

مقاله پژوهشی

ساخت نانو حامل‌های پلی‌اتیلن ایمین متصل به هیدروکورتیزون و بررسی خصوصیات آن‌ها به منظور

دستیابی به حامل هدفمند در ژن درمانی

حسین صادقیپور^۱، الهه ثابت^۱، علی ده شهری^{۲*}

۱- گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۲- گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۱۴

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۰/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: امروزه ژن درمانی به عنوان یکی از روش‌های نوین درمان در نظر گرفته شده است. بخصوص بعد از معرفی ایمونوتراپی و روش‌های ویرایش ژن از قبیل CRISPR/Cas9، توجه زیادی به ژن درمانی معطوف شده است. با این وجود، یافتن یک حامل مؤثر با سمیت کم همچنان به عنوان یکی از چالش‌های عمده در برابر محققان، باقی مانده است. از میان حامل‌های غیر ویروسی به کاررفته، پلیمر پلی‌اتیلن ایمین بیش از سایر ترکیبات پلی کاتیونیک مورد مطالعه قرار گرفته است؛ اما با وجود محاسن قابل توجه، سمیت، غیراختصاصی بودن و مداخلات غیرضروری با اجزای سرم، کاربرد وسیع آن را محدود می‌کند. لذا ساختمان آن می‌بایست از طریق کانژوگاسیون‌های شیمیایی اصلاح شود. در این طرح، اتصال مولکول هیدروکورتیزون بر روی این پلیمر به منظور هدفمندسازی آن به درون هسته سلول و تعدیل بار مثبت روی آن انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، یک مولکول پلی‌اتیلن ایمین با هیدروکورتیزون کانژوگه شد و سپس از طریق یک لینکر سوکسینیک اسید به مولکول پلی‌اتیلن ایمین فاقد لیگاند متصل گردید. کانژوگه‌های حاصل از نظر ظرفیت بافری، پتانسیل زتا، سایز ذره‌ای، توانایی حفاظت از DNA در برابر آنزیم و نیز توانایی متراکم کردن DNA مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج نشان داد که این کانژوگه‌ها توانستند DNA پلاسمیدی را به صورت موفقیت آمیزی متراکم کرده و نانوذراتی در ابعاد ۳۰۰ نانومتر ایجاد نمایند. در ضمن، ظرفیت بافری این کانژوگه‌ها از پلیمر اولیه تغییر نیافته بیشتر بود و توانایی بسیار بالایی در محافظت از پلاسمید در برابر آنزیم‌های نوکلئاز از خود نشان دادند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به دست آمده، طراحی و ساخت مشتقات PEI با دو دومین مجزا جهت هدفمندسازی و برهمکنش با پلاسمید می‌تواند به عنوان یک راهبرد مؤثر جهت ایجاد سیستم‌های نانو انتقال ژن در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: پلی‌اتیلن ایمین، هیدروکورتیزون، ژن درمانی هدفمند، نانوذره پلیمریپ

مقدمه

ژن درمانی عرصه‌ای جدید از دانش بشری است که در آن با استفاده از قابلیت‌های دانش مهندسی ژنتیک می‌توان تدبیر درمانی مناسبی را برای شماری از بیماری‌ها ارائه کرد (۱). این روش درمانی بسیار جوان بوده و بیش از سه دهه از به کارگیری آن نمی‌گذرد. ژن درمانی یک اصطلاح کلی است که شامل هرگونه استراتژی، به منظور پیش‌گیری یا درمان یک بیماری وراثتی یا اکتسابی با وارد کردن یک ژن خارجی، قطعات ژنی، DNA یا RNA، یا الیگونوکلوئوتیدها به بافت یا سلول‌های فرد مورد نظر برای جایگزین کردن ژن معیوب، قرار دادن ژن‌های حذف شده، خاموش کردن ژن ناخواسته یا ایجاد یک عملکرد سلولی جدید است (۲-۴). نخستین بار از ژن درمانی برای اصلاح عیوب ژنتیکی که تنها یک ژن دچار نقص بود، استفاده می‌شد (۵) اما در حال حاضر از پروتکل‌های ژن درمانی در آزمایش‌های مرتبط با سرطان، بیماری‌های عفونی، اختلالات نورونی و بیماری‌های قلبی-عروقی استفاده می‌شود (۶، ۷). همچنین ژن درمانی به دلیل غلبه بر

ژن درمانی عرصه‌ای جدید از دانش بشری است که در آن با استفاده از قابلیت‌های دانش مهندسی ژنتیک می‌توان تدبیر درمانی مناسبی را برای شماری از بیماری‌ها ارائه کرد (۱). این روش درمانی بسیار جوان بوده و بیش از سه دهه از به کارگیری آن نمی‌گذرد. ژن درمانی یک اصطلاح کلی است که شامل هرگونه استراتژی، به منظور پیش‌گیری یا درمان یک بیماری وراثتی یا

*نویسنده مسئول: علی ده شهری، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
Email: dehshahria@sums.ac.ir
http://orcid.org/0000-0003-4458-1292

و نیز توانایی تشکیل کمپلکس‌هایی پایدارتر است (۳، ۱۳، ۱۶). لذا می‌توان این پلیمر را برای ژن رسانی به سلول‌ها مدنظر قرار داد. تاکنون انواع مختلفی از کانژوگاسیون‌ها بر روی این پلیمر و پلیمرهای مشابه گزارش شده است که می‌توان به اتصال زنجیره‌های هیدروفوبیک باهدف تعدیل بار الکتریکی روی سطح پلیمر و اصلاح خصوصیات آبدوست-آبگریزی مولکول اشاره کرد (۱۷). همچنین انواع مختلفی از مولکول‌ها از قبیل لیگاند‌های هدفمندساز به‌منظور هدایت نانوذرات پلی‌اتیلن ایمین به بافت‌ها، سلول‌ها یا ارگانل‌های خاص درون سلولی بر روی سطح این پلیمر اتصال یافته‌اند (۱۸) که از این بین می‌توان به فولیک اسید (۲۱-۱۹)، ترانسفرین (۱۴، ۲۲)، لووتیروکسین (۲۳)، تترایدوتیرواستیک اسید (۲۴)، ملیتین (۲۵) و انواع مختلفی از پپتیدها (۳۱-۲۶) اشاره کرد. طی این پژوهش، از هیدروکورتیزون سدیم سوکسینات به‌عنوان لیگاندی برای ژن‌رسانی هدفمند به هسته سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود. حامل سنتز شده طی این پژوهش از دو قسمت تشکیل شده است: بخش اول پلیمر متصل به هیدروکورتیزون همی سوکسینات است که از طریق گروه کربوکسیلیک اسید سوکسینات با تشکیل یک باند آمیدی به آمین نوع اول PEI وصل خواهد شد و قسمت دیگر یک مولکول PEI است. نهایتاً این دو قسمت به کمک یک لینکر چهار کربنه به هم وصل خواهند شد. این اتصال از طریق شکل‌گیری باند آمیدی بین گروه کربوکسیلیک اسید سوکسینات با آمین نوع اول PEI قسمت دوم امکان‌پذیر خواهد بود. در این نانوحامل دوبخشی، PEI قسمت دوم وظیفه متراکم کردن DNA از طریق برقراری مداخلات الکترواستاتیک با پلاسمید را دارد. زنجیره‌ی چهار کربنی رابط بین دو بخش حامل نیز وظیفه‌ی برقراری تعادل هیدروفیلیک-هیدروفوبیک و همچنین متعادل کردن چگالی بار مثبت پلیمر (PEI) را به عهده خواهد داشت. سپس نانوذرات تهیه‌شده ناشی از برهمکنش این کانژوگه با پلاسمید به لحاظ اندازه ذره‌ای، پتانسیل زتا، توانایی متراکم سازی پلاسمید و محافظت از آن در برابر آنزیم‌های مخرب مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

تهیه PEI اتصال یافته به زنجیره‌ی سوکسینیک اسید
ابتدا پلی‌اتیلن‌ایمین با وزن مولکولی ۲۵۰۰۰ Da با سوکسینیک انیدرید وارد واکنش شد تا یک گروه آمینی آن توسط

مشکلات داروهای پروتئینی شامل هزینه بالا، احتمال تحریک سیستم ایمنی، نیمه‌عمر کوتاه و نیاز به استفاده مکرر، توانسته است کاندید مناسبی برای جایگزینی داروهای پروتئینی شود (۸). باوجود اثبات فواید ژن‌درمانی در مدل‌های حیوانی، همچنان مشکل انتقال مواد ژنتیکی به درون سلول، یکی از مهم‌ترین موانع بر سر راه گسترش ژن‌درمانی است (۸، ۹). داروسازی نوین با کمک فناوری نانو امکانی را فراهم نموده است تا مشکل انتقال مواد ژنتیکی به سلول‌ها به کمک نانوذرات حل شود. نانوذرات نیز به‌نوبه خود مدیون خصوصیتی چون ظرفیت بالا برای حمل دارو و ژن، سطح‌فعال بسیار وسیع برای واکنش، کوچکی لازم برای عبور از سطح خونی و قابلیت تجمع در بافت هدف می‌باشند (۱۰). لذا به نظر می‌رسد که گذر از گذرگاه نانوتکنولوژی برای رسیدن به اهداف نهایی ژن رسانی به سلول‌های هدف، الزامی و اجتناب‌ناپذیر است (۱۱). پلیمرهای کاتیونی به‌صورت گسترده برای تهیه نانوذرات حاوی ژن در ژن‌رسانی استفاده می‌شوند (۱۲). اصول کلی شکل‌گیری این کمپلکس‌ها بر اساس واکنش الکتروستاتیک بین بار مثبت پلیمرها و بار منفی مولکول‌های DNA است. این پلیمرها بعد از ترکیب شدن با DNA، کمپلکس‌هایی با سایز نانو تشکیل می‌دهند که پلی‌پلکس نامیده می‌شوند (۱۳). این مداخلات الکتروستاتیک در ساختار پلی‌پلکس از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است چراکه نه‌تنها باعث متراکم شدن DNA می‌شود، بلکه حتی باعث حفظ حالت ریلکس پلی‌پلکس می‌شود که این حالت ریلکس برای آزاد شدن DNA از پلیمر در انتهای ژن‌رسانی ضروری است (۳). نقش اصلی حامل‌های پلیمری، افزایش نیمه‌عمر DNA در جریان خون در برابر آنزیم‌های مختلف است (۱۰، ۱۴). این پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر و محلول در آب، توانایی متراکم کردن DNA و نهایتاً آزاد کردن آن را بعد از تخریب پلیمر خواهند داشت (۳، ۴، ۹، ۱۵). اولین بار پلی‌اتیلن‌ایمین در سال ۱۹۹۵ به‌عنوان نسل دوم پلیمرهای کاتیونی معرفی شد (۱۳). در میان تمام پلیمرهای موجود، این پلیمر به‌عنوان استاندارد طلایی و کارآمدترین پلیمر برای انتقال ژن شناسایی شده است (۱۶). از ویژگی‌های این پلیمر می‌توان به داشتن ایزوفرم‌های متنوع خطی و شاخه‌دار و نیز داشتن تعداد زیادی گروه آمینی غیر پروتئینه در pH فیزیولوژیک بدن اشاره کرد (۳، ۴، ۹، ۱۵). از طرف دیگر مطالعات نشان داده که PEI توانایی حفاظت از DNA در برابر تخریب آنزیمی را نیز دارد که این به دلیل داشتن تراکم بار بیشتر

جداگانه در حداقل مقدار آب مقطر حل گردید. سپس EDC و NHS به میزان ۱/۳ برابر تعداد مول‌های PEI-HYD به محلول PEI-HYD اضافه شد. در انتها محلول PEI-SUC به صورت قطره‌قطره به محلول PEI-HYD که روی استیرر در حال چرخش بود، اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. نهایتاً خالص‌سازی با کمک کیسه دیالیز توسط آب مقطر به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انجام شد. سپس تا ۴۸ ساعت بعد، هر ۲۴ ساعت آب اطراف کیسه دیالیز تعویض شد. در انتها محصول نهایی فریزدرای شد.

تکثیر و خالص‌سازی DNA پلاسمیدی حاوی ژن اینترلوکین-۱۲

• pUMVC3-hIL-12 پلاسمیدی است که کد کننده پروتئین اینترلوکین-۱۲ است (تهیه شده از شرکت آلدورون) و دارای پروموتور سیتالومگالوویروس و ژن مقاومت به کانامایسین است و دارای ۶۲۱۵ جفت باز است. به منظور تکثیر پلاسمید، از سویه باکتری *Escherichia coli* گونه‌ی DH5 α استفاده گردید. ابتدا این باکتری در محیط انتخابی Luria-Bertani (LB) تکثیر گردید. سپس یک میکروتیوپ حاوی ۱ ml از سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ min روی یخ گذاشته و سپس به مدت ۴ دقیقه در ۹۰۰۰ rpm سانترفیوژ شد. مایع رویی جدا شده و به باقیمانده آن ۱ ml کلسیم کلراید ۰.۱M سرد فیلتر شده اضافه شد. سپس میکروتیوپ به مدت ۳۰ دقیقه در ظرف یخ درون یخچال قرار گرفت. به دنبال آن سانترفیوژ به طریق گفته شده، انجام گرفت و پس از جداسازی مایع رویی، ۶۷۰ μ l کلسیم کلراید ۰.۱M سرد به آن افزوده شد و به آرامی مخلوط گردید. عمل قرارگیری در یخچال، سانترفیوژ و جداسازی طبق روش گفته شده انجام گرفت و این بار ۲۰۰ μ l کلسیم کلراید ۰.۱M سرد به آن اضافه شد و ۳۰ دقیقه در یخچال نگهداری گردید. در مرحله بعد پلاسمید به باکتری منتقل شد. بدین ترتیب که ۵ μ l از پلاسمید به میکروتیوپ حاوی باکتری افزوده شد و مخلوط گردید. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در یخچال، به مدت ۹۰ ثانیه در ۴۲°C قرار گرفت و بلافاصله ۳۰ دقیقه در یخچال انکوبه شد. سپس ۱ml محیط LB فاقد آنتی‌بیوتیک به میکروتیوپ فوق اضافه شد و به مدت ۱/۵ ساعت در انکوباتور ۳۷°C نگهداری گردید. پس از آن به مدت ۴ دقیقه در دور ۶۰۰۰ rpm سانترفیوژ شد. ۸۰۰ μ l از مایع رویی جدا و مایع باقی‌مانده با رسوب مخلوط گردید و به پلیت کشت جامد حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین با

سوکسینیک انیدرید کانژوگه شود. بدین منظور مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم از پلی‌اتیلن‌ایمین در ۸/۵ ml آب مقطر حل شد و سپس ۱/۵ ml محلول NaCl در آب به آن اضافه شد. آنگاه pH با استفاده از HCl (1M) به ۵ رسانده شد. سپس درحالی‌که این محلول به کمک استیرر در حال هم‌زدن بود، مقدار ۲ mg از سوکسینیک انیدرید حل شده در DMSO به صورت قطره‌قطره به آن اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق به هم زده شد. در نهایت خالص‌سازی با کمک کیسه دیالیز توسط NaCl (3M) به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق انجام شد. سپس آب مقطر جایگزین محلول اطراف کیسه دیالیز شد و تا ۴۸ ساعت بعد، هر ۲۴ ساعت آب اطراف کیسه دیالیز تعویض گردید. در انتها محصول نهایی فریزدرای گردید. محصول این مرحله به نام PEI-SUC نام‌گذاری شد.

تهیه PEI اتصال یافته به هیدروکورتیزون

قسمت دوم یک مولکول پلی‌اتیلن‌ایمین است که با هیدروکورتیزون سدیم سوکسینات کانژوگه می‌شود. کانژوگه شدن این دو، از طریق برقراری پیوند آمیدی بین آمین نوع اول پلی‌اتیلن‌ایمین با گروه کربوکسیل سوکسینات هیدروکورتیزون، امکان‌پذیر خواهد بود. بدین منظور ابتدا ۵۰۰ میلی‌گرم از پلی‌اتیلن‌ایمین در ۳ ml آب مقطر حل شد. سپس مقدار ۳۷ mg از ۱-اتیل-۳-(۳-دی‌متیل آمینوپروپیل) کربودی‌ایمید (EDC) در ۱ ml آب مقطر حل شد و به صورت قطره‌قطره به محلول PEI که روی استیرر در حال چرخش بود، اضافه گردید. بعد ۱۸/۵ mg از آن هیدروکسی سوکسینیمید (NHS) در ۱ ml آب مقطر حل شد و به طریق گفته شده به محلول PEI اضافه گردید. در مرحله‌ی بعد مقدار ۷۰ mg از هیدروکورتیزون سدیم سوکسینات در ۲ ml آب حل شد و به صورت قطره‌قطره به محلول PEI-EDC-NHS اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق به کمک استیرر در حال چرخش بود. در نهایت خالص‌سازی با کمک کیسه دیالیز توسط آب مقطر به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق انجام شد. سپس تا ۴۸ ساعت بعد، هر ۲۴ ساعت آب اطراف کیسه دیالیز تعویض شد. در انتها محصول نهایی فریزدرای شد. محصول این مرحله به نام PEI-HYD نام‌گذاری شد.

اتصال دو بخش سنتز شده به یکدیگر

مرحله‌ی نهایی در سنتز حامل، افزودن دو بخش سنتز شده به هم است (اتصال PEI-HYD و PEI-SUC به یکدیگر). بدین منظور ابتدا مقدار ۲۰۰ mg از هر بخش وزن شد و به صورت

بررسی توانایی متراکم کردن DNA توسط پلیمر با استفاده از روش آنالیز تأخیر ژل

ابتدا ژل آگاروز ۱٪ تهیه شد. بدین منظور ابتدا ۰/۳ گرم از پودر آگاروز در ۳۰ ml بافر (1X) TBE مخلوط شد و پس از ماکروویو شدن آن، محلول شفاف حاصل شده در قالب ساخت ژل ریخته شد و پس از انجماد، ژل در میان دو حفره دستگاه الکتروفورز قرار گرفت. سپس نمونه‌های مختلف، از پلی‌پلکس‌های حاوی پلیمر تغییرنیافته و پلیمرهای سنتز شده در C/P مختلف همراه با Loading dye با نسبت ۱:۶ در داخل ژل تزریق شد. الکتروفورز در ولتاژ ۱۰۰ میلی ولت به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت و ژل حاصل به کمک دستگاه gel doc مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی ظرفیت بافری پلیمر

ابتدا محلول 0.4 mg/ml از پلیمر در آب دیونیزه تهیه شد و pH آن اندازه‌گیری و ثبت شد. سپس pH با کمک (1N) NaOH به ۱۲ رسانده شد و هر بار با افزودن ۳ میکرولیتر اسید HCl (1N) به تدریج تیتراژ شد. این روند تا رسیدن به pH کمتر از ۲/۵ ادامه یافت. در نهایت نمودارهای مربوطه به صورت pH بر حسب اسید افزوده شده، رسم گردید. در این آزمایش، آب به عنوان کنترل منفی و پلی‌اتیلن‌ایمین تغییرنیافته به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

بررسی اثر محافظتی نانو ذرات از پلاسמיד در برابر DNase I

استوک آنزیم با غلظت 2 U/μl، توسط digestive buffer با نسبت ۱:۱ رقیق شد. استوک بافر 10x است و رقیق‌سازی توسط آب دیونیزه انجام گرفت. استوک EDTA با غلظت 50 mM با نسبت ۱:۱ با آب دیونیزه رقیق شد تا EDTA با غلظت 25 mM به دست آمده آید. برای تهیه استوک (1% w/v) SDS در سدیم هیدروکسید ۱ نرمال با pH=7.2 ابتدا ۱ گرم NaOH در ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس pH محلول حاصل به ۷/۲ رسانده شد. سپس ۰/۲ گرم پودر SDS در ۲۰ سی‌سی از محلول سدیم هیدروکسید ساخته شده، حل شد.

ترتیب انجام مراحل این آزمون به شرح زیر است: ابتدا در همه‌ی اپندروف‌ها، مقدار یکسان (5 μl) پلاسמיד ریخته شد. سپس به همه‌ی اپندروف‌ها، مقدار یکسان (6 μl) آب دیونیزه اضافه شد. طبق محاسبات بر اساس C/P‌های مختلف، مقدار لازم از PEI یا پلیمر سنتز شده به اپندروف‌ها اضافه شد. سپس در

غلظت 50 μg/ml انتقال داده شد. در طول شب در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفت تا اولین کلونی مشاهده شد. در این مرحله، تک کلونی برداشته و به محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت 50 μg/ml اضافه شد و به مدت ۱۲ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷°C دما گذاری گردید. سپس محیط استارتر به 500ml محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک اضافه شد. پس از ۱۲ ساعت انکوبه شدن در ۳۷°C، سلول‌ها در دور ۶۰۰۰ سانترفیوژ شده و توسط بافر P1 و P2 کیت QIAGEN لیز شدند. با افزودن بافر P3، پروتئین‌ها و بقایای سلولی رسوب داده و توسط کارتریج جدا گردید. جداسازی پلاسמיד تکثیر شده توسط QIAGEN-tip انجام گرفت. با افزودن بافر QF، پلاسמיד از تیپ جدا و توسط ایزوپروپانول، DNA رسوب داده شد. تمامی جزئیات استخراج و خالص‌سازی مطابق با دستورالعمل‌های کیت QIAGEN صورت گرفت.

تشکیل کمپلکس پلیمر-DNA (پلی‌پلکس)

پلیمرها به‌طور جداگانه در بافر HBG (۲۰ میلی مولار HEPES در محلول ۵٪ گلوکز) حل شد و غلظت 1mg/ml از آن‌ها تهیه شد. سپس پلیمرها با نسبت مشخص به محلول پلاسמיד در همان حلال اضافه شد و پس از مخلوط شدن، ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پلی‌پلکس‌ها با C/P ratio (نسبت وزنی) تعریف می‌شوند که بیانگر نسبت وزنی حامل به پلاسמיד است.

بررسی توانایی متراکم کردن DNA توسط پلیمر با استفاده از روش اتیدیوم بروماید

اتیدیوم بروماید یک عامل درج شونده در اسیدهای نوکلئیک است که با DNA مداخلات قوی و اختصاصی برقرار می‌کند و از خود نور فلورسانس منتشر می‌کند (برانگیخته شدن در 510nm و نشر در 590nm). هر چه توانایی پلیمر در متراکم کردن DNA بیشتر باشد، اتیدیوم بروماید بیشتری از DNA جدا و فلورسانس کمتری منتشر می‌کند. غلظت ۱ mg/ml از پلیمر و پلاسמיד در HBG به‌صورت جداگانه تهیه شد. پلاسמיד به محلول 0.4 μg/ml اتیدیوم بروماید در HBG اضافه شد به صورتی که غلظت پلاسמיד 40 μg/ml شد. سپس شدت فلورسانس اندازه‌گیری گردید و به‌عنوان تراکم صفر در نظر گرفته شد. سپس به تدریج ۲۰ μl از استوک پلیمر به محلول فوق اضافه گردید و هر بار شدت فلورسانس اندازه‌گیری شد و کاهش در شدت فلورسانس به‌عنوان معیاری از میزان واکنش پلیمر با پلاسמיד منظور گردید.

بررسی اندازه‌ی ذره‌ای و چگالی بار سطحی در پلی‌پلکس‌ها

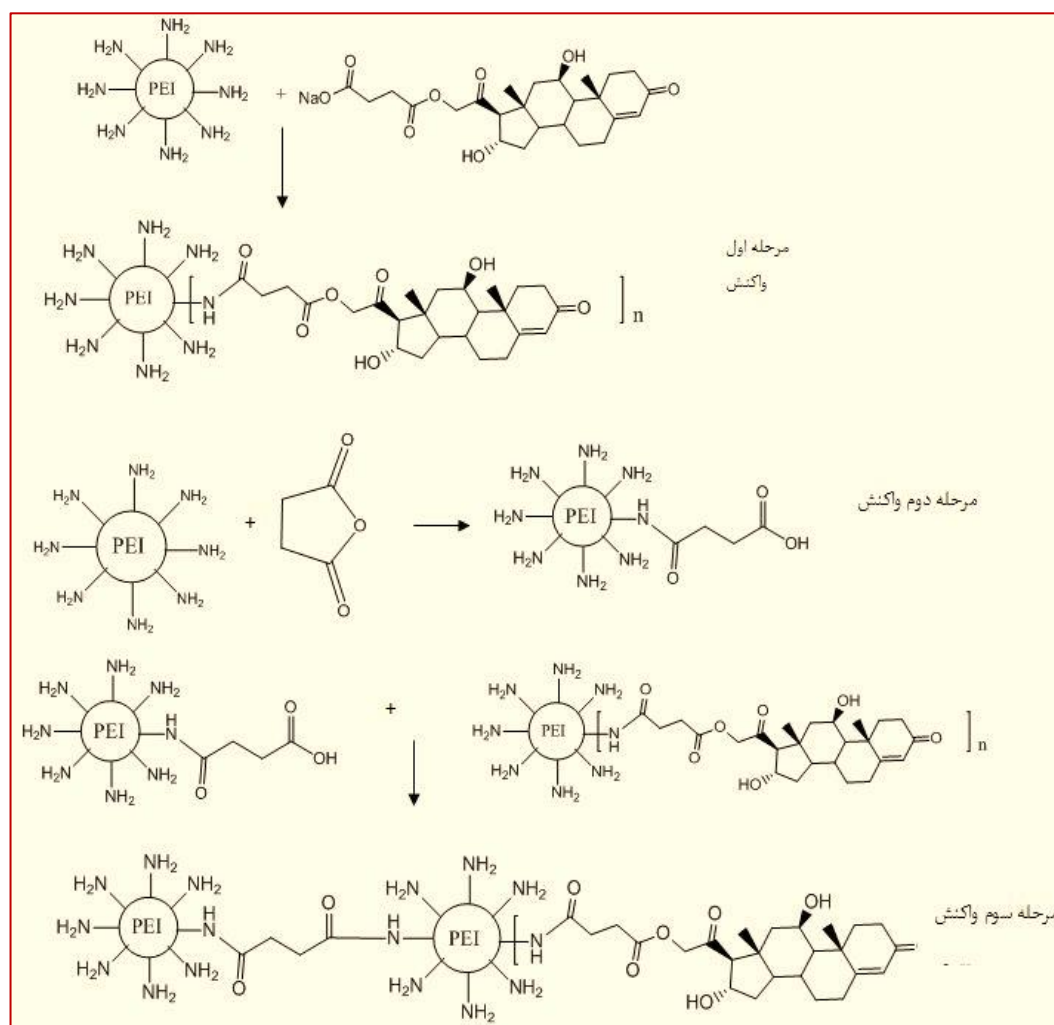
متوسط اندازه ذره‌ای هیدرودینامیک پلی‌پلکس‌ها توسط Laser Doppler Velocimetry و Dynamic Light Scattering و چگالی بار سطحی توسط Malvern nano zetasizer و DTS software در محیط بدون نمک با pH=7.2 اندازه‌گیری شد.

نتایج

تهیه مشتقات پلی‌اتیلن ایمین

مشتق پلیمری PEI بر مبنای اتصال یک مولکول پلیمر به سوکسینیک انیدرید و مولکول دوم به هیدروکورتیزون انجام پذیرفت. سپس این دو بخش به هم اتصال یافته و مشتق PEI-

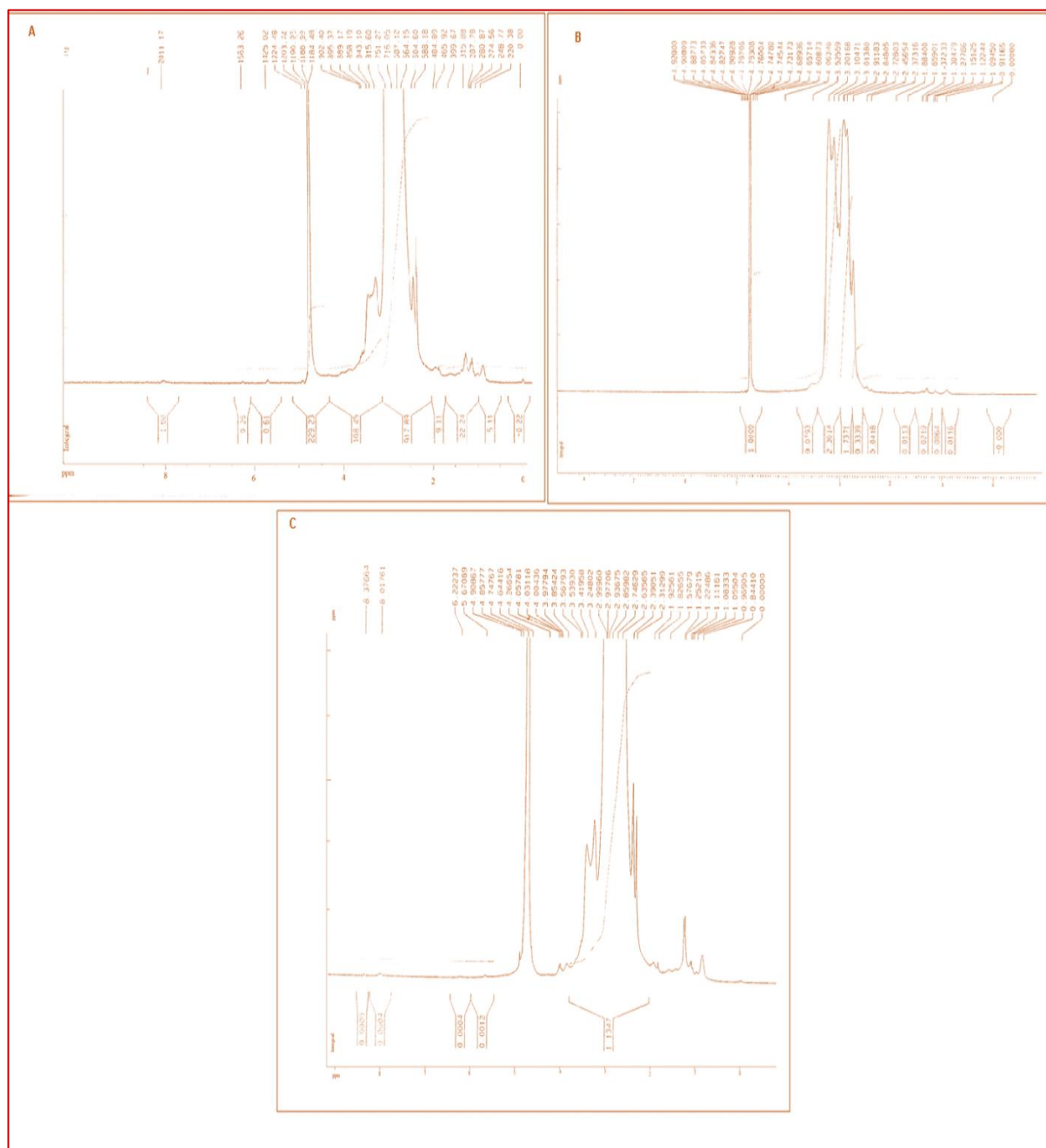
اپندروف‌های فاقد آنزیم، مقدار 10 µl آب دیونیزه اضافه شد. به اپندروف‌های حاوی آنزیم، مقدار 10 µl آنزیم رقیق‌شده با بافر 1X اضافه شد. سپس تمامی اپندروف‌ها در دمای 37 °C به مدت 30 دقیقه انکوبه شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، مقدار 3 µl از EDTA با غلظت 25 mM به تمام اپندروف‌ها اضافه شد. سپس اپندروف‌ها به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. به تمام اپندروف‌ها مقدار 60 µl از 1% SDS اضافه شد. تمامی اپندروف‌ها به مدت 2 ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس Loading dye با محتوای هر اپندروف با نسبت 1:6 به‌طور جداگانه مخلوط گردید و نمونه‌ها به ژل آگاروز 1% تزریق شدند. در انتها الکتروفورز در ولتاژ 100 میلی‌ولت به مدت 30 دقیقه انجام گرفت. نهایتاً ژل حاصل با دستگاه gel doc بررسی گردید.



شکل ۱. واکنش سه مرحله‌ای تهیه کانژوگه‌های مبتنی بر پلی‌اتیلن ایمین. در مرحله اول، هیدروکورتیزون به یک مولکول پلی‌اتیلن ایمین وصل شد. در مرحله دوم، یک مولکول پلی‌اتیلن ایمین دیگر با سوکسینیک انیدرید واکنش داده شد. در مرحله سوم این دو جزء به هم اتصال یافتند.

بررسی توانایی متراکم کردن DNA توسط پلیمر با استفاده از روش اتیدیوم بروماید و روش آنالیز تأخیر ژل از آنجایی که رنگ اتیدیوم بروماید توانایی برقراری اتصالات قوی با مارپیچ‌های حلقوی DNA را دارد، به عنوان یک عامل کمپلکس کننده، مداخلات قوی و اختصاصی با پلاسمید برقرار می‌کند و از

H- NMR SUC-PEI-HYD تهیه گردید (شکل ۱). با مطالعه طیف‌های H- NMR به دست آمده از مشتقات تهیه شده، درصد کانژوگاسیون هیدروکورتیزون روی بخش اول، برابر با ۰/۶۳٪ و درصد کانژوگاسیون سوکسینیک اسید روی بخش دوم برابر با ۰/۲۵٪ تعیین گردید. در نهایت درصد اتصال بخش اول به بخش دوم برابر با ۰/۵۷٪ تعیین گردید (شکل ۲).



شکل ۲. شکل طیف H-NMR تهیه شده از پلی اتیلن ایمین متصل به هیدروکورتیزون (A)، پلی اتیلن ایمین متصل به سوکسینیک اسید (B) و محصول نهایی حاصل از کانژوگاسیون دو بخش تهیه شده در مراحل قبل (C).

بررسی ظرفیت بافری پلیمرها

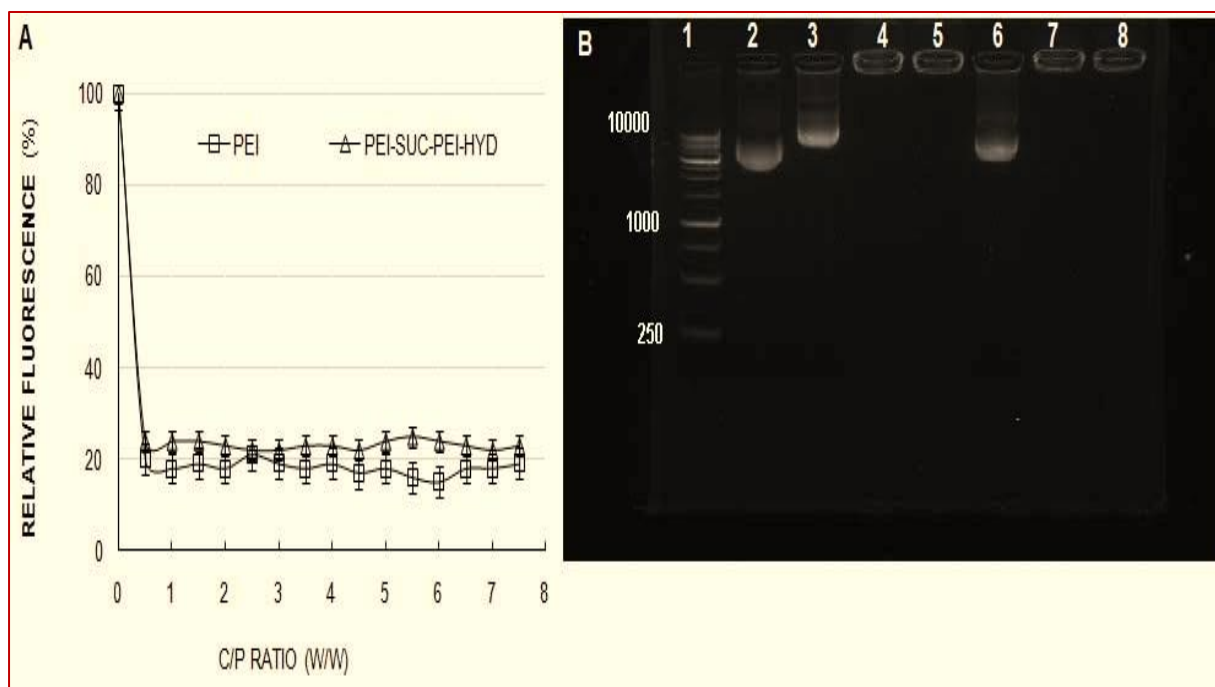
شکل 4A ظرفیت بافری پلیمر سنتز شده را در برابر PEI (کنترل مثبت) و آب (کنترل منفی) نشان می‌دهد. همان‌طوری که مشخص است ظرفیت بافری پلیمر سنتز شده به‌طور قابل چشمگیری بیشتر از PEI است. به‌خصوص در pH بحرانی endolysosome که بین ۵-۷ در نظر گرفته می‌شود، ظرفیت بافری حامل سنتز شده به‌طور چشمگیری بیشتر از پلی‌اتیلن‌ایمین تغییر نیافته است.

بررسی اثر حفاظتی نانوذرات از پلاسמיד در برابر DNase I

در این تست C/P های ۰/۵، ۴ و ۸ از PEI و پلیمر سنتز شده بررسی شدند. همان‌طوری که در شکل 4B هم مشخص است در کمترین نسبت C/P، نه PEI و نه پلیمر توانایی حفاظت از پلاسמיד را نداشتند. در C/P=4، PEI تغییر نیافته بیشتر از پلیمر سنتز شده، توانایی حفاظت از DNA را داشته است؛ باین‌وجود پلیمر سنتز شده هم تا حد قابل قبولی توانایی حفاظت از پلاسמיד را داشته است؛ اما در C/P=8، هر دو به نسبت مشابهی توانایی حفاظت از DNA را داشتند و از تخریب آن جلوگیری کردند. عدم تخریب پلاسמיד در چاهک‌های فاقد آنزیم،

خود نور فلورسانس منتشر می‌کند. طبیعتاً هر چه توانایی پلیمر در متراکم کردن پلاسמיד بیشتر باشد، رنگ بیشتری را از DNA جدا می‌کند و شدت فلورسانس منتشرشده، کاهش می‌یابد. شکل 3A نشان می‌دهد که پلیمر جدید سنتز شده حدوداً ۸۰٪ توانسته پلاسמיד را متراکم کند؛ درحالی‌که پلی‌اتیلن‌ایمین تغییر نیافته حدوداً ۷۵٪ توانسته پلاسמיד را متراکم کند. این مطالعه نشان می‌دهد که در کمترین نسبت پلیمر به پلاسמיד یعنی نسبت ۰/۵، همچنان توانایی اتصال بین پلیمر و پلاسמיד برقرار مانده است. در نسبت‌های بالاتر، توانایی متراکم کردن پلاسמיד ثابت باقی مانده است.

همان‌طوری که در شکل 3B مشخص است حامل سنتز شده همانند پلی‌اتیلن‌ایمین تغییر نیافته توانایی متراکم کردن پلاسמיד را داشته است. البته در C/P=۰/۵، هم PEI و هم حامل سنتز شده نتوانستند کاملاً پلاسמיד را متراکم و حفظ کنند که در نتیجه حرکت DNA روی ژل قابل‌رؤیت است؛ اما در C/P های ۴ و ۸ هم PEI و هم حامل سنتز شده کاملاً نتوانستند پلاسמיד را متراکم کنند. باز شدن Ladder در چاهک اول نشان‌دهنده‌ی درستی انجام پروسه و حرکت پلاسמיד در چاهک دوم نشانه‌ی سالم بودن پلاسמיד به کار رفته است.



شکل ۳ (A)، بررسی توانایی پلیمر اولیه و مشتق سنتز شده در متراکم کردن پلاسמיד به کمک اتیدیوم بروماید و (B)، آنالیز تأخیر ژل بررسی گردید (این مطالعه در بافر HBG انجام شد). باندهای تشکیل‌شده روی شکل B به ترتیب از چپ به راست عبارت‌اند از: باند ۱: نشانگر مولکولی DNA، باند ۲: پلاسמיד به‌تنهایی، باند ۳: پلیمر اولیه در C/P=۰/۵، باند ۴: پلیمر اولیه در C/P=۴، باند ۵: پلیمر اولیه در C/P=۸، باند ۶: پلیمر تغییر یافته در C/P=۰/۵، باند ۷: پلیمر تغییر یافته در C/P=۴، باند ۸: تغییر یافته در C/P=۸.

PEI اولیه در برهمکنش با پلاسمید موجب تشکیل نانوذراتی در حدود ۷۵ نانومتر شد در حالی که مشتق سنتز شده، باعث تشکیل نانوذراتی با ابعاد حدود ۳۰۰ نانومتر گردید. ارزیابی چگالی بار سطحی ذرات نیز نشان داد که PEI اولیه، نانوذراتی با پتانسیل زتای حدود ۳۵ میلی ولت ایجاد کرد و مشتقات سنتز شده PEI پتانسیل زتایی در همان محدوده (حدود ۳۰ میلی ولت) ایجاد کردند.

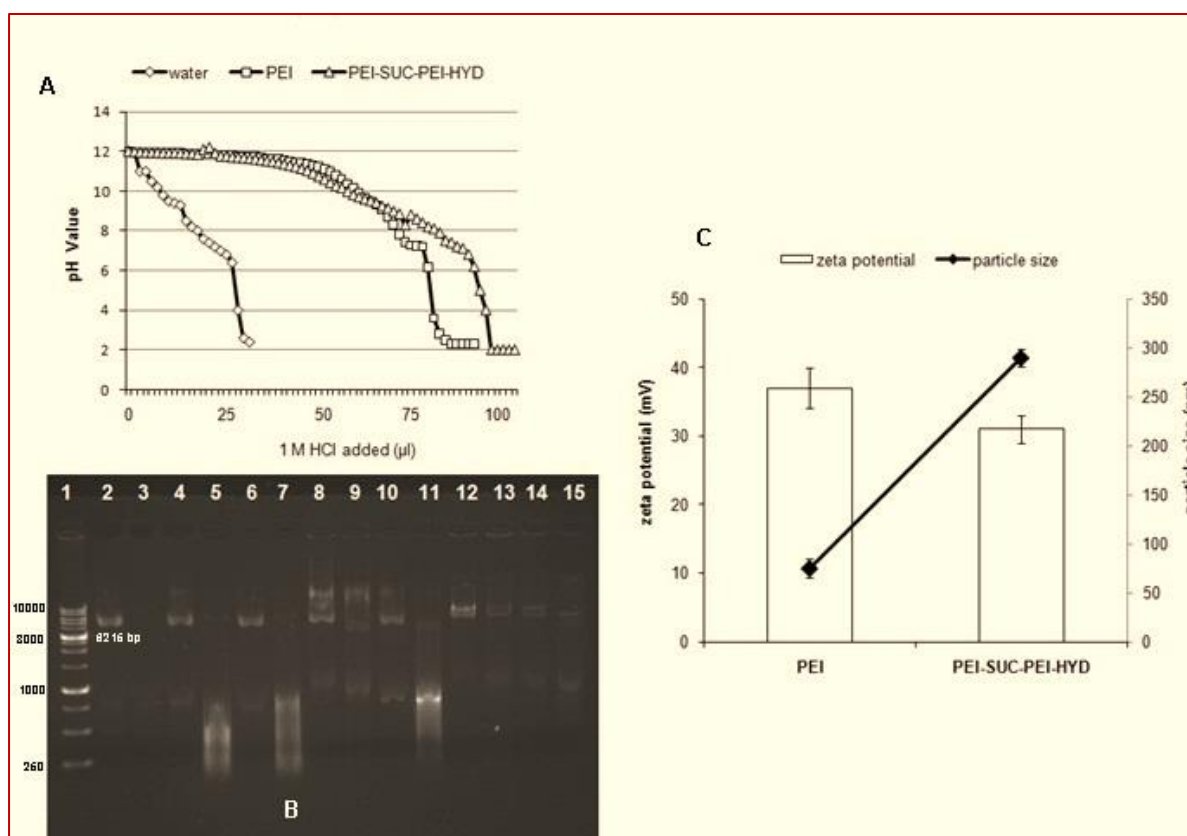
بحث

علی‌رغم اثبات فواید ژن‌درمانی در مدل‌های حیوانی، همچنان مشکل انتقال مواد ژنتیکی به درون سلول، یکی از

نشان‌می‌دهد که تنها عامل تخریب پلاسمید آنزیم موجود در چاهک‌ها است. باز شدن باندهای Ladder در چاهک اول نشانه‌ی درستی انجام فرآیند و حرکت پلاسمید در چاهک دوم نشانه‌ی سالم بودن پلاسمید و توانایی حرکت آن در میدان الکتریکی ایجاد‌ی توسط دستگاه الکتروفورز است. تخریب پلاسمید در چاهک سوم نشانه‌ی سالم و فعال بودن آنزیم است.

بررسی اندازه ذره‌ای و چگالی بار سطحی در پلی‌پلکس‌ها

مطالعه اندازه ذره‌ای نانوحامل‌های تهیه‌شده و پتانسیل زتای آن‌ها نشان داد که ذرات شکل‌گرفته توسط پلیمرهای تغییر یافته نسبت به پلیمر اولیه بزرگ‌تر هستند (شکل ۴C). به‌نحوی که



شکل ۴. (A) ارزیابی ظرفیت بافری پلیمر اولیه و مشتق سنتز شده با کمک تیتراسیون اسید و باز. این مطالعه با افزودن سدیم هیدروکساید ۱ نرمال رساندن pH به ۱۲ آغاز شد. سپس اسید کلریدریک ۱ نرمال به آن افزوده شد. آب به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. (B). توانایی محافظت از پلاسمید متعاقب تیمار نانوذرات با آنزیم DNase به‌عنوان آنزیم مدل از طریق ژل الکتروفورز باند ۱ نشانگر مولکولی DNA، باند ۲ پلاسمید به‌تنهایی، باند ۳ پلاسمید تیمار شده با آنزیم، باندهای ۴ و ۶ و ۸ نانوذرات حاصل از کمپلکس پلیمر اولیه و پلاسمید در نسبت‌های ۰/۵ و ۴ و ۸ (به ترتیب) بدون تیمار با آنزیم، باندهای ۵ و ۷ و ۹: نانوذرات حاصل از کمپلکس پلیمر اولیه و پلاسمید در نسبت‌های ۰/۵ و ۴ و ۸ (به ترتیب) پس از تیمار با آنزیم، باندهای ۱۰ و ۱۲ و ۱۴ نانوذرات حاصل از کمپلکس پلیمر تغییر یافته و پلاسمید در نسبت‌های ۰/۵ و ۴ و ۸ (به ترتیب) بدون تیمار با آنزیم، باندهای ۱۱ و ۱۳ و ۱۵ نانوذرات حاصل از کمپلکس پلیمر تغییر یافته و پلاسمید در نسبت‌های ۰/۵ و ۴ و ۸ (به ترتیب) پس از تیمار با آنزیم. (C) ارزیابی اندازه نانوذرات و پتانسیل زتای آن‌ها به کمک دستگاه زتاسایزر. این مطالعه در $C/P=8$ در بافر HBG انجام شد.

چالش برانگیزترین موانع موجود بر سر راه گسترش ژن درمانی است (۹، ۱۰، ۳۲-۳۴). از جمله مهم‌ترین موانع موجود در این مسیر، یافتن ابزاری مناسب برای انتقال ماده ژنتیکی از سدهای گوناگون موجود در بدن از قبیل فیلتراسیون کلیوی، جذب توسط سلول‌های فاگوسیت کننده، تجمع با پروتئین‌های سرم، تخریب آنزیمی توسط آنزیم‌های نوکلئاز اندوژن موجود در خون و ماتریکس خارج سلولی و نیز غشاهای متعددی نظیر غشای سیتوپلاسمی و غشای هسته است (۳۲، ۳۴). اگرچه ویروس‌ها حامل‌هایی با توانایی انتقال بالا هستند اما داشتن محدودیت‌هایی نظیر هزینه‌ی بالا مشکلات مربوط به تولید ویروس‌های غیر بیماری‌زا و ایمن و نیز احتمال ایجاد موتاسیون توسط ویروس‌هایی که ژن خود را درون کروموزوم سلول میزبان الحاق می‌کنند استفاده‌ی گسترده از این حامل‌ها را محدود کرده است؛ بنابراین، برای غلبه بر مشکلات موجود، حامل‌های غیر ویروسی به‌صورت گسترده توسعه یافتند (۲، ۳۲، ۳۳، ۳۵). در میان پلی‌کاتیون‌ها، پلی‌اتیلن‌ایمین (PEI) به‌عنوان نسل دوم پلیمرهای کاتیونی و استاندارد طلایی در انتقال ژن شناسایی شده است (۲، ۲۳، ۳۲، ۳۳، ۳۶، ۳۷). علی‌رغم مزایای اشاره‌شده، معایبی نیز برای پلی‌اتیلن‌ایمین مطرح است که از آن جمله می‌توان سمیت سلولی ناشی از تراکم زیاد بار مثبت و کارایی ترانسفکشن پایین در مقایسه با وکتورهای ویروسی را نام برد. لذا لازم است که ساختمان این ترکیب اصلاح گردد. ازجمله‌ی این تغییرات می‌توان به افزودن لیگاندی اشاره کرد که وکتور را به‌صورت اختصاصی به بافت هدف خاصی نظیر بافت سرطانی هدایت می‌کند. دسته دوم از این تغییرات به تعادل هیدروفوبیک-هیدروفوبیک و نیز تعادل بار PEI کمک خواهد کرد. انتخاب هیدروکورتیزون به‌عنوان لیگاند هدفمندساز پلی‌پلکس حاصل به دو دلیل عمده صورت گرفت: ۱- پس از ورود وکتور به سلول سرطانی، هیدروکورتیزون تعبیه‌شده در پلی‌پلکس به انتقال آن به هسته سلول کمک خواهد کرد. ۲- در مقالات دیده شده است که در نتیجه‌ی اتصال گلوکوکورتیکوئیدها به رسپتورشان، قطر کمپلکس‌های منافذ هسته‌ای (NPC) بیشتر شده و تا حدی اجازه‌ی عبور مولکول‌های بزرگ‌تر را می‌دهند. این ویژگی، از آنجایی که امکان ورود وکتور به هسته سلول را فراهم می‌کند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۳۸).

بنابراین طی این پژوهش، یک سامانه‌ی دوبخشی طراحی شد که در یکی از بخش‌های آن، پلیمر با هیدروکورتیزون کانژوگه شد.

این بخش توسط یک لینکر هیدروفوب به یک مولکول پلی‌اتیلن‌ایمین دیگر وصل شد. لینکر هیدروفوب، به تعادل هیدروفوبیک-هیدروفوبیک کمک خواهد کرد و بخش دوم که یک مولکول PEI دست‌نخورده است، وظیفه اتصال به پلاسمید، متراکم کردن آن و حفاظت از پلاسمید در برابر آنزیم‌ها را به عهده خواهد داشت. در نتیجه، حاملی طراحی و تهیه شده است که در آن وظیفه برهمکنش با پلاسمید بر عهده یکی از دومین‌ها است و وظیفه اتصال به گیرنده‌های هدف و انتقال هدفمند به هسته سلول بر عهده دومین دیگر است.

در این پژوهش، حدود ۱ درصد آمین‌های نوع اول PEI به هیدروکورتیزون متصل گردید. در مورد بخش دوم، فقط یکی از آمین‌های نوع اول PEI با لینکر هیدروفوب ۴ کربنه، کانژوگه شد. سپس دو قسمت حاصل توسط واکنشی که شرح داده شد، به هم متصل گردیدند.

از آنجایی که خصوصیت پلیمرهای کاتیونی در متراکم کردن DNA لازمه‌ی ژن‌رسانی کارآمد به سلول‌های هدف است، بنابراین توانایی متراکم کردن DNA با دو روش جداگانه، مورد بررسی قرار گرفت. در روش اول، از اتیدیوم بروماید استفاده گردید. رنگ اتیدیوم بروماید به‌عنوان یک عامل کمپلکس کننده، مداخلات قوی و اختصاصی با پلاسمید برقرار می‌کند، در نتیجه شدت فلورسانس منتشره از آن به دنبال قرارگیری بین جفت بازهای DNA، به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد. پس از افزودن پلی‌کاتیون، اتصال پلی‌کاتیون به پلاسمید، باعث خروج بخشی از اتیدیوم بروماید متصل شده می‌شود و در نتیجه شدت فلورسانس منتشره تا حد قابل توجهی کاهش می‌یابد. همان‌طور که در شکل 3A مشاهده می‌شود، پلیمر سنتز شده در مقایسه با پلی‌اتیلن‌ایمین تغییر نیافته، رفتار مشابهی در متراکم کردن DNA از خود نشان می‌دهد و حتی می‌توان گفت که کارایی پلیمر سنتز شده در متراکم کردن DNA بیشتر از PEI تغییر نیافته است. از آنجایی که پلیمر سنتز شده دارای دو بخش است، لذا در مقایسه با پلی‌اتیلن‌ایمین تغییر نیافته، چگالی بار مثبت بیشتری دارد. این چگالی بار مثبت بیشتر باعث اتصال قوی‌تر پلیمر با DNA می‌شود و در نتیجه قدرت بیشتر پلیمر سنتز شده در متراکم کردن DNA در مقایسه با PEI تغییر نیافته کاملاً طبیعی است. شایان توجه است که توانایی پلیمر در ژن‌رسانی موفق، محصول نهایی چندین خصوصیت متفاوت در این ساختار است. ازجمله این خصوصیات، بار سطحی پلیمرهاست. این بار

تست، می‌توان نتیجه گرفت که هرچند که PEI و پلیمر سنتز شده در $C/P=0.5$ ، توانایی اتصال به پلاسمید را دارند اما این اتصال، چندان محکم نیست (loose interaction)؛ اما در C/P های بالاتر، اتصال برقرار شده بین پلاسمید و پلیمر، به اندازه کافی قوی است (strong interaction). این مسئله در کارایی ژن‌رسانی به‌خصوص در مطالعات درون‌تنی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ چراکه وکتور سنتز شده باید توانایی همراهی کردن پلاسمید تا هسته‌ی سلول هدف را داشته باشد. در غیر این صورت، در صورتی که اتصال بین پلاسمید و پلیمر به‌اندازه‌ی کافی قوی نباشد، امکان تخریب پلاسمید توسط آنزیم‌های موجود در خون، قبل از رسیدن پلاسمید به هسته‌ی سلول هدف وجود خواهد داشت (۳۳). در مطالعات قبلی نشان داده شده است که قدرت اتصال پلیمر به پلاسمید در توانایی انتقال ژن تأثیر بسیار مهمی دارد. این اتصال در محیط خارج سلولی باید به حدی باشد که کمپلکس‌های پایدار شکل بگیرد و در ضمن بتواند ماده ژنتیکی را در برابر عوامل تخریبگر محافظت کند؛ اما از سوی دیگر این اتصال نباید آن‌قدر محکم باشد که جلوی رهاسازی پلاسمید از پلیمر در محیط داخل سلول گرفته شود. به عبارت دیگر وجود یک توازن بین توانایی اتصال و نیز امکان رهاسازی از پلیمر برای ژن‌رسانی موفق، ضروری است (۲۳، ۳۳، ۳۶، ۳۷).

خصوصیت مهم دیگر که برای ژن‌رسانی موفق ضروری است، ظرفیت بافری پلیمر ساخته شده است. همان‌طوری که قبلاً هم اشاره شد، ظرفیت بافری مهم‌ترین ویژگی پلی‌اتیلن‌ایمین برای رهایی پلی‌پلکس‌های سنتز شده از اندولیزوزوم است (۳۹). pH بحرانی endolysosome در مقالات مختلف بین ۵-۷ در نظر گرفته می‌شود، بنابراین داشتن ظرفیت بافری در این محدوده‌ی pH، سبب افزایش فشار اسمزی درون لیزوزوم و نهایتاً لیز شدن لیزوزوم می‌شود (۳۷، ۴۰). به دلیل حضور گروه‌های آمینی قابل پروتونه شدن در ساختار PEI، با افزودن مقادیر مشخصی از اسید، کاهش pH با شیب کمی اتفاق می‌افتد. همان‌طوری که در شکل 4A دیده می‌شود، شیب کاهش pH پلیمر سنتز شده در مقایسه با آب (کنترل منفی) و PEI (کنترل مثبت) خیلی کمتر است که این نشان‌دهنده ظرفیت بافری بالاتر پلیمر سنتز شده است. در نتیجه انتظار می‌رود که پلیمر سنتز شده نسبت به پلی‌اتیلن‌ایمین تغییرنیافته، قابلیت بیشتری برای فرار از لیزوزوم داشته باشد. از آنجایی که حامل‌های سنتز شده، حاوی دو بخش

سطحی از یک‌طرف برای برهمکنش مؤثر با اسیدهای نوکلئیک و تشکیل نانوذرات ضروری است و همچنین آمین‌های ایجادکننده این بار مثبت در القای خصوصیت اسفنج پروتونی نقش کلیدی دارند؛ اما از سوی دیگر، همین بار مثبت باعث ایجاد سمیت می‌شود. کاهش بار مثبت به‌تنهایی اگرچه باعث کم شدن سمیت می‌شود ولی از سوی دیگر با کم کردن اثر اسفنج پروتونی و نیز کاهش برهمکنش با پلاسمید می‌تواند باعث کم شدن توانایی ژن‌رسانی شود. لذا اگر اندکی بر بار مثبت هم افزوده شود ولی از طرف دیگر بتوان نانوذره حاصل را هدفمند کرد می‌توان از سمیت کلی ایجادشده توسط آن کاست.

در روش دوم، از آنالیز تأخیر ژل، برای بررسی توانایی متراکم کردن ژنوم توسط پلیمر استفاده شد. تشکیل کمپلکس بین پلی‌کاتیون و DNA پلاسمیدی، به علت خنثی‌سازی بار منفی DNA پلاسمیدی و نیز متراکم کردن آن، مانع از حرکت پلاسمید در میدان الکتریکی ایجاد می‌شود. در C/P های مختلفی انجام گرفت. همان‌طوری که در شکل 3B دیده می‌شود، پلاسمید در عدم حضور پلیمر (چاهک ۲)، به علت بار منفی خود، به کمک میدان الکتریکی ایجاد می‌شود توسط دستگاه الکتروفورز، روی ژل حرکت می‌کند. در این تست، پلیمر سنتز شده و پلی‌اتیلن‌ایمین تغییرنیافته، هر دو رفتار مشابهی در متراکم کردن DNA از خود نشان دادند؛ به‌طوری‌که در ۸ و $C/P=4$ توانستند پلاسمید را متراکم کنند و از حرکت آن روی ژل جلوگیری کنند؛ اما در $C/P=0.5$ ، توانایی متراکم کردن و حفظ پلاسمید را نداشتند و در نتیجه حرکت پلاسمید بر روی ژل دیده می‌شود. در واقع در C/P های ۴ و ۸، با افزایش بار مثبت پلیمر نسبت به پلاسمید، به علت متراکم شدن کامل DNA و نیز خنثی‌سازی بخش بزرگی از بار منفی آن، حرکت آن روی ژل دیده نمی‌شود ولی در $C/P=0.5$ ، چون متراکم شدن DNA و خنثی‌سازی بار آن به‌صورت کامل رخ نداده است، حرکت پلاسمید روی ژل طبیعی است. در این تست، پلی‌اتیلن‌ایمین تغییرنیافته به‌عنوان شاهد استفاده شد که رفتاری مشابه پلیمر سنتز شده، از خود نشان داد. باز شدن Ladder در چاهک اول، نشانه‌ی درستی انجام فرآیند و حرکت پلاسمید در چاهک دوم، نشانه‌ی سالم بودن پلاسمید است.

بدین ترتیب نتایج تست آنالیز تأخیر ژل تکمیل‌کننده‌ی نتایج حاصل از تست اتیدیوم بروماید است. با توجه به نتایج این دو

در چاهک‌های فاقد آنزیم نشان می‌دهد که تنها عامل تخریب پلاسמיד در چاهک‌ها، آنزیم به‌کاررفته است. بر اساس تست‌های انجام‌شده می‌توان این‌طور نتیجه گرفت که کمپلکس‌های تشکیل‌شده در C/P‌های ۴ و ۸ کارایی بیشتری در مقایسه با C/P=۰/۵ دارند. بر اساس نتایج حاصل از این آزمون، می‌توان چنین فرض کرد که برای مطالعات بعدی در کشت سلول و حیوان، از نسبت‌های بالاتر پلیمر به پلاسמיד می‌توان استفاده کرد چراکه در نسبت‌های پایین‌تر، احتمال تخریب پلاسמיד توسط آنزیم‌ها زیاد است.

آخرین خصوصیتی که در مورد نانوذرات حاصل بررسی گردید، اندازه ذره‌ای و چگالی بار سطحی آن‌ها بود. چراکه چگالی بار سطحی (پتانسیل زتا) و اندازه ذره‌ای، دو ویژگی ضروری برای ورود پلی‌پلکس‌ها به داخل سلول است. وجود بار مثبت بر سطح پلی‌پلکس‌ها و نیز میزان این بار مثبت از دو جنبه حائز اهمیت است: ۱- حضور بار مثبت بر سطح پلی‌پلکس‌ها می‌تواند در تسهیل ورود نانوذرات به داخل سلول مؤثر باشد چراکه به ایجاد واکنش الکتروستاتیک بین بار منفی غشای سلول و بار مثبت پلی‌پلکس‌ها کمک می‌کند. ۲- از طرفی هر چه چگالی بار مثبت (پتانسیل زتا) بیشتر باشد، به علت دافعه‌ی بارهای همنام از تجمع نانوذرات در کنار هم جلوگیری می‌کند و در نتیجه باعث پایداری بیشتر آن‌ها خواهد شد (۲، ۳، ۲۳، ۳۷، ۳۸). شکل 4C پتانسیل زتا و اندازه‌ی ذره‌ای پلی‌پلکس سنتز شده را در مقایسه با پلی‌اتیلن‌ایمین تغییرنیافته نشان می‌دهد. همان‌طوری که در شکل مشخص است، اندازه‌ی ذره‌ای و پتانسیل زتای پلی‌پلکس نهایی در مقایسه با PEI تغییرنیافته بیشتر است. از آنجایی که پلیمر سنتز شده دارای دو مولکول PEI است، لذا بزرگ‌تر بودن سایز ذره‌ای و چگالی بار سطحی در مقایسه با PEI تغییرنیافته کاملاً قابل توجیه است. از طرفی چون اندازه‌ی ذره‌ای و پتانسیل زتای پلی‌پلکس نهایی همچنان در محدوده حدود ۲۰۰-۳۰۰ نانومتر است، وکتور سنتز شده همچنان به‌عنوان کاندید جدیدی برای ژن‌رسانی مطرح است. لذا با توجه به ویژگی‌های مطلوب حامل سنتز شده در تست‌های بیان‌شده، می‌توان گفت که وکتور سنتز شده قابلیت ژن‌رسانی مؤثر، کارآمد و هدفمند را خواهد داشت. البته شایان‌ذکر است با توجه به مطالعات قبلی، حامل‌هایی که دارای خصوصیات بیوفیزیکی مطلوب هستند الزاماً در محیط‌های برون تن و نهایتاً درون تن بهترین جواب را نخواهند داشت (۳۸). این امر بدین دلیل است که در محیط آزمایشگاه

هستند و هر دو بخش هم حاوی تعدادی آمین هستند، لذا بیشتر بودن ظرفیت بافوری پلیمر سنتز شده نسبت به پلی‌اتیلن‌ایمین تغییرنیافته را می‌توان به بیشتر بودن تعداد آمین‌های پلیمر سنتز شده نسبت داد. چنین ساختاری احتمالاً می‌تواند در مطالعات سلولی و حیوانی آینده، خروج زودهنگام مؤثرتری را از اندوزوم‌ها تضمین کند که این امر خود لازمه ژن‌رسانی موفق به سلول‌ها است.

خصوصیت مهم دیگر که در مورد پلیمر سنتز شده بررسی شد، توانایی آن در حفاظت از پلاسמיד در برابر آنزیم‌های مخربی چون DNase I بود. از آنجایی حرکت مولکول‌های بزرگی مثل DNA درون سیتوزول بسیار به‌کندی صورت می‌گیرد، احتمال تخریب آن‌ها توسط آنزیم‌های نوکلئاز موجود در سیتوپلاسم وجود دارد (۲۳، ۳۸-۴۰). بنابراین نانوحامل سنتز شده باید توانایی حفاظت از پلاسמיד، پس از اتصال به آن را داشته باشد. شکل 4B توانایی نانوحامل‌ها را در حفاظت از DNA نشان می‌دهد. در این تست، از 1% SDS، به‌منظور جداسازی DNA از کمپلکس استفاده شد تا حرکت آن بر روی ژل موردبررسی قرار گیرد. طبق شکل، برخلاف پلاسמיד فاقد حامل، در C/P‌های ۴ و ۸، DNA موجود در پلی‌پلکس‌های حاصل از پلیمر سنتز شده و PEI تغییرنیافته در برابر DNase I محافظت شدند. حتی در C/P=۰/۵، بااینکه بخش زیادی از پلاسמיד تخریب‌شده و به شکل کشیدگی روی ژل نمایان شده است، اما همچنان بخشی از پلاسמיד توسط پلیمر حفظ شده است. همان‌طوری که قبلاً هم بر اساس نتایج دو تست اتیدیوم بروماید و آنالیز تأخیر ژل بیان شد، می‌توان عدم حفاظت PEI و پلیمر از پلاسמיד در C/P=۰/۵ را این‌گونه توجیه کرد که هر چند که PEI و پلیمر در C/P=۰/۵، توانایی اتصال به پلاسמיד را دارند اما این اتصال، چندان محکم نیست و لذا اتصال بین آن‌ها به‌سادگی قابل شکستن است. در نتیجه تخریب پلاسמיד توسط آنزیم در C/P=۰/۵، چندان دور از انتظار نیست. در C/P=۴، PEI در مقایسه با پلیمر توانایی بیشتری در حفاظت از پلاسמיד داشته است اما باین‌وجود پلیمر هم توانسته تا حد قابل قبولی از پلاسמיד حفاظت کند. در C/P=۸، هر دوی یک نسبت توانستند از DNA حفاظت کنند. باندهای حاصل از باز شدن Ladder نشان‌دهنده‌ی درستی انجام فرآیند است. حرکت پلاسמיד در چاهک دوم نشانه‌ی سالم بودن پلاسמיד و تخریب کامل پلاسמיד در چاهک سوم توسط آنزیم نشانه‌ی سالم بودن آنزیم است. همچنین عدم تخریب پلاسמיד



مؤثر پلاسمید به سلول‌ها ضروری است به نظر می‌رسد که چنین نانوحاملی بتواند به‌عنوان کاندیدای مناسبی جهت آزمون‌های سلولی و حیوانی به کار رود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شیراز و در قالب پایان‌نامه داروسازی خانم الهه ثابت با شماره 89-01-36-2456 انجام پذیرفت. بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

تأثیر سایر فاکتورها از قبیل اجزای باردار موجود در سرم، جذب، توزیع و متابولیسم این ترکیبات در نظر گرفته نمی‌شود. لذا چنین مطالعه‌ای می‌تواند به‌عنوان یک بررسی اولیه پیش از ورود به مطالعات سلولی یا حیوانی در نظر گرفته شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، هیدروکورتیزون باهدف نهایی رساندن نانوحامل‌های حاوی پلاسمید به هسته سلول طراحی و تهیه گردید. خصوصیات مختلف این نانوحامل موردبررسی قرار گرفت و نشان داده شد که این پلیمر جدید می‌تواند نانوذراتی کوچک‌تر از ۳۰۰ نانومتر ایجاد کند که دارای ظرفیت بافری قابل‌توجه، توانایی برهمکنش مؤثر با پلاسمید و محافظت آن در برابر آنزیم‌های مخرب باشد. از آنجایی‌که این خصوصیات برای انتقال

References

1. Wong JK, Mohseni R, Hamidieh AA, MacLaren RE, Habib N, Seifalian AM. Limitations in clinical translation of nanoparticle-based gene therapy. *Trends Biotechnol.* 2017;35(12):1124-5.
2. Thomas M, Klivanov A. Non-viral gene therapy, polycation-mediated DNA delivery. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003;62(1):27-34.
3. Merlin J-L, N'Doye A, Bouriez T, Dolivet G. Polyethylenimine derivatives as potent nonviral vectors for gene transfer. *Drug News Perspect.* 2002;15(7):445.
4. Kichler A. Gene transfer with modified polyethylenimines. *Journal of Gene Medicine.* 2004;6(S1):S3-S10.
5. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. *Gene.* 2013;525(2):162-9.
6. Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J, Edelstein RM. Gene therapy clinical trials worldwide 1989–2004—an overview. *J Gene Med.* 2004;6(6):597-602.
7. Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012—an update. *J Gene Med.* 2013;15(2):65-77.
8. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2003;4(5):346.
9. Al-Dosari MS, Gao X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *The AAPS journal.* 2009;11(4):671.
10. Riley M, Vermerris W. Recent advances in nanomaterials for gene delivery—a review. *Nanomaterials.* 2017;7(5):94.
11. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012; 22;56(11):1649-59.
12. Park TG, Jeong JH, Kim SW. Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006;58(4):467-86.
13. Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Göpferich A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005;60(2):247-66.
14. Kircheis R, Wightman L, Schreiber A, Robitza B, Rössler V, Kursu M, et al. Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther.* 2001;8(1):28.
15. Luo D, Saltzman WM. Synthetic DNA delivery systems. *Nat biotechnol.* 2000;18(1):33.
16. Bousssif O, Lezoualc'h F, Aanta M, Mergny M, Scherman D, Demenix B, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethyleneimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995;92(16):7297-301.
17. Liu Z, Zhang Z, Zhou C, Jiao Y. Hydrophobic modifications of cationic polymers for gene delivery. *Prog Polym Sci.* 2010;35(9):1144-62.
18. Kircheis R, Kichler A, Wallner G, Kursu M, Ogris M, Felzmann T, et al. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther.* 1997;4(5):409.

19. Guo W, Lee RJ. Receptor-targeted gene delivery via folate-conjugated polyethylenimine. *Aaps Pharmsci*. 1999;1(4):20.
20. Leamon CP, Low PS. Folate-mediated targeting: from diagnostics to drug and gene delivery. *Drug Discov Today*. 2001;6(1):44-51.
21. Benms JM, Maheshwari A, Furgeson DY, Mahato RI, Kim SW. Folate-PEG-folate-graft-polyethylenimine-based gene delivery. *J Drug Target*. 2001;9(2):123-39.
22. Kursu M, Walker GF, Roessler V, Ogris M, Roedel W, Kircheis R, et al. Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer. *Bioconjug Chem*. 2003;14(1):222-31.
23. Dehshahri A, Sadeghpour H, Oskuee RK, Fadaei M, Sabahi Z, Alhashemi SH, et al. Interleukin-12 plasmid DNA delivery using l-thyroxine-conjugated polyethylenimine nanocarriers. *J Nanopart Res*. 2014;16(5):2423.
24. Sheikhsaran F, Sadeghpour H, Khalvati B, Entezar-Almahdi E, Dehshahri A. Tetraiodothyroacetic acid-conjugated polyethylenimine for integrin receptor mediated delivery of the plasmid encoding IL-12 gene. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017;150:426-36.
25. Boeckle S, Wagner E, Ogris M. C-versus N-terminally linked melittin-polyethylenimine conjugates: the site of linkage strongly influences activity of DNA polyplexes. *J Gene Med*. 2005;7(10):1335-47.
26. 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.
27. Hashemi M, Parhiz B, Hatefi A, Ramezani M. Modified polyethylenimine with histidine-lysine short peptides as gene carrier. *Cancer Gene Ther*. 2011;18(1):12.
28. Sun Y-X, Zeng X, Meng Q-F, Zhang X-Z, Cheng S-X, Zhuo R-X. The influence of RGD addition on the gene transfer characteristics of disulfide-containing polyethylenimine/DNA complexes. *Biomaterials*. 2008;29(32):4356-65.
29. Kim Y-M, Park S-C, Jang M-K. Targeted gene delivery of polyethylenimine-grafted chitosan with RGD dendrimer peptide in $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin-overexpressing tumor cells. *Carbohydr. Polym*. 2017;174:1059-68.
30. Wang J, Lei Y, Xie C, Lu W, Wagner E, Xie Z, et al. Retro-inverso CendR peptide-mediated polyethylenimine for intracranial glioblastoma-targeting gene therapy. *Bioconjug Chem*. 2014;25(2):414-23.
31. Yang J, Liu W, Lv J, Feng Y, Ren X, Zhang W. REDV-polyethylenimine complexes for selectively enhancing gene delivery in endothelial cells. *J Mater Chem B*. 2016;4(19):3365-76.
32. Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature*. 2015;526(7573):351.
33. Foldvari M, Chen DW, Nafissi N, Calderon D, Narsineni L, Rafiee A. Non-viral gene therapy: Gains and challenges of non-invasive administration methods. *J Control Release*. 2016;240:165-90.
34. Wang H-X, Li M, Lee CM, Chakraborty S, Kim H-W, Bao G, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing for disease modeling and therapy: challenges and opportunities for nonviral delivery. *Chem. Rev*. 2017;117(15):9874-906.
35. Nouri F, Sadeghpour H, Heidari R, Dehshahri A. Preparation, characterization, and transfection efficiency of low molecular weight polyethylenimine-based nanoparticles for delivery of the plasmid encoding CD200 gene. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:5557.
36. Sadeghpour H, Nasrabad KR, Haghighi MA, Dehshahri A. Preparation and Characterization of Celecoxib-Conjugated Polyethylenimine as a Potential Nanocarrier for Gene Delivery. *Trends Pharm Sci*. 2018;4:1-8.
37. K Oskuee R, Dehshahri A, Shier T, Ramezani M. Modified polyethylenimine: Self assemble nanoparticle forming polymer for pDNA delivery. *Iranian J Basic Med Sci*. 2008;11(1):33-40.
38. Mi Bae Y, Choi H, Lee S, Ho Kang S, Tae Kim Y, Nam K, et al. Dexamethasone-conjugated low molecular weight polyethylenimine as a nucleus-targeting lipopolymer gene carrier. *Bioconjug Chem*. 2007;18(6):2029-36.
39. Dehshahri A, Alhashemi SH, Jamshidzadeh A, Sabahi Z, Samani SM, Sadeghpour H, et al. Comparison of the effectiveness of polyethylenimine, polyamidoamine and chitosan in transferring plasmid encoding interleukin-12 gene into hepatocytes. *Macromol Res*. 2013;21(12):1322-30.
40. Khalvati B, Sheikhsaran F, Sharifzadeh S, Kalantari T, Behzad Behbahani A, Jamshidzadeh A, et al. Delivery of plasmid encoding interleukin-12 gene into hepatocytes by conjugated polyethylenimine-based nanoparticles. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2017;45(5):1036-44.



Original Article

Preparation of Hydrocortisone Conjugated Polyethylenimine Nanocarriers and its Characterizations for Potential Application in Targeted Gene Delivery

Sadeghpour H¹, Sabet E¹, Dehshahri A^{2*}

1. Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

2. Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 01 Jan 2019

Accepted: 04 May 2019

Abstract

Background & Objective: Nowadays, gene therapy has been considered as a novel therapeutic approach. Particularly, following the introduction of immunotherapy and gene editing using CRISPR/Cas9 platform great attention has been directed to gene therapy. However, finding an efficient carrier with low toxicity is still one of the major challenges for researchers. Among non-viral gene carriers, polyethylenimine (PEI) could be considered as the most studied polycationic compound for gene delivery. However, toxicity, lack of targeting and non-specific interactions with serum components limit its wide application. Therefore, PEI structure must be modified through chemical conjugations. In this study, conjugation of hydrocortisone on the polymer structure was carried out in order to direct the carriers into the cell nucleus.

Materials & Methods: Hydrocortisone was conjugated onto polyethylenimine followed by the grafting of the targeted PEI domain onto another unmodified polymer via succinic acid linker. The conjugate was characterized in terms of buffering capacity, zeta potential, particle size, protection of DNA against enzymes and condensation ability.

Results: The results demonstrated that the conjugates could condense plasmid DNA successfully and form nanoparticles with the size of around 300 nm. Meanwhile, the conjugates showed higher buffering capacity compared with the unmodified polymer. Also, the protection ability of the conjugates was significant rather than the parent polymer.

Conclusion: According to the results, design and synthesis of the PEI derivative with two separated domains responsible for targeting and plasmid condensation could be considered as an efficient strategy to create nano gene delivery systems.

Keywords: polyethylenimine, hydrocortisone, targeted gene delivery, polymeric nanoparticle

***Corresponding Author:** Dehshahri Ali, Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Email: dehshahria@sums.ac.ir

<http://orcid.org/0000-0003-4458-1292>