Archive of SID

Original Article

Evaluation of Poly(amidoamine) Dendrimer Surface Modification with Poly(ethylene glycol) on Cytotoxicity Reduction

Farnoush Jafari Iri Sofla[1], Fatemeh Rahbarizadeh[2*], Davoud Ahmadvand[3]

1- Ph.D. Candidate, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, School of Allied Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: Rahbarif@modares.ac.ir

Received: 14/Jul/2014, Accepted: 25/Nov/2014

Abstract

Objective: Generation 5 poly (amidoamine) dendrimers are promising multipotent gene delivery vectors that provide favorable DNA condensation properties; however, their high toxicity limits their applications. Toxicity of PAMAM dendrimers depends on their type, generation and applied dosage in a way that lower generations (lower than G5 dendrimers) and anionic dendrimers have lower toxicity than higher generations and cationic dendrimers. The aim of this study is to evaluate the effect of PEGylation on toxicity of G5 PAMAM dendrimers.

Methods: In this study, to improve their characteristics as gene delivery carriers, G5 PAMAM dendrimers were conjugated to polyethylene glycol molecules (PEG, molecular weight 3500) at three different molar ratios of 10, 20 and 30. Also the number of conjugated PEG chains was quantified using TNBSA and Ellman assays. The effect of different degrees of PEGylation on cytotoxicity and transfection efficiency of modified PAMAM dendrimers toward BT-474 and MCF-10A cell lines were assessed.

Results: Compared to unconjugated, PEG conjugated PAMAM dendrimers had lower in vitro cytotoxicity, particularly at higher PEG to PAMAM molar ratios. Among all prepared PEG-PAMAM dendrimers, G5 PAMAM dendrimers that conjugated to PEG at a molar ratio of 10/1 had the highest in vitro transfection rate in both cell lines.

Conclusion: Our results showed that these PEG-conjugated PAMAM dendrimers possess a great potential for in vitro gene delivery.

Keywords: G5 PAMAM dendrimers, PEG conjugation, Cytotoxicity

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No. 1, Pages: 23-38

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله اصیل

بررسی اثر اصلاح سطحی نانوذرات دندریمری پلی‌آمیدو آمین با پلی‌اتیلن گلیکول بر کاهش سمیت سلولی

فرنوش جعفری ایری سفلی[1]، فاطمه رهبری زاده[2*]، داود احمدوند[3]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس ، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی
Email: Rahbarif@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۳/۰۴/۰۳ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۹/۰۴

چکیده

هدف: دندریمرهای پلی‌آمیدو آمین نسل ۵ ابزارهای انتقال ژن چندمنظوره امیدوارکننده‌ای هستند که ویژگی‌های مطلوب متراکم کردن مولکول‌های DNA را فراهم می‌کنند، هر چند، سمیت آن‌ها کاربردهای آن‌ها را محدود می‌سازد. سمیت دندریمرهای پلی‌آمیدو آمین به دوز کاربردی، شماره نسل و نوع آن بستگی دارد، به نحوی که نسل‌های پایین (پایین‌تر از G5) و انواع آنیونی دندریمرهای پلی‌آمیدو آمین سمیت کمتری را نسبت به نسل‌های بالا و انواع کاتیونی نشان می‌دهد. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر پگیلاسیون بر سمیت دندریمرهای پلی‌آمیدو آمین نسل ۵ است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق برای بهبود بخشیدن به ویژگی‌های این مولکول‌ها به‌عنوان حاملین انتقال ژنی، دندریمرهای پلی‌آمیدو آمین نسل ۵ به مولکول‌های پلی‌اتیلن گلیکول با وزن مولکولی ۳۵۰۰ دالتون) با سه نسبت مولی مختلف ۱۰، ۲۰ و ۳۰ متصل شده است. به‌علاوه تعداد زنجیره‌های اتصال یافته توسط دو آزمون TNBSA و المن تعیین شد. تأثیر این درجات مختلف پگیلاسیون بر سمیت سلولی و کارآیی انتقال ژن دندریمرهای پلی‌آمیدو آمین تغییر یافته، بروی رده‌های سلولی BT-474 و MCF-10A ارزیابی شد.

نتایج: در مقایسه با دندریمرهای پلی‌آمیدو آمین غیر پگیله، دندریمرهای پگیله شده سمیت کمتری در حالت درون شیشه، به‌ویژه در نسبت‌های مولی بالاتر پلی‌اتیلن گلیکول نشان داده‌است. در بین تمام دندریمرهای تولید شده، دندریمرهای پلی‌آمیدو آمین نسل ۵ که به مولکول‌های پلی‌اتیلن گلیکول در نسبت مولی ۱۰/۱ متصل شده توانسته‌است بیشترین انتقال ژن در حالت درون شیشه را در هر دو سلول مورد استفاده در این تحقیق نشان دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد دندریمرهای پلی‌آمیدو آمین کانژوگه شده با پلی‌اتیلن گلیکول دارای پتانسیل قوی برای انتقال ژن در محیط درون شیشه است.

کلیدواژگان: دندریمرهای پلی‌آمیدو آمین نسل ۵، اتصال به پلی‌اتیلن گلیکول، سمیت سلولی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴، صفحات: ۲۳-۳۸

مقدمه

دندریمرهای پلی‌آمیدو آمین [Poly(amidoamine) Dendrimer: PAMAM] برای اولین بار در سال ۱۹۸٤ توسط تومالیا (Tomalia) و همکارانش سنتز و تعیین خصوصیات شد و به‌دنبال آن در سال ۱۹۹۰ به‌صورت تجاری درآمد [۱]. این

www.SID.ir

Archive of SID

پلیمرها، پلیمرهای شاخه‌دار، چند ظرفیتی و همگن از نظر اندازه ذرات است و همین خصوصیات آن‌ها را به عواملی بسیار مناسب برای انتقال ژن و دارو تبدیل نموده است. دو استراتژی اصلی برای ساخت دندریمرها وجود دارد: روش اول که توسط تومالیا ابداع شد روش واگرا (Divergent Method) نام دارد که در آن رشد دندریمرها از یک هسته مرکزی شروع می‌شود و واحدهای منومری با قواعد خاصی به آن‌ها اضافه می‌شود [۲] . روش دوم توسط فریشه (Frechet) ابداع شد و روش همگرا (Convergent Method) نام دارد که ساخت در آن از سطح دندریمر آغاز می‌شود و به سمت یک نقطه فعال درونی پیش می‌رود و منجر به ساخت یک واحد فعال دندرونی می‌شود، سپس برای دستیابی به یک ساختار دندریمر، چندین دندرون با یک هسته فعال بر هم کنش می‌کنند [۳].

پلیمرهای PAMAM می‌تواند با گروه‌های آمین اول سطحشان با گروه‌های فسفات مولکول‌های DNA واکنش دهد [تشکیل دندریپلکس(Dendriplex)] و با گروه‌های آمین سوم درونشان اسفنج پروتونی را شکل دهد و رهایی مولکول DNA از اندوزوم را میسر سازد و به این ترتیب حاملین ژنی مناسبی برای انتقال ژن به درون سلول‌هاست [٤]. به‌منظور کاربردهای زیست پزشکی، میزان سمیت، ایمنی‌زایی، سازگاری زیستی، توزیع زیستی در بافت‌ها، نفوذپذیری مناسب و مقاومت در برابر تجزیه آنزیمی در خون نیز باید کنترل شود. دندریمرها دارای فضای سطحی به شدت متراکم و مرکز تقریباً آزاد است و بنابراین نوع گروه‌های عملگر سطحی در تعیین میزان سمیت پلیمر، به‌خصوص در نسل‌های بالاتر نقش به‌سزایی خواهد داشت. سه نوع گروه عملگر محلول در آب، شامل گروه‌های آب‌دوست کاتیونی، آنیونی و خنثی در سطح دندریمرها می‌تواند وجود داشته باشد. مطالعات گروه‌های مختلف تأیید کرده است که سمیت دندریمرهای PAMAM به میزان کاربرد، شماره نسل و نوع آن وابستگی دارد، به نحوی که نسل‌های پایین (پایین‌تر از G5) و انواع آنیونی دندریمرهای PAMAM سمیت کمتری را نسبت به انواع کاتیونی و نسل‌های بالا نشان می‌دهد. تا به حال روش‌های مختلفی به‌کار گرفته شده است تا گروه‌های آمین اولیه انتهای سطح دندریمرهای PAMAM پوشانده شود تا سمیت سلولی آن‌ها کاهش یابد، به‌عنوان مثال از لوروئیل کلراید (Lauroyl Chloride) (یک اسید چرب زنجیره متوسط) برای اتصال به آمین‌های انتهایی دندریمرهای PAMAM نسل ۲، ۳ و ٤ استفاده شده و مشاهده شده که سمیت این ذرات در مقایسه با ذرات تغییر نیافته PAMAM کاهش یافته و نفوذ پذیری غشایی آن‌ها افزایش یافته است [۵]. همچنین آثار استیلاسیون و پگیلاسیون (PEGylation) بر سمیت سلولی نیز بررسی شده است. هردوی این تغییرات سطح به‌طرز چشمگیری موجب افزایش سازگاری زیستی (Biocompatibility)، کاهش سمیت سلولی و کاهش توانایی انتقال ژن دندریمرها شده است و این دندریمرهای تغییر یافته ظرفیت کمتری برای متراکم کردن DNA در مقایسه با دندریمرهای تغییر نیافته دارد.

مولکول‌های پلی اتیلن گلیکول [Poly(ethylene glycol): PEG] خطی، در آب و اکثر حلال‌های آلی حل می‌شود. طبیعت آب دوست و سمیت کم آن‌ها موجب شده است تا از آن‌ها به‌عنوان عوامل بهبود دهنده ساختار در انتقال داروها استفاده شود. اتصال زنجیره‌های PEG (پگیلاسیون) موجب افزایش حلالیت در آب، کاهش سمیت، کاهش هضم آنزیمی و افزایش نیمه عمر داروهای کوچک مولکول در بدن موجودات زنده می‌شود [٦]. این که پگیلاسیون تا چه حد موجب کاهش بر هم کنش ذرات PAMAM و مولکول‌های DNA می‌شود به طول مولکول‌های PEG و میزان آن‌ها در پوشاندن سطح ذرات PAMAM بستگی دارد. این دو ویژگی باید به‌گونه‌ای تنظیم شود که نه تنها سمیت سلولی این ذرات را کاهش دهد بلکه توانایی آن‌ها برای واکنش با DNA و در نتیجه قابلیت انتقال ژن آن‌ها را تحت تأثیر قرار ندهد [۷].

هدف از انجام این تحقیق اتصال مولکول‌های PEG خطی با وزن مولکولی ۳۵۰۰ دالتون و بررسی اثر اتصال آن در مقادیر مختلف بر سمیت سلولی و میزان انتقال ژن دو رده سلولی

www.SID.ir

Archive of SID

BT-474 (یک رده سلولی سرطانی پستان) و MCF-10 (رده سلول طبیعی پستانی) است.

مواد و روش‌ها

مواد و تجهیزات

رده‌های سلولی BT-474 (رده سلولی سرطان پستان) و رده سلولی MCF-10A (رده سلولی غیرتومورزای پستانی) از شرکت DSMZ کشور آلمان و محلول تجاری نسل ۵ PAMAM از شرکت Sigma (آمریکا) تهیه شد. مولکول ان هیدروکسی سوکسینامید- پلی اتیلن گلیکول- مال ایمید (NHS-PEG-MAL) با وزن مولکولی ۳۵۰۰ دالتون از شرکت JenKem (چین) تهیه شد. کیت آزمون MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl) 2,5- diphenyl tetra zolium bromide] و لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase: LDH) به‌ترتیب از شرکت ایده زیست نوترکیب (ایران) و شرکت Promega (آمریکا) تهیه و کیت سنجش میزان لوسیفراز (Luciferase) نیز از شرکت Promega تهیه شد. محلول TNBSA (2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid) و پودر المن (Ellman) هر دو از شرکت Thermo (آمریکا) تهیه شد.

تعیین تعداد گروه‌های آمین اولیه

مولکول PAMAMای که در این تحقیق استفاده شده است، PAMAM نسل ۵ (G5)، با وزن مولکولی ۲۸۸۲۶ دالتون است. از نظر تئوری در هر مولکول PAMAM ۱۲۸ عدد آمین اولیه وجود دارد. از آن‌جایی که آمین‌های اولیه سطحی در PAMAM گروه‌های عملگر این مولکول است و با مولکول‌های NHS-PEG-MAL واکنش می‌دهد تا مولکول‌های PEG از طریق گروه NHS به گروه آمین در مولکول PAMAM متصل شود، در ابتدا لازم است که تعداد آمین‌های اولیه در سطح هر مولکول PAMAM ارزیابی شود. به این منظور ماده ۲-۴-۶ تری نیترو بنزن سولفونیک اسید (TNBSA) برای این کار انتخاب شد، این ماده با آمین‌های اولیه واکنش می‌دهد و ماده رنگی پیکریل سولفونات را تولید می‌کند (رنگ زرد) و شدت این رنگ نمایانگر تعداد مولکول‌های آمین اولیه در سطح مولکول‌های مورد ارزیابی است. روش کار ارزیابی تعداد آمین‌های سطحی PAMAM به شرح زیر است: ابتدا بافر سدیم تترابورات ۰/۱ مولار با pH، ۸/۵ و بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (حاوی ۰/۱۵ مولار کلرید سدیم) با pH، ۷/۵ تهیه شد. برای رسم منحنی استاندارد تعداد آمین‌های PAMAM ابتدا یک محلول ذخیره ۱ میلی‌گرم/ میلی لیتری از PAMAM در بافر فسفات تهیه و سپس غلظت‌های مختلف PAMAM از صفر تا ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر در تیوب‌های مختلف و در حجم ۲۰۰ میکرولیتر تهیه شد. سپس گلیسین به‌عنوان یک نمونه استاندارد برای اندازه گیری تعداد آمین‌های اولیه PAMAM استفاده شد. گلیسین چون اسیدآمینه‌ای حاوی یک آمین اولیه است، استاندارد مناسبی برای تخمین تعداد آمین‌های اولیه PAMAM است. از مولکول گلیسین نیز مثل مولکول PAMAM رقت‌های سریالی از رقت ۱۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر تا ٤٠ میکروگرم/ میلی‌لیتر تهیه شد، سپس به همه میکروتیوب‌های حاوی گلیسین و PAMAM، ۸۰۰ میکرولیتر بافر سدیم ترا بورات اضافه شد. در آخر از محلول TNBSA مورد نظر یک استوک ۷۵۰ نانومولار تهیه شد و به هرکدام از میکروتیوب‌ها میزان ۲۵ میکرولیتر از آن اضافه شد، سپس تیوب‌ها به‌مدت نیم ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ٤٢٠ نانومتر خوانده شد و با توجه به منحنی استاندارد گلیسین تعداد گروه‌های آمین اولیه PAMAM تعیین شد.

اتصال کوالان PEG به PAMAM و محاسبه تعداد PEGهای متصل شده به مولکول PAMAM از طریق آزمون TNBSA

واکنش اتصال NHS-PEG-MAL و PAMAM در بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (حاوی ۰/۱۵ مولار کلرید سدیم) با pH، ۷/۵ انجام شد. اتصال PEG به PAMAM با سه نسبت

www.SID.ir

Archive of SID

مولی (PEG/PAMAM)، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ انجام شد. بدین منظور مقادیر مورد نیاز از PEG و PAMAM در بافر سدیم فسفات با هم مخلوط می‌شود، بدین‌ترتیب که ابتدا PEG در DMSO (Dimethyl Sulfoxide) حل شد. سپس مقادیر محاسبه شده از آن به نحوی به ذرات PAMAM اضافه شد تا نسبت‌های مولی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ رعایت شود. سپس مخلوط واکنش به‌مدت ۲ ساعت در دمای اطاق و در حال هم خوردن انکوبه شد، تا واکنش PEG و PAMAM صورت گیرد. بعد از انجام واکنش پگیلاسیون نیز واکنش TNBSA برای ذرات پگیله شده انجام شد و از روی شدت جذب در ٤٢٠ نانومتر قبل و بعد از واکنش پگیلاسیون، کاهش جذب در ٤٢٠ نانومتر به‌دلیل کاهش آمین‌های اولیه آزاد PAMAM در اثر اتصال به مولکول‌های PEG تعداد زنجیره‌های PEG متصل شده به نانوذرات PAMAM محاسبه شد.

محاسبه تعداد PEGهای متصل شده به مولکول PAMAM از طریق اندازه‌گیری گروه‌های مال ایمید فعال موجود در انتهای مولکول‌های PEG

تعداد مولکول‌های PEG متصل شده به نانوذرات PAMAM را با توجه به کاهش تعداد آمین‌های آزاد مولکول‌های PAMAM، از طریق اندازه‌گیری گروه‌های مال ایمید انتهای زنجیره PEG نیز می‌توان اندازه‌گیری کرد. زیرا همان‌طور که گفته شد مولکول PEG استفاده شده در این تحقیق NHS-PEG-MAL است که از طریق گروه NHS با آمین اولیه PAMAM پیوند آمیدی برقرار می‌کند و گروه مال ایمید انتهایی آن نیز به‌منظور اتصال مولکول‌های هدف‌گیر پروتئینی نظیر پپتیدها و آنتی‌بادی‌ها قابل استفاده است. برای اندازه‌گیری تعداد گروه‌های مال ایمید از آزمون المن غیرمستقیم (Indirect ELLMAN) استفاده شد. در این روش ابتدا غلظت‌های مشخصی از سیستئین تهیه شد (برای رسم منحنی استاندارد) و نیز از همین غلظت‌ها نیز روی نمونه‌های آزمون که حاوی PAMAM متصل شده به PEG هستند نیز برده شد. (طرز تهیه نمونه‌های استاندارد در جدول ۱ آمده است) گروه‌های سولفیدریل موجود در نمونه‌های آزمون (گروه SH مربوط به مولکول سیستئین) می‌تواند با مال ایمید فعال انتهای مولکول‌های PEG واکنش دهد، بنابراین به تعداد مولکول‌های مال ایمید و در نتیجه به تعداد مولکول‌های PEG از میزان سیستئین موجود در نمونه آزمون کاسته می‌شود.

جدول ۱ غلظت‌های استانداردهای سیستئین آزمون المن

غلظت نهایی	میزان سیستئین (وزن مولکولی= ۱۷۵/٦)	حجم بافر واکنش	استاندارد
۱/۵ میلی‌مولار	۲/٦۳٤ گرم	۱۰ میلی‌لیتر	A
۱/۲۵ میلی‌مولار	۲/۵ میلی‌لیتر استاندارد A	۰/۵میلی‌لیتر	B
۱ میلی‌مولار	۲ میلی‌لیتر استاندارد A	۱ میلی‌لیتر	C
۰/۷۵ میلی‌مولار	۱/۵ میلی‌لیتر استاندارد A	۱/۵ میلی‌لیتر	D
۰/۵ میلی‌مولار	۱ میلی‌لیتر استاندارد A	۲ میلی‌لیتر	E
۰/۲۵ میلی‌مولار	۰/۵میلی‌لیتر استاندارد A	۲/۵میلی‌لیتر	F
۰ میلی‌مولار (استاندارد صفر)	۰ میلی‌لیتر	۳ میلی‌لیتر	G

همان‌طور که گفته شد، ابتدا PAMAM و PEG با سه نسبت مولی ۱۰، ۲۰و ۳۰ در دمای اطاق به‌مدت ۲ ساعت تحت اثر گاز نیتروژن انکوبه شدند. بعد از گذشت ۲ ساعت نانوذرات پگیله شده از فیلترهای آمیکون با حد آستانه ۱۰ کیلودالتون عبور داده شد تا PEGهای متصل نشده به ذرات PAMAM جدا شود. بافری که واکنش المن در آن انجام می‌شود بافر سدیم فسفات ۰/۱ مولار حاوی ۱ میلی‌مولار EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) با pH، ۸

www.SID.ir

Archive of SID

است. طبق جدول ۱ و با حل کردن سیستئین هیدروکلراید منو هیدرات در بافر واکنش یک سری محلول‌های استاندارد با غلظت‌های مشخص سیستئین تهیه شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های استاندارد A تا F هم به لوله‌های استاندارد هم به نمونه‌های آزمون اضافه شد. آن‌چه در بالای فیلتر آمیکون باقی مانده بود (شامل نانوذرات PAMAM متصل شده به PEG) ابتدا به حجم ۲۵۰ میکرولیتر رسانده شد و سپس در لوله‌های آزمون ریخته شد. سپس روی همه نمونه‌های استاندارد ۲/۵ میلی‌لیتر و روی نمونه‌های آزمون ۲/۲۵ میلی‌لیتر از بافر واکنش ریخته شد. (حجم کلی واکنش‌ها ۲/۷۵ میلی‌لیتر است) متعاقب آن ٤ میلی‌گرم پودر المن در یک میلی‌لیتر بافر واکنش حل شد (این محلول به‌صورت تازه تهیه شد). ۵۰ میکرولیتر از محلول تازه تهیه شده المن به همه تیوب‌ها اضافه شد. نمونه‌ها به‌خوبی با هم مخلوط شد و ۱۵ دقیقه در دمای اطاق انکوبه شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ٤۱۲ نانومتر خوانده شد. با توجه به تفاوت جذب نمونه‌ها در لوله استاندارد و آزمون که همان غلظت استاندارد در آن ریخته شده بود تعداد مولکول‌های سیستئین که با گروه مال ایمید واکنش داده‌است محاسبه شد و از روی آن تعداد مولکول‌های PEG متصل شده به هر مولکول PAMAM محاسبه شد.

ارزیابی سمیت دندریمرهای PAMAM در محیط درون شیشه (In vitro) توسط واکنش MTT

به‌منظور بررسی اثر پگیلاسیون دندریمرهای PAMAM بر سمیت سلولی سلول‌های مورد مطالعه در این تحقیق ابتدا سلول‌های BT-474 (رده سلولی سرطان سینه) و MCF-10A (رده سلول نرمال سینه) کشت داده شدند. یک روز قبل از افزودن پلیمرهای PAMAM، تعداد ۲×۱۰^{٤} سلول در پلیت‌های ۹٦ خانه کشت داده شدند. روز بعد ابتدا محیط با ۱۰۰ میکرولیتر محیط خام (بدون سرم و آنتی‌بیوتیک) تعویض شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از پلیمرهای PAMAM غیر پگیله و ۱۰۰ میکرولیتر از پلیمرهای PAMAM پگیله شده با نسبت‌های مولی (PEG/PAMAM)، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ با غلظت‌های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر برای PAMAM روی این سلول‌ها ریخته شد و به‌مدت ٤۸ ساعت در انکوباتور CO_2 دار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. ٤۸ ساعت بعد محیط رویی سلول‌ها خالی شد و به هر چاهک پلیت ۹٦ خانه ۱۰۰ میکرولیتر PBS (Phosphate Buffered Saline) استریل اضافه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر MTT (با غلظت ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌های مورد نظر به‌مدت ٤ ساعت در انکوباتور انکوبه شد. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) اضافه شد و بعد از حل کردن کامل رسوب بنفش رنگ در چاهک‌ها جذب نمونه‌ها توسط دستگاه خوانشگر الایزا و در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. کنترل‌ها شامل یک کنترل برای سنجش سمیت PEG است که در آن بیشترین مقدار PEGای که برای واکنش پگیلاسیون به‌کار رفته بود به تنهایی روی سلول‌ها ریخته شد و دیگری سلول‌های بدون PAMAM هستند که در آن‌ها به جای ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاوی PAMAM، ۱۰۰ میکرولیتر PBS استریل (بافر تهیه نمونه‌های PAMAM) ریخته شد. همه آزمون‌ها به‌صورت سه تایی انجام شد.

بررسی اثر میزان پگیلاسیون بر میزان انتقال ژن

به‌منظور ارزیابی اثر درجات مختلف پگیلاسیون و انتخاب کارآمدترین کمپلکس برای مطالعات بعدی دندریمرهای PAMAM نسل ۵ با ۳ نسبت مولی (PEG/PAMAM)، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ پگیله شد. سپس این پلیمرها با رعایت نسبت فسفات/ DNA آمین دندریمر (Nitrogen to Phosphate ratio: N/P ratio)، ۱۰ با ۱ میکروگرم پلاسمید بیان کننده پروتئین فلورسنت سبز (Green Fluorescent Protein: GFP) (pEGFPN1) ترکیب شد و به‌مدت ۳۰ ثانیه ورتکس (Vortex) و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اطاق انکوبه شد و روی دو رده سلولی BT-474 و MCF-10A در محیط عاری از سرم برده شد. (لازم به ذکر است که در این آزمایش از

www.SID.ir

Archive of SID

ترکیب پلیمرهای PEI و پلاسمید pEGFPN1 با رعایت N/P، ۱۰به‌عنوان کنترل و مقایسه‌ای برای انتقال ژن به درون هر دو رده سلولی استفاده شد.) بعد از گذشت مدت زمان ۵ ساعت محیط کشت با محیط کامل حاوی سرم و آنتی‌بیوتیک تعویض شد و بعد از ٤٨ ساعت میزان بیان پروتئین فلورسنت سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شد و کارآیی انتقال ژن آن‌ها به‌صورت کیفی ارزیابی شد. سپس شمارش سلول‌ها برای حدود ۱۰ میدان میکروسکوپی مختلف از هر چاهک ۹٦ خانه انجام شد و با استفاده از تصاویر این میادین، درصد سلول‌هایی که پروتئین سبز فلورسنت را بیان می‌کردند به‌صورت کمی نیز محاسبه شد.

ارزیابی سمیت پلی‌پلکس‌های PAMAM در محیط درون شیشه توسط ارزیابی میزان آنزیم LDH آزاد شده از سلول

یکی از بهترین راه‌های اندازه‌گیری میزان سمیت پلیمرهای کاتیونی بر رده‌های سلولی اندازه‌گیری میزان آنزیم LDH سیتوپلاسمی به دنبال مواجه شدن سلول‌ها با پلیمرهاست. آنزیم LDH در سیتوپلاسم تمام رده‌های سلولی به میزان مختلفی وجود دارد (بسته به نوع رده سلولی) و اگر سلول‌ها با ماده‌ای سمی مواجه شوند نفوذپذیری غشایشان تغییر می‌کند و این آنزیم از سلول خارج شده و در محیط کشت رها می‌شود. میزان LDH رها شده در محلول رویی بعد از ٤ ساعت مواجهه سلول‌ها با پلیمرهای PAMAM نشان دهنده میزان سمیت پلیمرهای PAMAM برای سلول‌ها است. ابتدا تعداد بهینه سلول‌های BT-474 و MCF-10A به‌منظور کشت ابتدایی در پلیت‌های ۹٦ خانه تعیین شد. به این ترتیب که سلول‌ها با تعداد ۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۲۰۰۰۰ و ۳۰۰۰۰ لیز شدند تا ۱۰۰ درصد LDH آن‌ها آزاد شود و سپس آنزیم رها شده (پس از ترکیب شدن با سوبسترای مورد نظر آن در کیت سنجش آنزیم LDH) در طول موج ٤٩٠ نانومتر اندازه‌گیری شد و در انتها تعدادی از سلول‌ها برای انجام آزمون سمیت سلولی انتخاب شدند که جذب آن‌ها در طول موج ٤٩٠ نانومتر بیشتر از ۱/۵ نباشد. سپس بعد از تعیین تعداد سلول لازم برای هر رده سلولی از این سلول‌ها در پلیت ۹٦ خانه کشت داده شد. پلیمرهای PAMAM و پلیمرهای پگیله شده PAMAM با نسبت مولی۱۰ با یک میکروگرم پلاسمید pEGFPN1 (٤٧٣٣ جفت باز) و با رعایت N/P برابر ۱۰، ۲۰ و ۳۰ ترکیب شد و روی سلول‌های مورد نظر ریخته شد. ۱۰۰ میکرولیتر از پلی‌پلکس‌های PAMAM و PEG-PAMAM روی سلول‌ها ریخته شد. سپس پلیت ٤ ساعت در انکوباتور CO_2 دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از گذشت ٤ ساعت ۵۰ میکرولیتراز محلول رویی همه چاهک‌ها برداشته شد و ۵۰ میکرولیتراز بافر کیت اندازه‌گیری LDH روی آن‌ها ریخته شد. سپس نیم ساعت در دمای اطاق و در تاریکی انکوبه و در انتها با محلول توقف کیت، واکنش متوقف شد و جذب آن‌ها در طول موج ٤٩٢ نانومتر و طول موج زمینه ٦۳۰ نانومتر خوانده شد. تمامی این آزمایش‌ها به‌صورت سه تایی انجام شد.

نتایج

نتیجه میزان PEG متصل شده به PAMAM توسط آزمون TNBSA

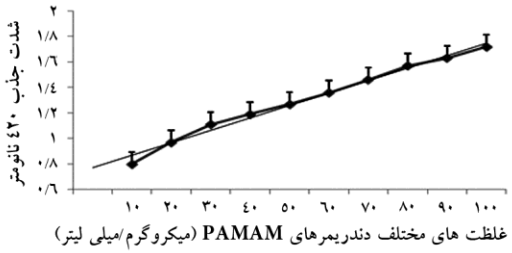
همان‌طور که قبلاً توضیح داده شد از مولکول گلیسین به‌عنوان استاندارد برای تعیین تعداد مولکول‌های آمین اولیه هر ذره PAMAM استفاده شد. نمودار استاندارد PAMAM و گلیسین در شکل ۱ و ۳ شده است. با توجه به محاسباتی که در این قسمت انجام شد تقریباً در سطح هر مولکول PAMAM حدود ۱۰۰ آمین اولیه فعال حضور دارد. ابتدا مشاهده شد که شدت جذب نمونه PAMAM با غلظت ٦۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر معادل شدت جذب نمونه گلیسین با غلظت ۱۵/٦ میکروگرم/ میلی‌لیتر است. (البته در مورد نمونه گلیسین با رسم یک خط عمود از محور xها بر نمودار استاندارد این غلظت

www.SID.ir

Archive of SID

گلیسین به‌دست آمد). ٦٠ میکروگرم از مولکول PAMAM معادل ٢/٠٨ نانومول PAMAM است و ١٥/٦ میکروگرم گلیسین معادل ٢٠٨ نانومول گلیسین است و اگر تعداد کل مولکول‌های گلیسین یا آمین‌های بر تعداد نانومول ذرات PAMAM تقسیم شود عدد ١٠٠ به‌دست می‌آید که نمایانگر حضور حدود ١٠٠ آمین اول در هر مولکول PAMAM است.

سپس میزان ٠/١٤ نانومول از PAMAM با نسبت‌های مولی مختلفی از PEG (١٠، ٢٠ و ٣٠) واکنش داده شد واکنش TNBSA قبل و بعد از انجام واکنش روی این نانوذرات انجام شد و از روی میزان کاهش جذب در طول موج ٤٢٠ نانومتر، تعداد PEGهای متصل شده به سطح هر مولکول PAMAM محاسبه می‌شود. واکنش TNBSA برای مقدار ٠/١٤ نانومول از PAMAM جذبی معادل ٠/٤٩ را در طول موج ٤٢٠نانومتر نشان داد. همان‌طور که در جدول ٢ مشاهده می‌شود در نسبت مولی (PEG/PAMAM)، ١٠ حدود ٨/١٦ زنجیره PEG، در نسبت مولی ٢٠ حدود ١٨/٣٦ زنجیره PEG و در نسبت مولی ٣٠ حدود ٢٨/٥٧ زنجیره PEG به هر مولکول PAMAM متصل شده است. درستی و دقت تمامی این آزمایش‌ها و اندازه‌گیری‌ها با چندین بار تکرار تأیید شد.



شکل ١ منحنی استاندارد PAMAM در PBS با آزمون TNBSA (محور افقی غلظت‌های مختلف PAMAM را برحسب میکروگرم/ میلی‌لیتر نشان می‌دهد و محور عمودی جذب در طول موج ٤٢٠ نانومتر را نشان می‌دهد)

جدول ٢ واکنش TNBSA برای نسبت‌های مولی مختلف PEG/PAMAM

نسبت مولی PEG/PAMAM	طول موج ٤٢٠ نانومتر	تعداد PEG در هر مولکول PAMAM
١٠	٠/٤٥	٨/١٦
٢٠	٠/٤	١٨/٣٦
٣٠	٠/٣٥	٢٦/٥٧

نتایج محاسبه تعداد PEGهای متصل شده به مولکول PAMAM با آزمون المن

با توجه به منحنی استانداردی که از غلظت‌های مختلف سیستئین و از آزمون المن به‌دست آمد تعداد سیستئین‌های کاهش یافته در مورد نمونه‌های آزمون محاسبه می‌شود و از روی تعداد سیستئین‌های کاهش یافته می‌توان تعداد گروه‌های مال ایمید انتهایی مولکول‌های PEG و در نتیجه آن تعداد PEGهای متصل شده به PAMAM را محاسبه کرد.

ابتدا معادل غلظت‌های سیستئینی که برای نمونه‌های استاندارد تهیه شده بود روی نمونه‌های آزمون نیز ریخته شد، سپس محاسبه شد که در هر کدام از این تیوب‌ها چه تعداد مولکول سیستئین و مولکول PAMAM وجود دارد. پس از آن از روی تعداد سیستئین‌های کاهش یافته و تقسیم کردن آن بر تعداد کل مولکول‌های PAMAM موجود، تعداد گروه‌های مال ایمید فعال و بنابراین زنجیره‌های PEG متصل شده به نانوذرات PAMAM محاسبه شد. نتایج آزمون المن غیر مستقیم نشان داد که به‌طور متوسط در هر مولکول PAMAM وقتی با نسبت ١٠/١ پگیله می‌شود حدود ٨/٦٨ گروه مال ایمید حضور دارد یعنی حدود ٨ زنجیره PEG به هرمولکول PAMAM متصل شده است، با نسبت ٢٠/١ پگیلاسیون حدود ١٧ گروه مال ایمید و با نسبت ٣٠/١ پگیلاسیون حدود ٢٣ گروه مال ایمید در هر مولکول PAMAM حضور دارد. غلظتی از سیستئین که آزمون المن غیرمستقیم در آن جواب داد، ٠/٥ تا ١ میلی‌مولار است و در

www.SID.ir

Archive of SID

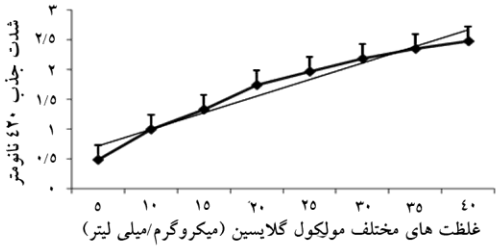
بقیه غلظت‌ها نتایج خوبی مشاهده نشد. نتایج این آزمون کاملاً با آزمون TNBSA مطابقت داشت (جدول ۳).

جدول ۳ غلظت‌های مختلف سیستئین که روی نمونه آزمون ریخته شده و واکنش المن به‌منظور اندازه‌گیری میزان سیستئین کاهش یافته (متصل شده به گروه‌های مال ایمید) است

نمونه‌های آزمون با نسبت‌های پگیلاسیون مختلف شدت جذب در طول موج ٤١٢ نانومتر				شدت جذب در طول موج ٤١٢ نانومتر	استانداردها
نسبت مولی ۳۰	نسبت مولی ۲۰	نسبت مولی ۱۰	استانداردها		
۱/۵	۱/٤۹	۱/٤۹	A	۱/٤۹	A
۱/۳٤	۱/۳۵	۱/۳۵	B	۱/۳٤	B
۱/۰٤	۱/۰۵	۱/۰٦۵	C	۱/۰۸	C
۰/۷۷	۰/۷۸	۰/۷۹	D	۰/۸۱	D
۰/۵۱	۰/۵۲	۰/۵۳	E	۰/۵۵	E
۰/۲۸	۰/۲۹	۰/۲۸	F	۰/۲۸	F

ارزیابی سمیت دندریمرهای PAMAM توسط آزمون MTT

شکل ۳، میزان زنده بودن سلول‌های BT-474 و MCF-1OA را بعد از گذشت ٤۸ ساعت انکوباسیون با دندریمرهای PAMAM و PEG-PAMAM، در ۳ نسبت مولی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌کنید در مورد سلول‌های BT-474 پگیلاسیون در نسبت‌های مولی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ سبب افزایش زنده مانی (Viability) سلول‌ها شده است و این اثر به‌ویژه در غلظت‌های بالای PAMAM یعنی ۸۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر و ۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر بسیار مشهودتر است به‌طوری که PAMAM غیر پگیله در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر سبب مرگ ۵۰ درصد سلول‌ها شده است. پگیلاسیون در نسبت مولی ۲۰ باعث کاهش این میزان به ۳۰ درصد و در نسبت ۳۰ به ۲۷ درصد شده است. در مورد سلول‌های MCF-10A نیز در غلظت‌های بالای PAMAM حدود ۸۲ درصد سلول‌ها زنده‌اند و این در حالی ست که پگیلاسیون در نسبت مولی ۲۰/۱ سبب افزایش زنده ماندن سلول‌ها تا ۹۱ درصد و در نسبت مولی ۳۰/۱ تا ۹٤ درصد شده است. نتایج آزمون MTT روی همه سلول‌ها نشان داد که افزایش میزان پگیلاسیون تا نسبت مولی ۳۰/۱ سبب کاهش سمیت سلولی ذرات PAMAM و افزایش زنده مانی همهٔ سلول‌ها شده است. پس پگیلاسیون در حالتی که نسبت مولی (PEG/PAMAM)، ۳۰ است توانسته است زنده مانی سلول‌ها در برابر PAMAM را از ۵۳ درصد به ۷۳ درصد در سلول‌های BT-474 و ۸۲ درصد به ۹٤ درصد در سلول‌های MCF-10A افزایش دهد. به‌علاوه نشان داده شده است که در تمامی غلظت‌ها و سلول‌هایی که مورد آزمایش قرار گرفته اند زنده مانی بالای ۵۰ درصد است.



شکل ۲ منحنی استاندارد گلیسین در PBS با آزمون TNBSA (محور افقی غلظت‌های مختلف گلیسین را برحسب میکروگرم/ میلی‌لیتر نشان می‌دهد و محور عمودی جذب در طول موج ٤۲۰ نانومتر را نشان می‌دهد)

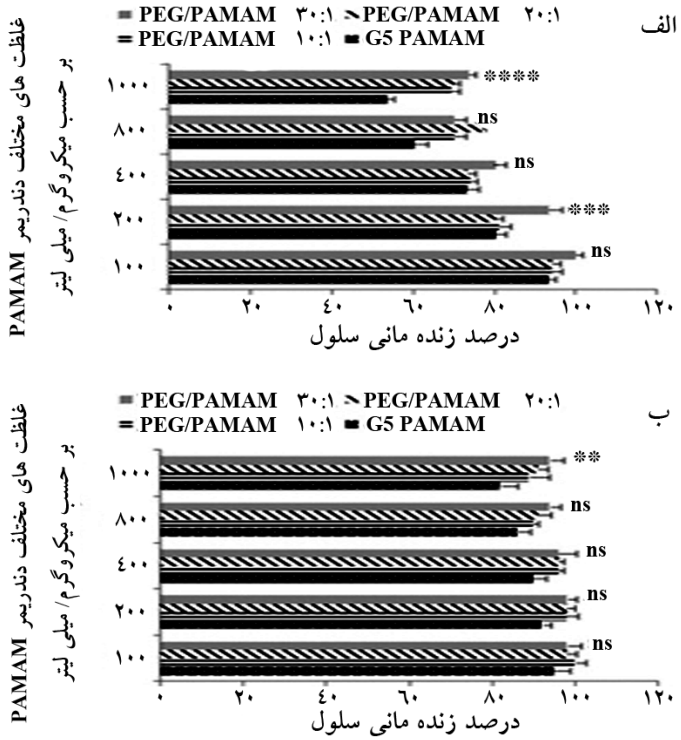
نتایج تأثیر میزان پگیلاسیون بر نرخ ترانسفکشن (Transfection)

همان‌گونه که در شکل ٤ دیده می‌شود و نتایج شمارش سلول‌های بیان کننده پروتئین سبز فلورسنت (Green

www.SID.ir

Archive of SID

Fluorecent Protein) نشان داد، افزایش میزان PEG تا نسبت مولی (PEG/PAMAM) ۳۰ تأثیری در کاهش نرخ ترانسفکشن نگذاشته است (٦ درصد بیان در رده سلولی BT-474 و ۳ درصد بیان در رده سلولی MCF-10A) و می‌توان از نسبت‌های مولی ۲۰ و ۳۰ نیز در کنار PAMAM برای ترانسفکشن سلول‌ها استفاده کرد. ولی در نسبت ۱۰ بیشترین شدت فلورسنت، ۸ درصد و ٤ درصد به‌ترتیب در رده‌های سلولی BT-474 و MCF-10A دیده شد که این موضوع به‌دلیل بار مثبت مولکول PAMAM در حالتی است که به PEG در نسبت مولی ۱۰ متصل شده است. بنابراین در بقیه مراحل تحقیق از نسبت مولی (PEG/PAMAM) ۱۰ برای تهیه ذره پگیله شده استفاده شد. لازم به ذکر است PAMAM به تنهایی موجب بیان ۱۲ درصد و ۵ درصد در رده‌های سلولی BT-474 و MCF-10A شده است. پلی‌پلکس‌های PEI/pEGFPN1 به‌ترتیب پروتئین گزارشگر را به میزان ۲۰ درصد و ۱۰ درصد در رده‌های سلولی BT-474 و MCF-10A بیان کردند.



شکل ۳ درصد زنده مانی سلول‌های الف) BT-474 و ب) MCF-10A در اثر تیمار با غلظت‌های افزایش یابنده PAMAM و PEG/PAMAM تهیه شده با سه نسبت مختلف پگیلاسیون (۱۰/۱، ۲۰/۱ و ۳۰/۱). تمامی این آزمایش‌ها به‌صورت سه تایی انجام شده است. داده‌ها نمایانگر میانگین ± انحراف معیار است. ****،***، ** و ns به‌ترتیب نشان دهنده p<۰/۰۰۱، p<۰/۰۰۱ و p>۰/۰۵ در مقایسه با دندریمرهای تغییر نیافته PAMAM و با غلظت مشابه است.

ارزیابی سمیت دندری‌پلکس‌های PAMAM در محیط درون شیشه توسط ارزیابی میزان آنزیم LDH آزاد شده از سلول

بعد از کشت ابتدایی تعداد ۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۲۰۰۰۰ و ۳۰۰۰۰ سلول در پلیت ۹٦ خانه همه این سلول‌ها لیز شدند تا تمامی LDH موجود در سیتوپلاسم آن‌ها به داخل مایع رویی آزاد شود. جدول ٤ نتایج آزمون LDH برای به‌دست آوردن تعداد بهینه برای کشت ابتدایی را نشان می‌دهد.

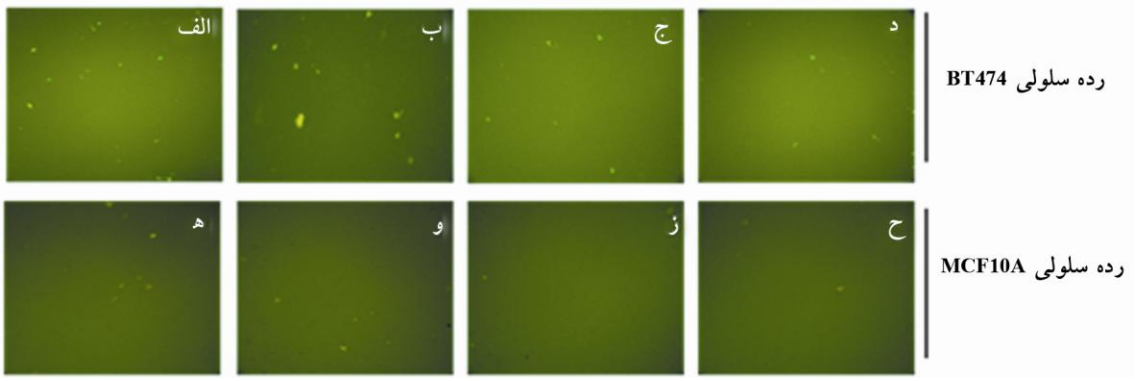
www.SID.ir

Archive of SID

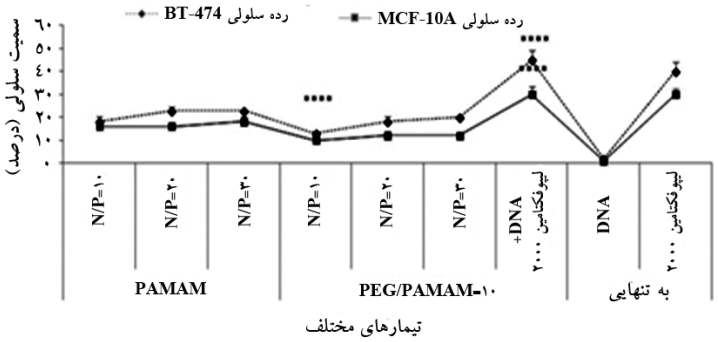
جدول ٤ نتایج آزمون LDH برای تعیین تعداد بهینه سلول لازم برای انجام آزمون سمیت سلولی

تعداد سلول	BT474	MCF10A
۵۰۰۰	۰/۹۷	۰/۵۹
۱۰۰۰۰	۱/۵	۰/۸۸
۲۰۰۰۰	۱/۷۶	۱/٤٦
۳۰۰۰۰	۱/۹	۱/۸۸

با توجه به نتایج فوق بـه‌ترتیـب تعـداد ۱۰۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ سلول برای رده‌های BT-474 و MCF-10A در آزمون سمیت سلولی دندری‌پلکس‌های PAMAM انتخاب و در هر چاهک پلیت ۹٦ خانه کشت داده شد و سپس آزمون سـمیت سـلولی روی این سلول‌ها انجام شد. بدین منظور دندری‌پلکـس‌هـای (PAMAM، PEG-PAMAM) با N/Pهای مختلف (۱۰، ۲۰ و ۳۰) در آب مقطر تهیه شد. (لازم به ذکر اسـت کـه نسـبت مولی PEG/PAMAM در تمامی این دندریمرها ۱۰ است)



شکل ٤ عکس‌های میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های BT-474 و MCF-10A که پروتئین فلورسنت سبز را ٤٨ ساعت بعد از انتقال ژن بیان مـی‌کنـد. الـف و ه) سلول‌های تیمار شده با PAMAM، ب و و) سلول‌های تیمار شده با PEG/PAMAM=۱۰، ج و ز) سلول‌های تیمار شده با PEG/PAMAM=۲۰ و د و ح) سلول‌های تیمار شده با PEG/PAMAM=۳۰ هستند.



شکل ٥ سمیت سلولی دندری پلکس‌های PAMAM (غیر پگیله و پگیله شده با نسبت مولی ۱۰) که توسط اندازه‌گیری میزان LDH سیتوپلاسمی محاسبه شده اسـت. سلول‌ها با DNA و با مولکول‌های لیپوفکتامین ۲۰۰۰ نیز مورد تیمار قرار گرفته‌اند تا سمیت سلولی دندری‌پلکس‌ها با این دو نیز مقایسه شود. **** و * به‌ترتیب نشان دهنده $p<۰/۰۰۰۱$ و $p<۰/۰٥$ در مقایسه با PAMAM تغییر نیافته با N/P مشابه است.

سمیت سلولی نانوذرات به نسبت N/P وابسته است ولـی در بین N/Pهای مختلف و رده‌های سلولی این اختلاف قابـل چشم‌پوشی است. نتایج سنجش سمیت سـلولی نشـان داد کـه درصد سمیت سلولی این ذرات در تمام سلول‌ها بین ۲۰ تا ۳۰

www.SID.ir

Archive of SID

درصد است و اتصال زنجیره‌های PEG کمی باعث کاهش آثار سمیت این ذرات شده است. برای محاسبه درصد سمیت سلولی، سلول‌های یک چاهک را لیز و آن را معادل رهایش ۱۰۰ درصد LDH در نظر می‌گیریم، سپس میزان LDH آزاد شده بقیه چاهک‌ها را تقسیم بر رهایش ۱۰۰ درصد LDH می‌کنیم تا به این طریق میزان سمیت سلولی به‌دست آید. از طرفی سلول‌ها به‌صورت خود به خودی نیز LDH آزاد می‌کنند، پس LDH هر چاهک را از LDH چاهکی که هیچ تیماری روی سلول‌هایش صورت نگرفته کم می‌کنیم. به این ترتیب سلول‌هایی که در معرض غلظت‌های بالاتر PAMAM-DNA قرار گرفته‌اند به‌دلیل سمیت PAMAM نفوذپذیری غشایشان افزایش می‌یابد و LDH بیشتری را از سیتو پلاسم به مایع رویی منتقل می‌کنند.

بحث

یکی از راه‌کارهای مهم در انتقال ژن، به کار بردن حامل‌های ژنی کارآمد و غیر سمی است. ناقل‌های ویروسی در انتقال ژن بسیار مؤثر است ولی ایمنی‌زایی آن‌ها کاربرد آن‌ها را با مشکل مواجه ساخته است. دندریمرهای PAMAM در انتقال ژن به‌عنوان عوامل بسیار مؤثری شناخته شده‌است. برخلاف سایر پلیمرهای کاتیونی که به‌عنوان عوامل ترانسفکشن به‌کار می‌رود (به‌عنوان مثال پلی-ال-لیزین)، اندازه و ساختار دندریمرها به خوبی تعریف شده است. حضور تعداد مشخص گروه‌های آمین اولیه با بار مثبت در سطح دندریمرها یک سطح راحت و قابل دسترس را برای ایجاد تغییرات شیمیایی فراهم کرده است. برخلاف سیستم‌های دیگر انتقال DNA نظیر سیستم‌های لیپیدی و پروتئینی که پاک شدن (Clearance) آن‌ها از خون و ایمنی‌زایی شان جزو معایب‌شان به شمار می‌رود، دندریمرها هم در محیط درون شیشه و هم در بدن موجودات زنده سمیت کمی نشان داده‌است؛ بنابراین دندریمرهای PAMAM حاملین ایده آلی برای طراحی و ساخت یک سیستم انتقال DNA مناسب به شمار می‌رود. البته در بسیاری از مطالعات ذکر شده است که هرچه نسل دندریمرهای PAMAM بالاتر می‌رود سمیت سلولی آن‌ها نیز افزایش می‌یابد. در این تحقیق دندریمرهای PAMAM نسل ۵ که کارآیی انتقال ژن خوبی دارد، به‌عنوان سیستم انتقال ژن بررسی حاضر انتخاب شد. زنجیره‌های پلی اتیلن گلیکول (PEG) به‌دلیل خصوصیاتی نظیر زیست‌سازگاری و آب‌دوستی به پلیمرهای مختلفی نظیر پلی-ال-لیزین (Poly-L-Lysine: PLL) و پلی اتیلن ایمین (Poly ethylene imine: PEI) متصل شده‌است تا خصوصیات فیزیک و شیمیایی این ذرات را بهبود بخشند. اتصال زنجیره‌های PEG سبب کاهش سمیت سلولی این پلی کاتیون‌ها در اثر کاهش و پوشاندن بار مثبت سطحی آن‌ها شده است. به‌علاوه؛ در برخی موارد اتصال به مولکول‌های PEG همچنین سبب افزایش کارآیی انتقال ژن در درون شیشه به‌دلیل افزایش حلالیت ترکیب‌های پلیمر/DNA شده است. همچنین مشاهده شده است که طول زنجیره‌های PEG و نسبت مولی PEG/PAMAM می‌تواند بر ظرفیت انتقال ژن یا دارو اثر بگذارد. مطالعات بسیار کمی روی تأثیر تعداد زنجیرهٔ PEG متصل شده به دندریمرهای PAMAM و اثر آن بر سمیت سلولی و قابلیت انتقال ژن آن‌ها صورت گرفته است. در این تحقیق به‌منظور بررسی اثر پگیلاسیون در نسبت‌های مولی مختلف PEG/PAMAM، از مولکول‌های NHS-PEG_{3500}-MAL استفاده شد. مولکول‌های NHS-PEG_{3500}-MAL با ایجاد شاخه‌های PEG با طول مشخص بر مولکول PAMAM سبب افزایش زیست‌سازگاری می‌شود و از طرفی واکنش گروه NHS این مولکول‌های PEG با آمین‌های اولیه سطحی دندریمرهای PAMAM سبب برقراری اتصال کوالان غیر قابل برگشت بین این دو می‌شود و گروه مال ایمید آزاد انتهایی این زنجیره‌های PEG بعداً نیز می‌تواند استفاده شود تا بتوان مولکول‌های پپتیدی هدف‌گیر (نظیر پپتیدهای نفوذ کننده به سلول‌ها، آنتی بادی‌ها و...) را به سطح دندریمرهای PAMAM به‌منظور اختصاصی کردن ورود آن‌ها به سلول‌ها متصل کرد. دندریمرهای PAMAM نسل ۵ با

www.SID.ir

Archive of SID

مولکول‌های NHS-PEG3500-MAL و با سه نسبت مولی مختلف PEG/PAMAM، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ پگیله شد و سمیت سلولی این ذرات پگیله شده بر رده‌های سلولی BT-474 و MCF-10A اندازه‌گیری شد و با PAMAM غیر پگیله مقایسه شد. مولکول‌های PAMAM در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر سبب مرگ ۵۰ درصد سلول‌های BT474 شده‌است که پگیلاسیون در نسبت مولی ۱۰ و ۲۰ سبب کاهش این مقدار سمیت به میزان ۲۰ درصد شده‌است و در نسبت مولی ۳۰، میزان سمیت ۲۳ درصد کاهش یافته است و در این نسبت پگیلاسیون ۷۳ درصد سلول‌های BT-474 زنده مانده‌اند. در مورد سلول‌های MCF-10A همان‌طور که از نتایج آزمون MTT مشخص است در غلظت‌های بالای PAMAM هنوز ۸۲ درصد سلول‌ها زنده‌اند که این عدد نمایانگر تأثیر کم مولکول‌های PAMAM بر این رده سلولی است ولی با وجود این اثر کم، پگیلاسیون در نسبت مولی ۱۰ باعث افزایش زنده مانی سلول‌ها تا ۸۹ درصد و در نسبت ۲۰ تا ۹۱ درصد و در نسبت ۳۰ تا ۹٤ درصد شده است. تحقیقات بیلینسکا (Bielinska) و همکارانش [۸] در سال ۲۰۰٤ نشان داده است که دندریمرهای PAMAM وقتی به‌صورت تغییر نیافته استفاده می‌شود باعث ایجاد منافذی در غشای سلولی می‌شود و این به‌دلیل تراکم بالای بار در سطح آن‌هاست و تلاش‌های محققین نشان داده است که استیلاسیون و پگیلاسیون سطح دندریمرها باعث افزایش زیست‌سازگاری آن‌ها شده است [٦، ۹، ۱۰]. در این تحقیق پگیلاسیون سبب کاهش تراکم بار سطحی دندریمرهای PAMAM و در نتیجه کاهش سمیت آن‌ها نسبت به دو رده سلولی BT-474 و MCF-10A شده است. غلظت‌هایی از پلیمرهای PAMAM که معمولاً برای انتقال ژن به درون سلول‌ها استفاده می‌شود کمتر از ۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر است و همان‌طور که مشاهده می‌شود حتی در غلظت ۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر هنوز بیشتر از ۷۵ درصد سلول‌های BT-474 و بیشتر از ۹۰ درصد سلول‌های MCF-10A زنده‌اند.

تمامی پلیمرهای کاتیونی در این ویژگی با یکدیگر مشترک هستند که همگی با برهم کنش‌های الکتروستاتیک قابلیت اتصال به DNA را دارند و همین ویژگی آن‌ها را به‌عوامل انتقال ژن مناسبی تبدیل کرده است. جمع شدن (Compaction) مولکول‌های DNA به شکل ساختارهای متراکم نقش مهمی در ورود ماده ژنتیکی به سلول ایفا می‌کند. تغییرات در ساختار مجموعه پلی کاتیون-DNA بر انتقال و بیان ماده ژنتیکی در سلول‌ها تأثیر زیادی می‌گذارد. به‌منظور بررسی آثار اتصال کوالان زنجیره‌های PEG به نانوذرات PAMAM در نسبت‌های مولی مختلف و اثر آن بر میزان انتقال ژن از ذرات PAMAM نسل ۵ پگیله نشده و پگیله شده با ۳ نسبت مولی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ نیز برای انتقال پلاسمید pEGFPN1 (پلاسمید حاوی ژن گزارشگر GFP) به درون دو رده سلولی BT-474 و MCF-10A استفاده شد. همان‌طور که از نتایج کار پیداست، افزایش میزان زنجیره‌های PEG تا نسبت مولی ۳۰ تأثیری در کاهش میزان انتقال ژن نگذاشته است ولی در نسبت ۱۰/۱ بیشترین شدت فلورسنت در هر دو رده سلولی BT-474 و MCF-10A دیده شده که این موضوع به‌دلیل در دسترس بودن بار مثبت بیشتر مولکول‌های PAMMA در هنگامی است که با زنجیره‌های PEG در نسبت مولی ۱۰ کانژوگه شده است و نشانگر و تأیید کننده این مطلب است که دندری‌پلکس‌های PAMAM ورودشان به سلول وابسته به بار سطحی نانوذرات دندریمری است. در سال ۲۰۰۲ لو (Luo) و همکارانش مشاهده کردند که پوشاندن ذرات PAMAM نسل ۵ به میزان ۱۰ درصد با PEG_{3400} سبب افزایش ۲۰ برابر قابلیت انتقال ژن در محیط درون شیشه در مقایسه با محلول تجاری ترانسفکشن دندریمر نسل ٦ (Superfect) شده است [۱۱]. آن‌ها دلیل این افزایش قابلیت انتقال ژن را پایداری فضایی مجموعه‌ها می‌دانند و نیز خاطر نشان کرده‌اند که به خاطر حضور زنجیره‌های PEG جدا شدن مولکول‌های DNA از دندریمرها در داخل سلول نیز راحت‌تر صورت می‌گیرد. در تحقیق حاضر پگیلاسیون منجر به کاهش قدرت انتقال ژن

www.SID.ir

Archive of SID

توسط ذرات PAMAM شد و این احتمالاً به‌دلیل پوشانده شدن بار مثبت نانوذرات دندریمری PAMAM توسط زنجیره‌های PEG و کم شدن قابلیت متراکم کردن DNA توسط آن‌هاست. افزایش اتصال زنجیره‌های PEG بر سطح نانوذرات دندریمری سبب افزایش شعاع آب‌پوشی آن‌ها و بزرگ‌تر شدن اندازه آن‌ها می‌شود و به‌نظر می‌رسد اگر چنانچه تعداد زنجیره‌های PEG اضافه شده به حدی باشد که تنها تعداد کمی از بارهای مثبت سطح دندریمرها پوشیده شود اتصال این زنجیره‌ها باعث کاهش واکنش ذرات با مولکول‌های DNA نخواهد شد بنابراین لازم بود تا بهترین نسبت مولی PEG/PAMAM از نظر تأثیر تعداد زنجیره‌های PEG بر قابلیت انتقال ژن ارزیابی شود. همان‌طور که از نتایج پیداست اضافه شدن ۸ زنجیره PEG در نسبت مولی PEG/PAMAM، ۱۰ بهترین قابلیت انتقال ژن را نسبت به ۲ نسبت ۲۰ و ۳۰ نشان می‌دهد و این بدین معنی است که در این نسبت مولی هنوز مولکول‌های PAMAM قادر است توسط بار مثبت خودشان مولکول‌های DNA را کامل متراکم کند ولی با افزودن زنجیره‌های PEG این قابلیت آن‌ها نیز کاهش یافته است. رونگ (Rong) و همکارانش در سال ۲۰۰۹ از سه نسبت مختلف پگیلاسیون (٤ درصد، ۸ درصد و ۱۵ درصد) به‌منظور پگیلاسیون دندریمرهای PAMAM نسل ۵ و ٦ استفاده کردند تا آثار پگیلاسیون در میزان‌های متفاوت را بر سمیت سلولی و انتقال ژن مورد سنجش قرار دهند [۱۲]. براساس نتایج آن‌ها در بین ذرات پگیله شده، PAMAMهای پگیله شده توسط ۸ درصد PEG بیشترین میزان انتقال ژن را در N/P= ۲۰ در رده سلولی 293A نشان داد. آن‌ها نیز دلیل انتقال ژن کمتر توسط ذرات پگیله شده با ۱۵ درصد PEG در مقایسه با ذرات تغییر نیافته را پوشانده شدن بیش از حد بارهای مثبت سطحی دندریمرهای PAMAM دانسته‌اند و این‌که پوشانده شدن بارهای مثبت سبب سختی اتصال پلی‌پلکس‌ها به غشای سلولی می‌شود. از طرفی؛ ممکن است مولکول‌های PEG موجب در بر گرفتن مولکول‌های DNA شود و رها شدن درون سلولی آن را با مشکل مواجه سازد. در مطالعه دیگری که توسط اوگریس (Ogris) و همکارانش در سال ۲۰۰۱ صورت گرفته است نیز مشاهده شد که افزایش نسبت PEG/PEI تا نسبت ۱۵/۱ در درون شیشه قابلیت انتقال ژنی را کاهش نداده است. آن‌ها نیز گزارش کرده‌اند که هر چه مولکول‌های پلی اتیلن گلیکول کمتر استفاده شود موجب می‌شود که ترانسفکشن سلولی کمتر تحت تأثیر قرار بگیرد [۱۳].

سمیت سلولی دندری‌پلکس‌های PAMAM نیز بر دو رده سلولی BT-474 و MCF-10A سنجیده شد. با این تفاوت که در این آزمایش از کیت سنجش آنزیم LDH سیتوپلاسمی استفاده شد که قادر است میزان آنزیم آزاد شده به داخل محیط کشت سلول‌ها را در برابر صدمه‌ای که در اثر مواجهه سلول‌ها با نانوذرات به غشا وارد می‌شود اندازه بگیرد. تفاوت دیگری که این آزمایش با سنجش سمیت توسط MTT دارد این است که در اینجا غلظت‌های افزایش یابنده PAMAM توسط ترکیب میزان‌های مختلفی از PAMAM با مقدار ثابتی از پلاسمید (یعنی افزایش آمین اولیه PAMAM نسبت به گروه فسفات DNA) تهیه شد و به‌ترتیب N/Pهای مختلفی شامل ۱۰، ۲۰ و ۳۰ در هر دو رده سلولی مورد آزمایش قرار گرفته است. غلظت‌هایی از PAMAM که در این آزمایش استفاده شده است همگی (حتی در بالاترین N/P) کمتر از غلظت ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر PAMAM است که در آزمون MTT استفاده شده است و مشاهده شده که سمیت سلولی دندریمرهای PAMAM وقتی با DNA ترکیب شده‌است در مقایسه با PAMAM تنها، بیشتر شده است (۲۰ درصد سمیت سلولی دندری‌پلکس‌های PAMAM در برابر ۷ درصد سمیت سلولی دندریمرهای PAMAM بر رده سلولی BT-474 و ۱۸ درصد سمیت سلولی دندری‌پلکس‌های PAMAM در برابر ۵ درصد سمیت سلولی دندریمرهای PAMAM بر رده سلولی MCF-10A) و این به‌دلیل فشرده‌تر شدن مولکول‌های PAMAM در هنگامی است که با مولکول‌های DNA ترکیب شده‌است و بنابراین احتمال ورودشان و در نتیجه صدمه

www.SID.ir

Archive of SID

زدنشان به غشا نیز افزایش یافته است. از آن‌جایی که بالاترین قدرت ترانسفکشن مربوط به نانوذره PAMAM پگیله شده با نسبت مولی ۱۰ بود، سمیت این ذره به‌عنوان ذره پگیله شده در ترکیب با DNA سنجیده شد که در هر دو رده سلولی BT-474 و MCF-10A باعث کاهش حدودی ۵ درصد سمیت سلولی شده است که این نتایج با نتایج آزمون MTT کاملاً تطابق دارد و احتمالاً با افزایش میزان پگیلاسیون سمیت سلولی نیز کمتر خواهد شد که به‌دلیل پوشیده شدن بیشتر بار سطحی توسط زنجیره‌های PEG و کمتر شدن قابلیت ورود این پلیمرها به سلول در اثر واکنش کمتر این مولکول‌ها با غشای سلولی است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان نامه دکتری بیوتکنولوژی پزشکی است و با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به طرح تصویب شده دکتر فاطمه رهبری زاده به شماره ۹۰۰۰۶۹۴۳ انجام شده است.

منابع

[1] Svenson S, Tomalia DA. Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field. Adv Drug Deliv Rev 2005; 57(15): 2106-29.

[2] Esfand R, Tomalia DA. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. Drug Discov Today 2001; 6(8): 427-436.

[3] Hawker CJ, Frechet JMJ. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. J Am Chem Soc 1990; 112(21): 7638-47.

[4] Eichman JD, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker JR Jr. The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells. Pharm Sci Technolo Today 2000; 3(7): 232-245.

[5] Jevprasesphant R, Penny J, Attwood D, McKeown NB, D'Emanuele A. Engineering of dendrimer surfaces to enhance transepithelial transport and reduce cytotoxicity. Pharm Res 2003; 20(10): 1543-50.

[6] Kim Y, Klutz AM, Jacobson KA. Systematic investigation of polyamidoamine dendrimers surface-modified with poly(ethylene glycol) for drug delivery applications: synthesis, characterization, and evaluation of cytotoxicity. Bioconjug Chem 2008; 19(8): 1660-72.

[7] Fant K, Esbjörner EK, Jenkins A, Grossel MC, Lincoln P, Nordén B. Effects of PEGylation and acetylation of PAMAM dendrimers on DNA binding, cytotoxicity and in vitro transfection efficiency. Mol Pharm 2010; 7(5): 1734-46.

[8] Hong S, Bielinska AU, Mecke A, Keszler B, Beals JL, Shi X, Balogh L, Orr BG, Baker JR Jr, Banaszak Holl MM. Interaction of poly(amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: hole formation and the relation to transport. Bioconjug Chem 2004; 15(4): 774-82.

[9] Jevprasesphant R, Penny J, Jalal R, Attwood D, McKeown NB, D'Emanuele A. TThe influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. Int J Pharm 2003; 252(1-

www.SID.ir

Archive of SID

2): 263-6.

[10] Kolhatkar RB, Kitchens KM, Swaan PW, Ghandehari H. Surface acetylation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers decreases cytotoxicity while maintaining membrane permeability. Bioconjug Chem 2007; 18(6): 2054-60.

[11] Luo D, Haverstick K, Belcheva N, Han E, Saltzman WM. Poly (ethylene glycol) - conjugated PAMAM dendrimer for biocompatible, high-efficiency DNA delivery. Macromolecules 2002; 3456–62.

[12] Qi R, Gao Y, Tang Y, He RR, Liu TL, He Y, Sun S, Li BY, Li YB, Liu G. PEG-conjugated PAMAM dendrimers mediate efficient intramuscular gene expression. AAPS J 2009; 11(3): 395-405.

[13] Ogris M, Steinlein P, Carotta S, Brunner S, Wagner E. DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression. AAPS PharmSci 2001; 3(3): E21.

www.SID.ir