراهیدروفوران است استفاده گردید.

تخریب پذیری پلیمرها در محیط خارج ازبدن:

ابتدا یک محلول آلی با مقدار وزن ۵ گرم از هر کدام از کوپلیمرها در ۱۰۰ میلی لیتر کلروفرم تهیه گردید واین محلول تحت هم زدن با دور rpm ۱۵۰۰ اضافه می‌شود. هم زدن تا تبخیر کامل حلال آلی در دمای اتاق ادامه پیدا کرده تا مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط نگهداری شده سپس با استفاده از فریزدرایر در دمای °C۷۲- ودر فشار ۴۰ پاسکال تا بدست آمدن پودر کاملاً عاری از حلال، عمل تصعید انجام گرفت. بعد از این کار یک قسمت از فیلم پلیمری را برداشته ودر داخل یک ظرف حاوی ml ۱۳ بافر فسفات با pH=۷/۴۰ ظرف محتوی بافر و پلیمر در دستگاه شیکرانکوباتور در دمای °C ۳۷ قرار داده و در زمان‌های مشخص یک قسمت از محلول برداشته، و با بافر تازه جایگزین و مقدارجرم پلیمر را با GPC اندازه گیری نموده، هر یک از اندازه گیری‌ها را سه مرتبه تکرار کرده و میانگین این سه داده برای محاسبه جرم مولکولی تخریب شده استفاده گردید. این کار برای محیط بافرفسفات با pH=۵/۵۰

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:27 +0430 on Tuesday September 19th 2017

و همچنین محیط پلاسمای تازه انسانی نیز انجام شد. نتایج اندازه گیری برای همه پلیمرها بصورت جداگانه انجام شد.

تعیین سمیت سلولی کوپلیمرها یر روی سلول های نرمال کلیه(HEK 293) بوسیله MTT :

هنگامی که سلول های موجود در ظرف کشت حدود ۸۰ درصد سطح ظرف خود را پوشانده بودند تریپسینه شده و سوسپانسیون سلولی حاصله بعد از شمارش سلولی به روش تریپان بلوبه تعداد ۱۰۰۰ سلول با حجم نهایی۱۰۰ µl در هر یک از چاهک های پلیت ۹۶ خانه برای ۶ غلظت دارویی و برای هر غلظت ۵ خانه کاشته شد. بعد از حدود ۲۴ ساعت از کشت سلول های مورد نظر تعویض محیط کشت با محیط کشت حاوی غلظت های مختلف کوپلیمرهای دوتایی و سه تایی (در رنج ۲/۵ تا۸۰µM) انجام گرفت. بعد از ۵ روز به هر خانه حاوی محیط کشت۲۵ µl از محلول MTT افزوده شد سپس پلیت به مدت ۳ تا ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد بعد محیط کشت را خالی نموده و به هر خانه۱۰۰ µl از محلول DMSO اضافه گردید سپس جذب کریستال های بنفش رنگ حل شده فورمازان توسط دستگاه Plate Reader مدل Tecan در طول موج ۵۷۰nm در مقابل ۶۳۰nmخوانده شد. با استفاده از نتایج بدست آمده میزان IC_{50} برای کوپلیمرها محاسبه گردید که این بیانگر سمیت سلولی ترکیب می باشد.

داده ها با نرم افزار Graphpad prism آنالیز گردید. برای محاسبه IC_{50} از non-linear Regression استفاده می شود.

تست Duncanبا نرم افزار Graphpad prism استفاده می گردد.

یافته ها

بررسی ویژگیهای کوپلیمرهای سه تایی و دوتایی:

شماتیک سنتز کوپلیمرهای دو تایی و سه تایی به ترتیب در شکل۱و ۲ نشان داده شده است. میزان راندمان کوپلیمرسه تایی و دوتایی تشکیل شده به ترتیب در حدود ۸۲٪و ۷۸٪ می باشد. ساختار و ترکیب کوپلیمرهای سنتز شده توسط ^{1}HNMR در حلال $CDCl_3$ تعیین شد و در شکل ۳و۴ طیف آنها آورده شده است. برای کوپلیمر سه تایی همانطورکه در طیفHNMR (شکل۳) دیده شده است وجود پروتونهای متیلن (CH_2) مربوط به جزئPCLدر 4.06 ،1.3 ppm, 1.6 ppm, 2.2 ppm ppm مشاهده گردید و همچنین پروتونهای متیلن (CH_2) گروه PEG کوپلیمر در 3.63 ppm به صورت پیک یکتایی ظاهر شد. همچنین جرم مولکولی کوپلیمر محاسبه شده توسط ^{1}H NMR ۱۶۰۰۰دالتون می باشد. در طیف HNMRکوپلیمر mPEG-PCL همانطور که در شکل۴ مشاهده می‌شود وجود پیک در ناحیه ppm ۳/۳۸و۳/۶۴ مربوط به گروه متوکسی و گروههای متیل PEG است. پیک ppm (2H)۱/۳، ppm (4H)۱/۶، ppm (2H)۲/۲، ppm (2H)۴/۰۶ به ترتیب مربوط به کاپرولاکتون است. درطیفFT-IR کوپلیمر-PCL PEG-PCL (شکل۵) نوارهای جذبی تیز و شدیدی در فرکانسهای$^{-1}$cm 1725 و $^{-1}$cm 1191 مشاهده می گردد که به ترتیب وجود گروههای کربوکسیلیک استری (C=O) و گروههای اتری (C-O-C) را در ساختار کوپلیمر تائید می کند و نشان دهنده تشکیل کوپلیمر-PCL PEG-PCL می باشد. از طیف FTIR مربوط به کوپلیمر mPEG-PCL می‌توان اینگونه برداشت کرد که نوار جذبی در فرکانس $^{-1}$cm ۱۱۰۶ و $^{-1}$cm ۱۲۴۰ مربوط به پیوندهای کششی (C-O) می‌باشد. نوار جذبی تیز و شدیدی که در فرکانس $^{-1}$cm ۱۷۵۲ مشاهده می‌شود وجود گروه‌های استری کربونیل(C=O) را تأیید می‌کند و نشان دهنده‌ی تشکیل کوپلیمرmPEG-PCL می‌باشد. هیدروژن‌های متیلن (-CH_2-) یک جذب C-H کششی می‌دهند که مربوط به جذب‌های کششی متقارن می باشند، که در $^{-1}$cm ۲۸۸۴ جذب می‌دهد(شکل ۶). طیف DSC مربوط به کوپلیمرهای PCL-PEG-PCL در شکل۷

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:27 +0430 on Tuesday September 19th 2017

نشان داده شده است. برای کوپلیمر PCL-PEG-PCLیک پیک گرماگیر در ^{0}C 55 مشاهده می گرددکه حاصل از نمونه، در محدوده‌ی$^{\circ}C$ ۵۸/۶۸ می‌باشد که یک پیک گرماگیر است.

بررسی طیف GPC مربوط به کوپلیمر mPEG-PCL و کوپلیمر PCL-PEG-PCL:

برای کوپلیمر دوتایی سنتز شده آنالیز GPC برای متوسط جرم مولکولی وزنی و متوسط جرم مولکولی عددی به ترتیب مقادیری برابر با ۱۲/۲۳ و ۱۱/۱۰ KDa را نشان می دهد و مقدار پلی دیسپرسیتی بدست آمده ۱/۱۰می باشد و برای کوپلیمر سه تایی متوسط جرم مولکولی عددی و متوسط جرم مولکولی وزنی به ترتیب مقادیری برابر با ۱۵ و ۱۶ KDa را نشان می دهد ومقدار پلی دیسپرسیتی بدست آمده ۱/۰۲ می باشد. در جدول ۱ خصوصیات کوپلیمرهای سنتز شده نشان داده شده است.

بررسی زیست تخریب پذیری کوپلیمرهای PCL-PEG-PCL در محیطهای مختلف:

نمودار بررسی زیست تخریب پذیری این کوپلیمرها در شکل ۹ نشان داده شده است. همانطور که در شکل مشاهده می گردد میزان تخریب پذیری پلیمرها در محیط پلاسما بعلت وجود آنزیمهای استراز شکستن پیوندهای کربوکسیل لاکتیک اسید بهتر بوده و تخریب پذیری بیشتری صورت گرفت که در انتهای روز ۳۱ جرم مولکولی پلیمر در حدود ۹۵۸۶ دالتون می باشد و در PH اسیدی نیز نسبت به محیط مربوط به جزئ PEG و PCL می باشد. DSC مربوط به کوپلیمر mPEG-PCL در شکل (۸) نشان می‌دهد، پیک بازی به دلیل حساس بودن پیوند استری به محیط اسیدی تخریب پذیری بهتر است.

بررسی زیست تخریب پذیری کوپلیمرهای mPEG-PCL در محیطهای مختلف :

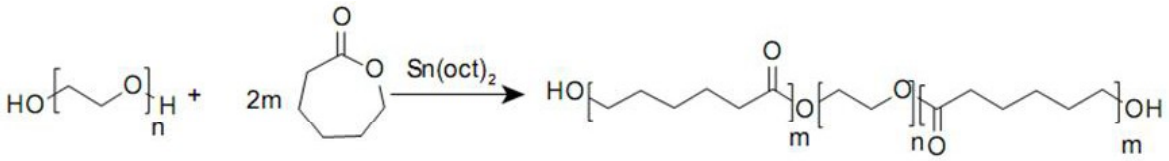
نمودار بررسی زیست تخریب پذیری این کوپلیمرها در شکل ۱۰ نشان داده شده است. همانطور که در شکل مشاهده می گردد در محیط پلاسما و محیط اسیدی این تخریب پذیری تقریبا یکسان می باشد و در PH اسیدی نیز نسبت به محیط بازی تخریب پذیری بهتر است به این علت که در محیطهای اسیدی تحت تاثیر اسید پیوندهای استری به محیط اسیدی حساس بوده و تخریب پذیری راحتتر صورت می گیرد.

بررسی سمیت سلولی کوپلیمرها بر روی سلول های نرمال کلیه (HEK 293) :

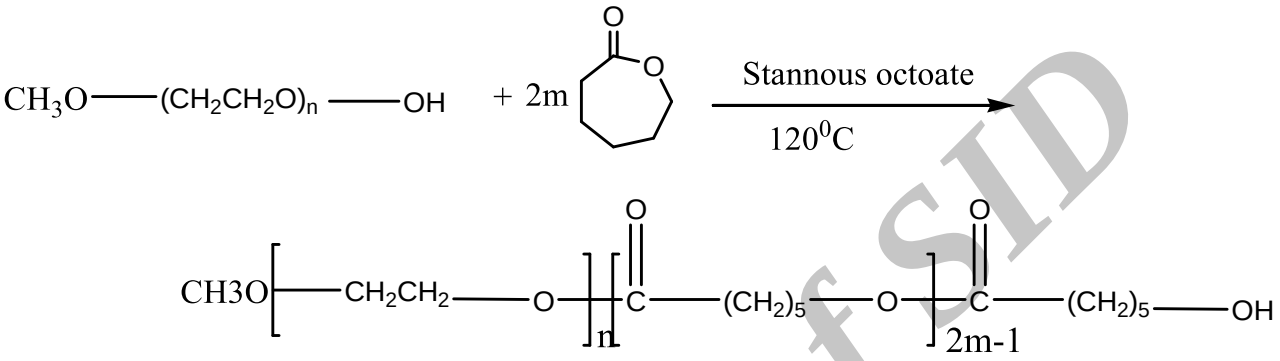
با استفاده از نتایج بدست آمده از ۵ آزمایش مجزا برای هر ترکیب منحنی IC50 برای هر ترکیب رسم شد که این منحنی در شکل ۱۱ آورده شده است. IC_{50} برای هر کوپلیمر محاسبه شده است. از روی میزان IC_{50} محاسبه شده برای هر پلیمر این نتیجه مشخص می گردد که کوپلیمرهای دو تایی و سه تایی هیچ گونه سمیتی نداشته اند و کاملا زیست سازگار هستند.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- مسیر سنتز کوپلیمر PCL-PEG-PCL



شکل۲- مسیر سنتز کوپلیمر دوتایی mPEG-PCL

جدول ۱- خصوصیات کوپلیمرهای سه تایی و دوتایی سنتز شده

Copolymer	Mw[a] (KDa)	Mn[a] (KDa)	T_m (°C)[b]	CL / EG feed	DP_{PEG}	DP_{PCL}
PCL-PEG-PCL	16	15	55.00	2	136.36	87.61
mPEG–PCL	12.23	11.10	58.68	2	113.63	71.14

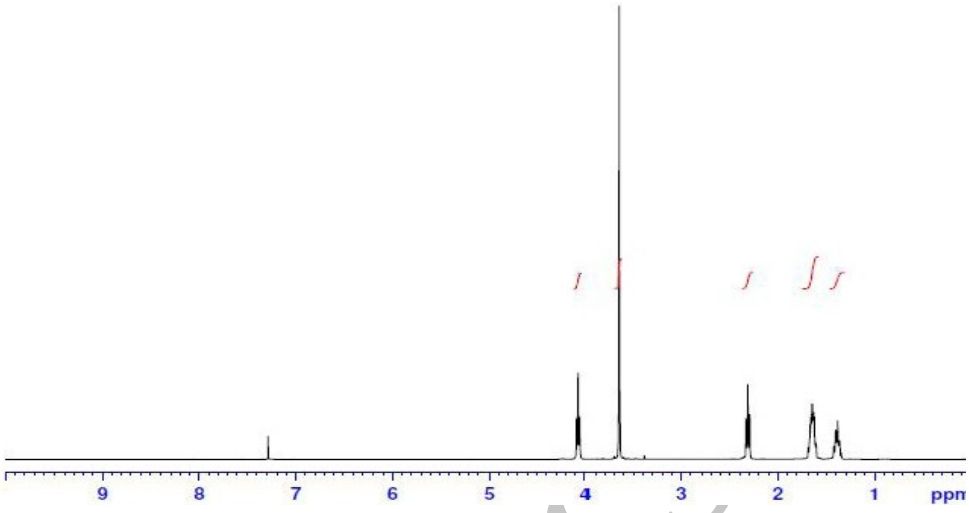
a Determined by GPC analysis using narrow molecular weight polystyrene standards.
b Calculated from the first run of DSC

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:27 +0430 on Tuesday September 19th 2017

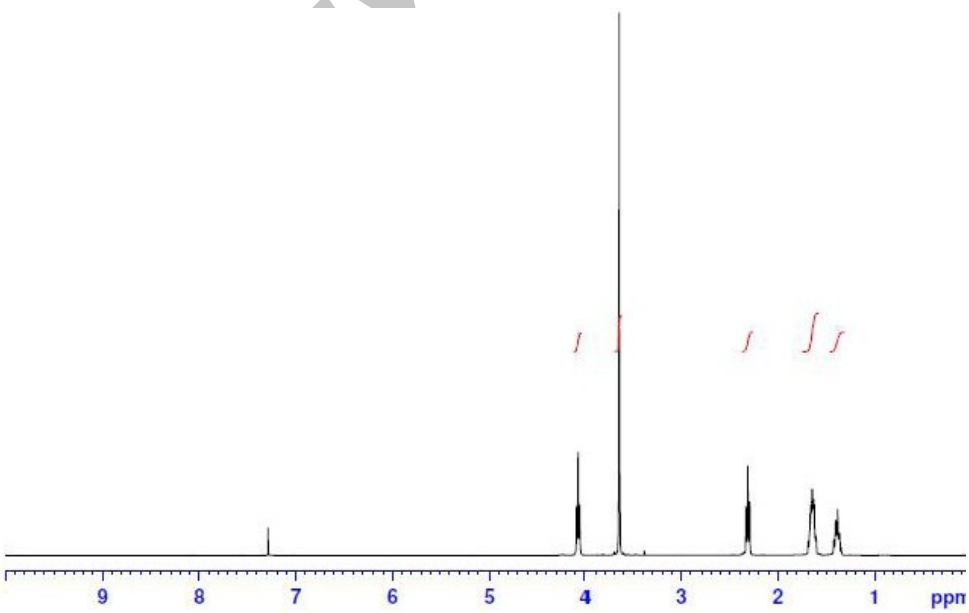
Archive of SID

www.SID.ir

شکل۳- طیف HNMR کوپلیمر PCL-PEG-PCL

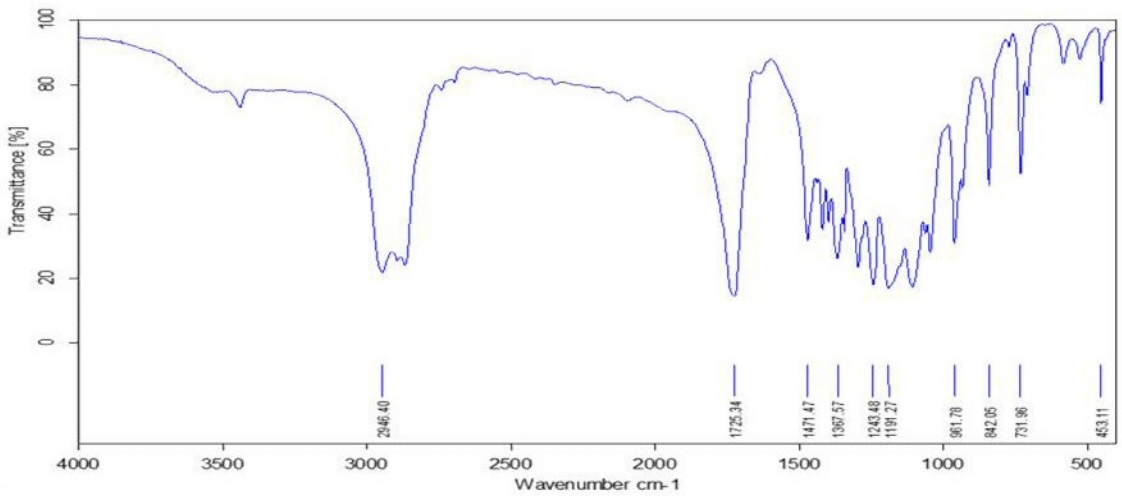


شکل۴- طیف HNMR۱ کوپلیمر mPEG-PCL

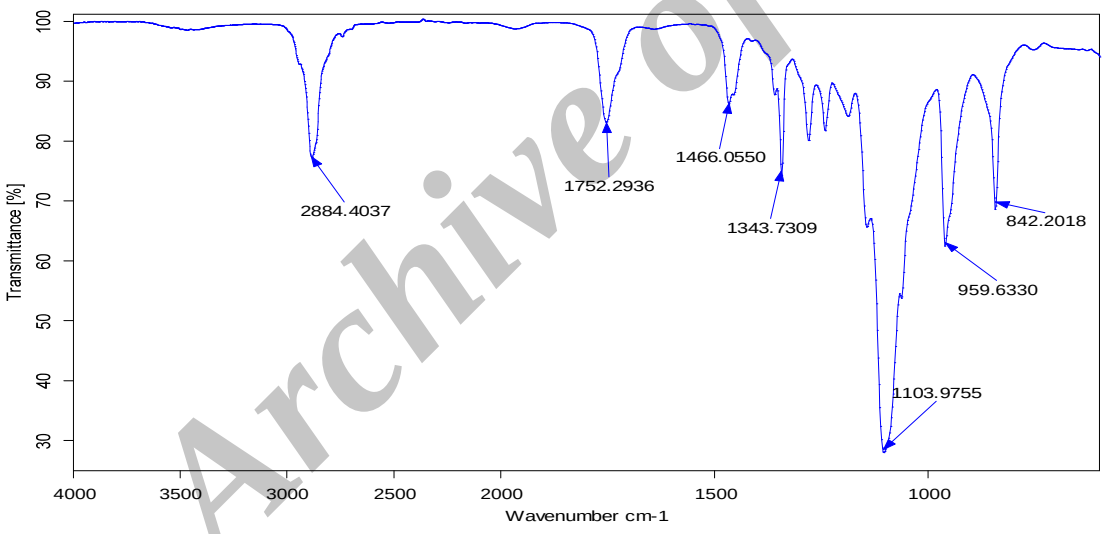


Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:27 +0430 on Tuesday September 19th 2017

www.SID.ir

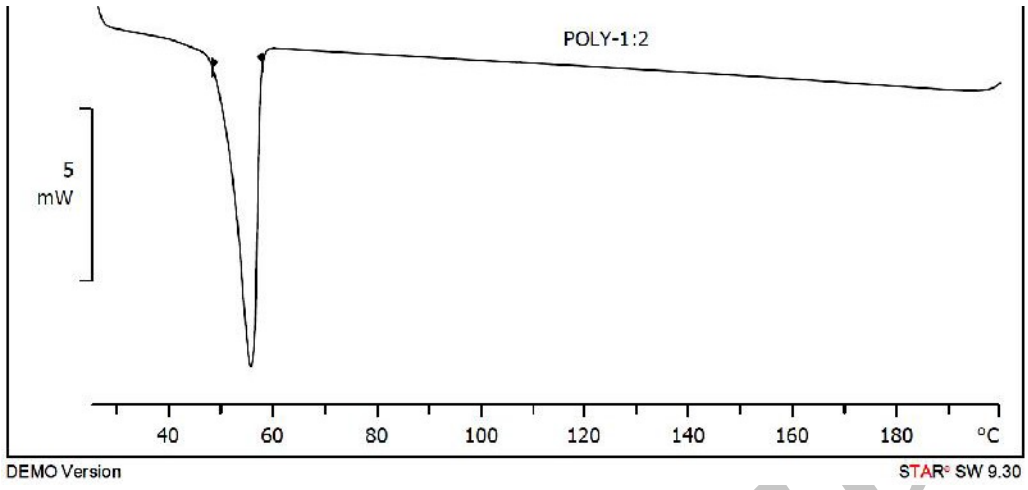


شکل۵- طیف FT-IR کوپلیمر PCL-PEG-PCL

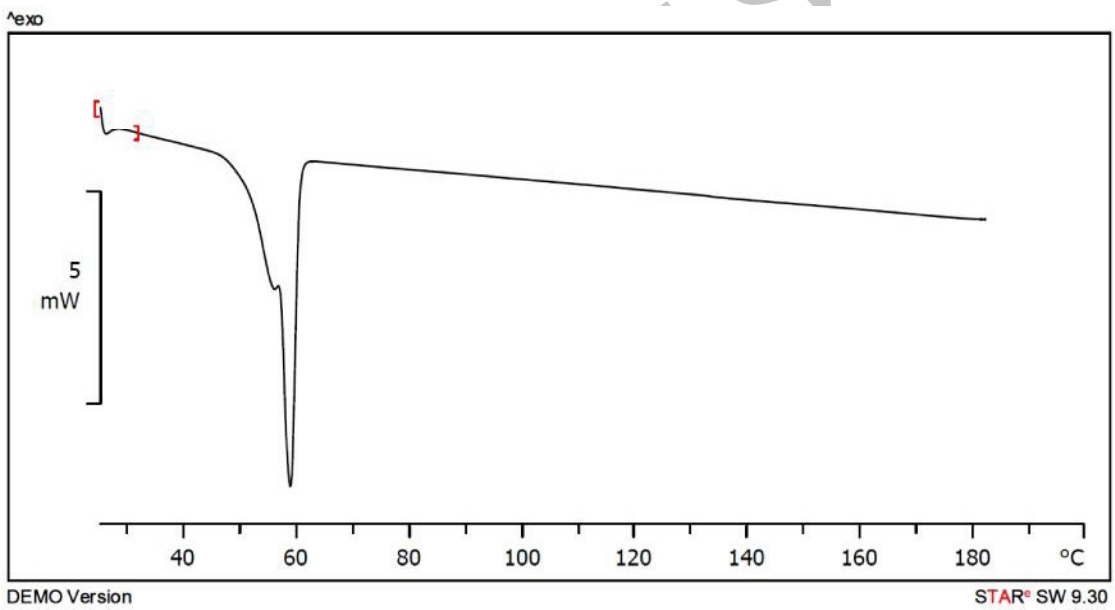


شکل۶- طیف FT-IR کوپلیمر mPEG-PCL

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:27 +0430 on Tuesday September 19th 2017
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۷- طیف DSC مربوط به کوپلیمر PCL-PEG-PCL

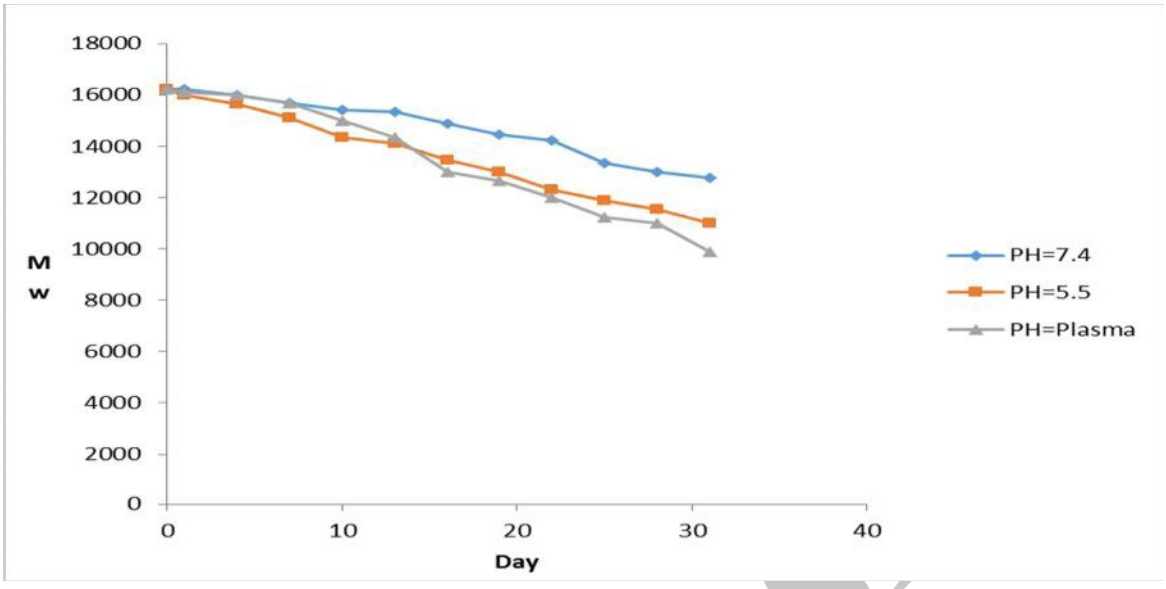


شکل ۸- طیف DSC مربوط به کوپلیمر mPEG-PCL

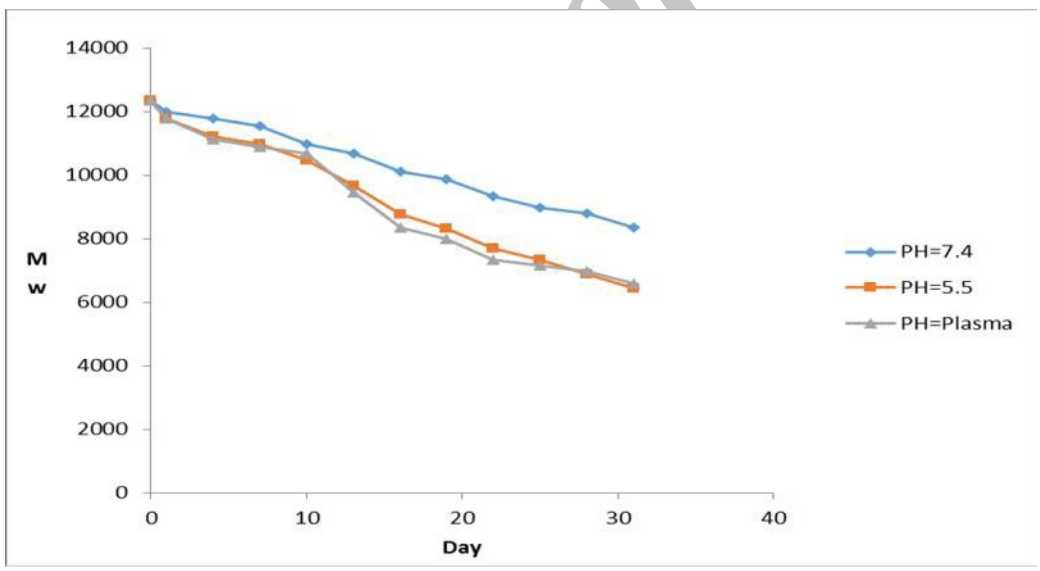
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:27 +0430 on Tuesday September 19th 2017

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:27 +0430 on Tuesday September 19th 2017



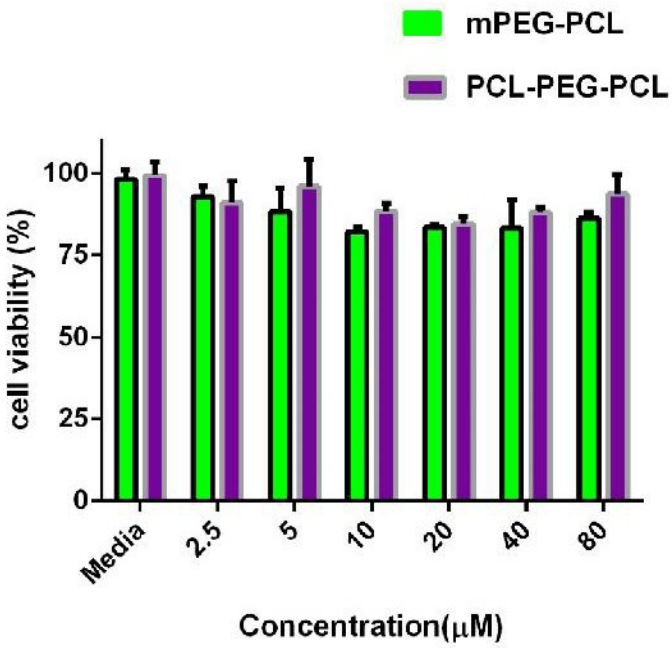
شکل ۹- نمودار تخریب پذیری کوپلیمرهای PCL-PEG-PCL در pH=۷/۴(a) pH=۵/۵(b) و (c) پلاسمای انسانی شکل



شکل ۱۰- نمودار تخریب پذیری کوپلیمرهای mPEG-PCL در pH=۷/۴(a) pH=۵/۵(b) و (c) پلاسمای انسانی

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:27 +0430 on Tuesday September 19th 2017



شکل ۱۱- منحنی IC50کوپلیمرهای سه تایی ودوتایی بر روی سلولهای سالم کلیه

بحث

یافته های این پژوهش نشان می دهد که کوپلیمرهای دو تایی و سه تایی بطور کامل سنتز گزدیده اند. همانطور که در بخش نتایج مشاهده گردید از طیف HNMR و FT-IR کوپلیمرهای دوتایی و سه تایی اینگونه استنتاج می شود که این کوپلیمرها بدرستی سنتز گردیده و نتایج بدست آمده از این طیفها با مطالعات قبلی برای سنتز این کوپلیمرها کاملا منطبق می باشد(۱۶و۱۰). مطالعات قبل نشان داده است هوموپلیمرهای PEG و PCL که هر دو جزء پلیمرهای نیمه بلوری محسوب می‌شوند دارای نقطه ذوب در این محدوده می باشند(۱۸). با این وصف در طیف DSC کوپلیمرهای دوتایی و سه تایی رویداد حرارتی متعلق به دمای ذوب PEG و PCL دیده شده است که با مطالعات قبلی کاملا همخوانی دارد(۶).پلی دیسپرسیتی کوپلیمرهای دوتایی و سه تایی نشان دهنده توزیع جرم مولکولی تقریباً باریکی است، همچنین یک پیک تنها در طیف GPC نشان دهنده عدم حضور هر گونه پلیمر mPEG و PCL واکنش نکرده می باشد و این پیک نشان از خلوص کوپلیمر می باشد. که این نتایج با مطالعات قبلی صورت گرفته در این رابطه مطابقت دارد(۱۶و۶). یافته های تخریب پذیری نشان می دهد که تخریب پذیری کوپلیمرهای دوتایی و سه تایی در محیطهای اسیدی خیلی بیشتر از محیطهای بازی می باشد به این علت که در محیطهای اسیدی تحت تاثیر اسید پیوندهای استری به محیط اسیدی حساس بوده و تخریب پذیری راحتتر صورت می گیرد(۱۸). همچنین تخریب پذیری کوپلیمرهای دوتایی و سه تایی در محیطهای پلاسمای انسانی بعلت وجود آنزیمهای استراز شکستن پیوندهای کربوکسیل لاکتیک اسید بهتر بوده و تخریب پذیری بیشتری صورت گرفت. از یافتهای IC_{50} برای هر

Archive of SID
www.SID.ir

کوپلیمر این گونه استنتاج می شود که کوپلیمرهای دو تایی و سه تایی هیچ گونه سمیتی نداشته اند و کاملا زیست سازگار هستند. که این مطالعه با مطالعات قبلی کاملا منطبق می باشد(۲۰و۱۵). Zange وهمکاران در سال ۱۹۹۸ تخریب پذیری کوپلیمرهای سه تایی را در محیط خارج از بدن در یک محیط بافری و همچنین در محیط پلاسمای انسانی بررسی نموده و تخریب پذیری پلیمرها را از روی کاهش جرم مولکولی کوپلیمر بررسی نمودند (۱۴). همچنین همین گروه زیست سازگاری کوپلیمرهای سه تایی بر پایه PEG را بر روی سلولهای فیبروبلاستL929 بررسی نمودند(۱۴).HU و همکاران در سال ۲۰۱۲ زیست تخریب پذیر کوپلیمرهای PEG-PLA و-PLGA PEG-PLGA را با تست MTT Assay بر روی سلولهای نرمال بررسی نمودند(۱۵).

نتیجه گیری

کوپلیمرهای سه تایی PCL-PEG-PCL و دوتایی mPEG-PCL سنتز شده و از تکنیکهای مختلفی مانند, GPC ,FT-IR ,HNMRو DSCرای شناسایی آنها استفاده گردید و از این کوپلیمرها برای ازمایشات تخریب پذیری کوپلیمرها و زیست سازگاری پلیمرها استفاده گردید. نتایج نشان می دهد که این پلیمرها کاملا زیست تخریب پذیر و کاملا زیست سازگار هستند.

تقدیر و تشکر

این مقاله استخراج از یک طرح تحقیقاتی (6-430-12-a) می باشد که با پشتوانه مالی دانشگاه علوم پزشکی زنجان انجام گرفته است.

Reference

1.Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2010; 75:1-18.
2.Tian G, Li Y, Yuan Q, Cheng L, Kuang P, Tang P. The stability and degradation kinetics of Sulforaphene in microcapsules based on several biopolymers via spray drying. Carbohydrate Polymers 2015; 122: 5-10.
3.Ke X, Ng VWL, Ono RJ,Chan JM, Krishnamurthy S, Wang Y, Hedrick JL, et al. Role of non-covalent and covalent interactions in cargo loading capacity and stability of polymeric micelles. J Control Release 2014; 193:9–26.
4.Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Colloids Surf B Biointerfaces 2010; 75:1–18.
5.Manjili HK, Ma'mani L, Tavaddod S, Mashhadikhan M, Shafiee A, Naderi-Manesh HD. L-Sulforaphane loaded Fe_3O_4 gold core shell nanoparticles: A potential sulforaphane delivery system. PloS one 2016; 11:e0151344.
6.Danafar H. Study of the composition of polycaprolactone/poly (ethylene glycol)/polycaprolactone copolymer and drug-to-polymer ratio on drug loading efficiency of curcumin to nanoparticles. Jundishapur J Nat Pharm Prod 2016 doi: 10.17795/jjnpp-34179
7.Chen W, Zhang JZ, Hu J, Guo J.H , Yang Q.S. Preparation of amphiphilic copolymers for covalent loading of paclitaxel for drug delivery system. J Polym Sci A Polym Chem 2014; 52:366–374.
8.Danafar H, Rostamizadeh K, Davaran S, Hamidi M. Drug-conjugated PLA–PEG– PLA copolymers: Anovel approach for controlled delivery of hydrophilic drugs by micelle formation. Pharm Dev Technol 2015; DOI: 10.3109/10837450.2015.1125920
9.Keng. C, Chao C, Ming H, Chun H. The nanoparticles for combating acne vulgairs: In-vitro efficacy of lauric acid- loaded PCL-PEG-PCL on propionbactrium acne. International Conference on Nanotechnology and Biosensors, 2015; IPCBEE 2 IACSIT Press, Singapore.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:27 +0430 on Tuesday September 19th 2017
Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:27 +0430 on Tuesday September 19th 2017

10.Danafar H, Sharafi A, Kheiri Manjili H, Andalib S. Sulforaphane delivery using mPEG–PCL co-polymer nanoparticles to breast cancer cells. Pharmaceutical Development and Technology 2017; 22: 642–651
11.Kheiri Manjili H, Ghasemi P, Malvandi M, Mousavi M, Attari E, Danafar H. Pharmacokinetics and in vivo delivery of curcumin by copolymeric mPEG-PCL micelles. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2017; 116: 17-30.
12.Wang H, Zhao Y, Wua Y, Hub Y, Nan K. Enhanced anti-tumor efficacy by co-delivery of doxorubicin and paclitaxel with amphiphilic methoxy PEG-PLGA copolymer nanoparticles. Biomaterials 2011; 32, 8281-90.
13.Wichuda N, Mangkorn S-A, Yodthong B. Biodegradable blend nanoparticles of amphiphilic diblock copolymers prepared by nano-precipitation method. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology 2011;2:561-66.
14.Zange R, Li Y,Kissel Ti Biocompatibility testing of ABA triblock copolymers consisting of poly(L-lactic-co-glycolic acid) A blocks attached to a central poly(ethylene oxide) B block under in vitro conditions using different L929 mouse fibroblasts cell culture models. Journal of Controlled Release 1998;56: 249 –258.
15. HU Y, CAO L, GU L, Qing-H, SHEN H, ZHENG T. Preparation and biocompatibility evaluation of poly(D, L-lactide-co-glycine). J Cent South Univ 2012;19: 1517−1521.
16.Manjili HK, Sharafi A, Danafar H, Hosseini M, Ramazani A, Ghasemi MH. Poly (caprolactone)–poly (ethylene glycol)–poly (caprolactone)(PCL–PEG–PCL) nanoparticles: a valuable and efficient system for in vitro and in vivo delivery of curcumin. RSC Advances 2016; 6:14403-14415.
17.Danafar H. Applications of copolymeric nanoparticles in drug delivery systems. Drug Research 2016; 66: 506-519.
18.Danafar H, Manjili HK, Najafi M. Study of copolymer composition on drug loading efficiency of enalapril in polymersomes and cytotoxicity of drug loaded nanoparticles. Pharm Sci 2016; 66:495-504.
19.Feng R, Song Z, Zhai G. Preparation and in vivo pharmacokinetics of curcumin-loaded PCL-PEG-PCL triblock copolymeric nanoparticles. International Journal of Nanomedicine 2012;7: 4089–4098.
20.Wan Y, Gao J, Zhang J, Peng WM, Qiu GF. Biodegradability of conducting chitosan-g-polycaprolactone/polypyrrole conduits. Polym Degrad Stab 2010;95: 1994–2002 .
21.Wang B, Zhang Q. Codelivery of curcumin and doxorubicin by MPEG-PCL results in improved efficacy of systemically administered chemotherapy in mice with lung cancer. International Journal of Nanomedicine 2013;8:3521–3531.
22.McBane JE, Sharifpoor S, Cai KH, Labowc RS, Santerre JP. Biodegradation and in vivo biocompatibility of a degradable,polar/hydrophobic/ionic polyurethane for tissue engineering applications. Biomaterials 2011; 32:6034–6044.
23.Kheiri Manjili H, Sharafi A, Attari E, Danafar H. Pharmacokinetics and in vitro and in vivo delivery of sulforaphane by PCL–PEG–PCL copolymeric-based micelles. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology 2017; doi.org/10.1080/21691401.2017.1282501.

Archive of SID

www.SID.ir