

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

Kheiri Manjilli H., PhD<sup>1</sup>, Danafar H., PhD<sup>2</sup>, Sharafi A., PhD<sup>3</sup>

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 Department, 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 °C and 58.68°C 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 31<sup>st</sup> day, molecular weights of diblock and tri block Copolymers were 7852 and 9586 Dalton respectively. Based on IC<sub>50</sub>, diblock and tri block copolymers had no toxic effects on HEK293 cells and are biocompatible .

**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

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

حمیدرضا خیری منجیلی<sup>۱</sup>، حسین دانافر<sup>۱</sup>، علی شرفی<sup>۲</sup>

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

۲. استادیار گروه نانو تکنولوژی دارویی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران (مؤلف مسوول)، تلفن

ثابت: ۰۲۴-۳۳۴۷۳۶۳۵-danafar@zums.ac.ir

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

### چکیده

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

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

**یافته ها:** نتایج HNMR و FTIR صحت تشکیل کopolymerهای سه تایی و دوتایی سنتز شده را تایید نموده و با استفاده از تکنیک DSC نقطه ذوب کopolymerهای سه تایی و دوتایی به ترتیب در  $55^{\circ}\text{C}$  و  $58/68^{\circ}\text{C}$  می باشد و همچنین این کopolymerها به ترتیب ارای جرم مولکولی میانگین  $16000$  و  $12223$  دالتون می باشد. تخریب پذیری این کopolymerها در محیط بافری صورت گرفت که در انتهای روز ۳۱ جرم مولکولی پلیمر دوتایی و کopolymer سه تایی به ترتیب در حدود  $7852$  و  $9586$  دالتون می باشد. از روی میزان  $IC_{50}$  محاسبه برای هر ترکیب بر روی سلولهای کلیه (HEK 293) نشان داده شده که کopolymerهای دو تایی و سه تایی هیچ گونه سمیتی نداشته اند و کاملاً زیست سازگار هستند.

**نتیجه گیری:** این کopolymerهای 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:** کopolymer، زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، سمیت سلولی

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

## 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 ماندند (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 (۵و۶). نانو ذرات پلیمری که برای سیستم‌های داروسازی به کار می‌روند لازم است از پلیمرهای زیست تخریب پذیر<sup>۱</sup> 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 (پلی اتیلن اکسید) 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 (۱۰-۱۲). امروزه باتوجه به ویژگی‌های متنوع و خاص کوپلیمرها توجه زیادی به کاربرد

آنها در زمینه‌های مختلف بویژه دارورسانی شده است (۱۳و۱۴). از جمله‌ی 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 (۸ و ۱۰ و ۱۱). 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 (۱۵و۱۶). 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 نانو ذرات 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 و همکارانش زیست سازگار بودن و تخریب پذیری کوپلیمرهای دو تایی 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 نانو ساختارهای پلیمری بنظر می‌رسد بررسی زیست تخریب پذیری و زیست سازگاری این پلیمرها می‌تواند راهکار نوینی برای اثر بخشی همراه با عوارض کمتر و فراهمی زیستی بالاتر فراروی محققین قرار دهد.

## روش بررسی

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

<sup>1</sup>Biodegradable

DSC استفاده شد. نمونه‌ها با سرعت  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  حرارت داده شده و اندازه‌گیری در محدوده  $200-250^{\circ}$  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  $4500\text{g/mol}$  تا  $29000\text{g/mol}$  رسم شده، جرم مولکولی و پلی دیسپرسیته 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 از بدن:

ابتدا یک محلول آلی با مقدار وزن ۵ گرم از هر کدام از کوپلیمرها در ۱۰۰ میلی لیتر کلروفرم تهیه گردید و این محلول تحت هم زدن با دور  $1500\text{rpm}$  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  $72^{\circ}\text{C}$ - و در 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 و در داخل یک ظرف حاوی  $13\text{ml}$  بافر فسفات با  $\text{pH}=7/40$  ظرف محتوی بافر و پلیمر در دستگاه شیکرانکوباتور در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  قرار داده و در زمان‌های مشخص یک قسمت از محلول برداشته، و با بافر تازه جایگزین و مقدار جرم پلیمر را با GPC اندازه‌گیری نموده، هر یک از اندازه‌گیری‌ها را سه مرتبه تکرار کرده و میانگین این سه داده برای محاسبه جرم مولکولی تخریب شده استفاده گردید. این کار برای محیط بافر فسفات با  $\text{pH}=5/50$

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 از طریق پلیمریزاسیون حلقه گشایی کاپرولاکتون در حضور پلی اتیلن گلیکول به عنوان مولکول آغازگر و کاتالیست اکتانات قلع سنتز گردید (۱۶). بدین صورت که مقدار ۳g از PEG با جرم مولکولی  $6000\text{g/mol}$  در داخل یک بالن دو دهانه وارد کرده و تحت خلاء و دمای  $80^{\circ}\text{C}$  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  $120^{\circ}\text{C}$  رسانده شد. در ادامه ۶g از مونومر کاپرولاکتون را به ظرف واکنش اضافه کرده و بعد از ذوب شدن کامل کاپرولاکتون، کاتالیست را به اندازه  $100\mu\text{l}$  به آن افزوده و اجازه داده شد تا واکنش در دمای  $120^{\circ}\text{C}$  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-PCL و کوپلیمرهای دو تایی mPEG-PCL:

برای تعیین ساختار کوپلیمر سه تایی PCL-PEG-PCL و کوپلیمرهای دو تایی mPEG-PCL از دستگاه  $^1\text{H}$  NMR استفاده شده است. طیف‌های NMR با دستگاه Bruker 400MHz و در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  گرفته شدند. کلروفرم دوتره ( $\text{CDCl}_3$ ) به عنوان حلال و تری میتل سیلان (TMS) به عنوان استاندارد داخلی به کار برده شده‌اند. برای تأیید 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

و همچنین محیط پلاسمای تازه انسانی نیز انجام شد. نتایج اندازه گیری برای همه پلیمرها بصورت جداگانه انجام شد. تعیین سمیت سلولی کopolymerها بر 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 تریپسین شده و سوسپانسیون سلولی حاصله بعد از شمارش سلولی به روش تریپان بلو به تعداد ۱۰۰۰ سلول با حجم نهایی ۱۰۰  $\mu\text{L}$  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 کopolymerهای دوتایی و سه تایی (در رنج ۲/۵ تا ۸۰  $\mu\text{M}$ ) انجام گرفت. بعد از ۵ روز به هر خانه حاوی محیط کشت ۲۵  $\mu\text{L}$  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 خانه ۱۰۰  $\mu\text{L}$  از محلول DMSO اضافه گردید سپس جذب کریستال های بنفش رنگ حل شده فورمازان توسط دستگاه Plate Reader مدل Tecan در طول موج ۵۷۰ nm در مقابل ۶۳۰ nm خوانده شد. با استفاده از نتایج بدست آمده میزان  $\text{IC}_{50}$  برای کopolymerها محاسبه گردید که این بیانگر سمیت سلولی ترکیب می باشد.

داده ها با نرم افزار Graphpad prism آنالیز گردید. برای محاسبه  $\text{IC}_{50}$  از non-linear Regression استفاده می شود.

تست Duncan با نرم افزار Graphpad prism استفاده می گردد.

### یافته ها

بررسی ویژگیهای کopolymerهای سه تایی و دوتایی: شماتیک سنتز کopolymerهای دو تایی و سه تایی به ترتیب در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. میزان راندمان کopolymer سه تایی و دوتایی تشکیل شده به ترتیب در حدود ۸۲٪ و ۷۸٪

می باشد. ساختار و ترکیب کopolymerهای سنتز شده توسط  $^1\text{H NMR}$  در حلال  $\text{CDCl}_3$  تعیین شد و در شکل ۳ و ۴ طیف آنها آورده شده است. برای کopolymer سه تایی همانطور که در طیف  $^1\text{H NMR}$  (شکل ۳) دیده شده است وجود پروتونهای متیلن ( $\text{CH}_2$ ) مربوط به جزئی PCL در ۲.۲ ppm، ۱.۶ ppm، ۱.۳ ppm، ۰.۶ ppm مشاهده گردید و همچنین پروتونهای متیلن ( $\text{CH}_2$ ) گروه PEG کopolymer در ۳.۶۳ ppm به صورت پیک یکتایی ظاهر شد. همچنین جرم مولکولی کopolymer محاسبه شده توسط  $^1\text{H NMR}$  ۱۶۰۰۰ دالتون می باشد. در طیف  $^1\text{H NMR}$  کopolymer mPEG-PCL همانطور که در شکل ۴ مشاهده می شود وجود پیک در ناحیه ۳/۳۸ و ۳/۶۴ ppm مربوط به گروه متوکسی و گروههای متیل PEG است. پیک  $\text{ppm } 1/3$  ( $2\text{H}$ )،  $\text{ppm } 1/6$  ( $4\text{H}$ )،  $\text{ppm } 2/2$  ( $2\text{H}$ )،  $\text{ppm } 4/06$  ( $2\text{H}$ ) به ترتیب مربوط به کاپرولاکتون است. در طیف FT-IR کopolymer-PCL (شکل ۵) نوارهای جذبی تیز و شدیدی در فرکانسهای  $1725\text{ cm}^{-1}$  و  $1191\text{ cm}^{-1}$  مشاهده می گردد که به ترتیب وجود گروههای کربوکسیلیک استری ( $\text{C}=\text{O}$ ) و گروههای اتری ( $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ) را در ساختار کopolymer تأیید می کند و نشان دهنده تشکیل کopolymer-PCL می باشد. از طیف FTIR مربوط به کopolymer mPEG-PCL می توان اینگونه برداشت کرد که نوار جذبی در فرکانس  $1106\text{ cm}^{-1}$  و  $1240\text{ cm}^{-1}$  مربوط به پیوندهای کششی ( $\text{C}-\text{O}$ ) می باشد. نوار جذبی تیز و شدیدی که در فرکانس  $1752\text{ cm}^{-1}$  مشاهده می شود وجود گروههای استری کربونیل ( $\text{C}=\text{O}$ ) را تأیید می کند و نشان دهنده تشکیل کopolymer mPEG-PCL می باشد. هیدروژنهای متیلن ( $-\text{CH}_2-$ ) یک جذب  $\text{C}-\text{H}$  کششی می دهند که مربوط به جذبهای کششی متقارن می باشند، که در  $2884\text{ cm}^{-1}$  جذب می دهد (شکل ۶). طیف DSC مربوط به کopolymerهای PCL-PEG-PCL در شکل ۷

مربوط به جزئی PEG و PCL می باشد. DSC مربوط به کوپلیمر mPEG-PCL در شکل (۸) نشان می دهد، 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 تقریباً 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  $IC_{50}$  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 کاملاً زیست سازگار هستند.

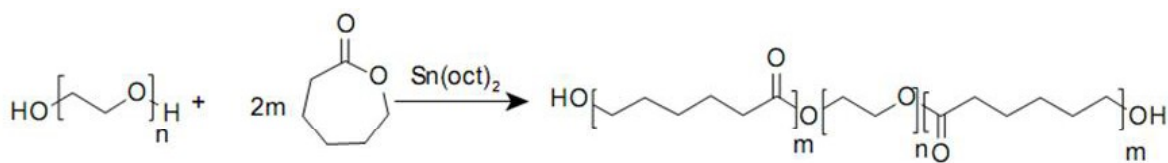
نشان داده شده است. برای کوپلیمر PCL-PEG-PCL پیک پیک گرماگیر در  $55^{\circ}C$  مشاهده می گردد که حاصل از نمونه، در محدوده  $58/68^{\circ}C$  می باشد که یک پیک گرماگیر است.

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

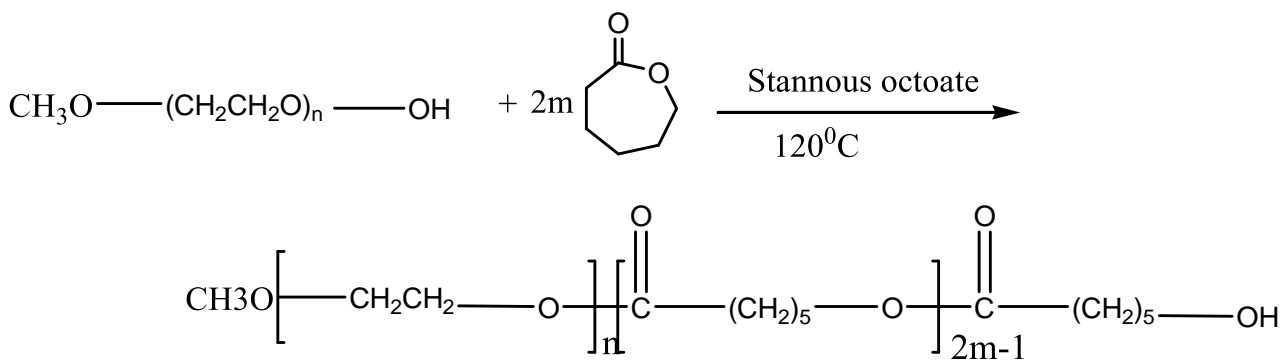
برای کوپلیمر دوتایی سنتز شده آنالیز GPC برای متوسط جرم مولکولی وزنی و متوسط جرم مولکولی عددی به ترتیب مقادیری برابر با  $12/23$  و  $11/10$  KDa را نشان می دهد و مقدار پلی دیسپرسیته بدست آمده  $1/10$  می باشد و برای کوپلیمر سه تایی متوسط جرم مولکولی عددی و متوسط جرم مولکولی وزنی به ترتیب مقادیری برابر با  $16$  KDa را نشان می دهد و مقدار پلی دیسپرسیته بدست آمده  $1/02$  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 بعلاوه 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  $9586$  دالتون می باشد و در PH اسیدی نیز نسبت به محیط



شکل ۱- مسیر سنتز کوپلیمر PCL-PEG-PCL



شکل ۲- مسیر سنتز کوپلیمر دو تایی mPEG-PCL

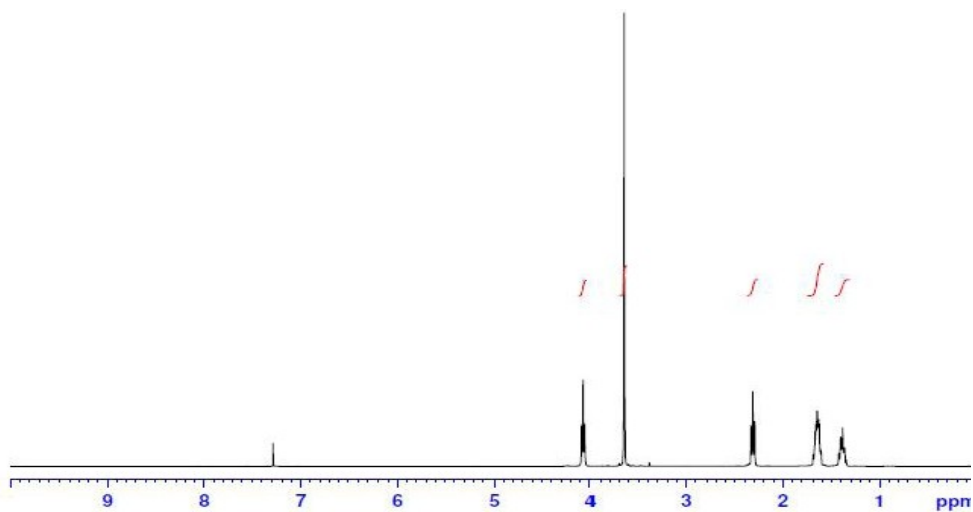
جدول ۱- خصوصیات کوپلیمرهای سه تایی و دو تایی سنتز شده

Copolymer	Mw <sup>a</sup> (KDa)	Mn <sup>a</sup> (KDa)	T <sub>m</sub> (°C) <sup>b</sup>	CL / EG feed	DP <sub>PEG</sub>	DP <sub>PCL</sub>
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

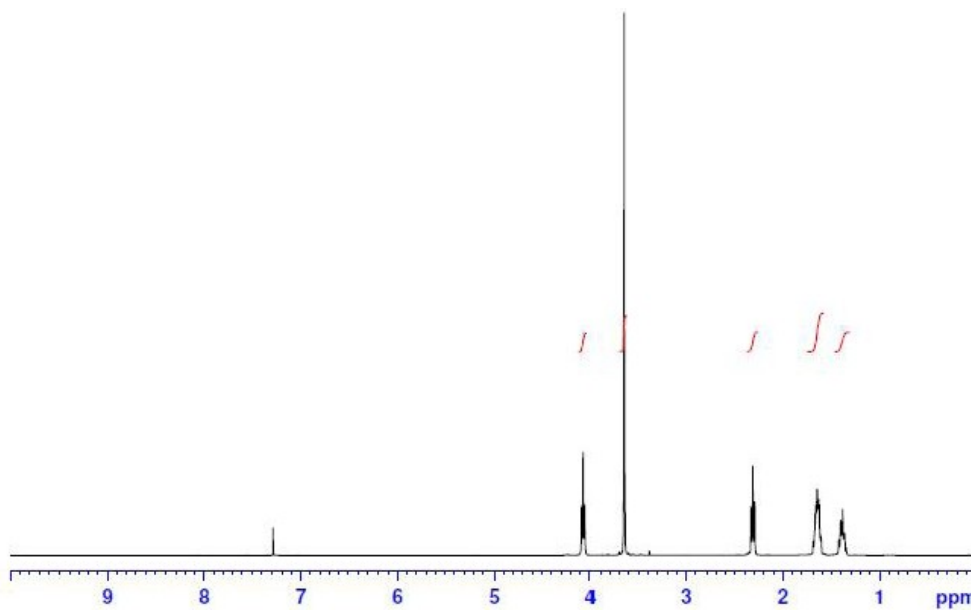
a Determined by GPC analysis using narrow molecular weight polystyrene standards.

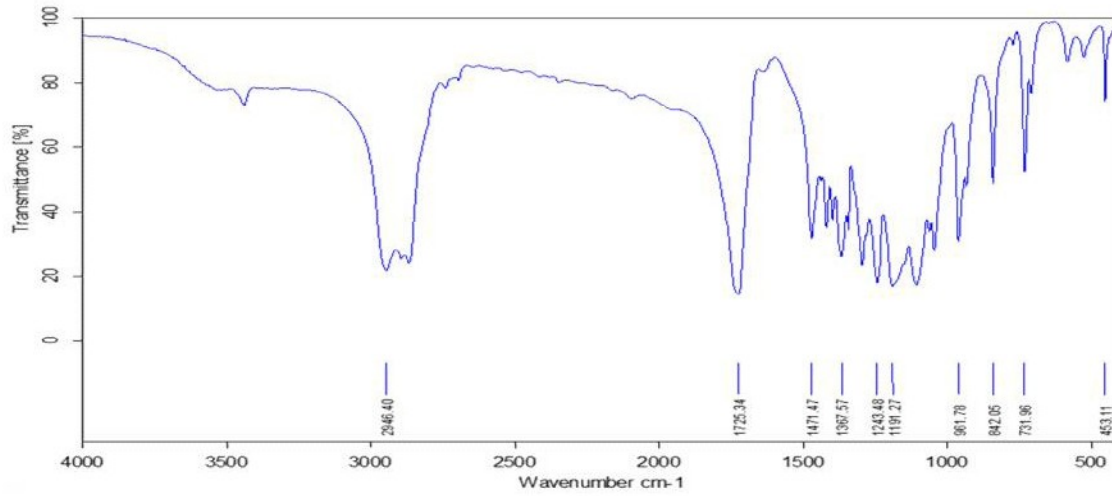
b Calculated from the first run of DSC

شکل ۳- طیف HNMR کوپلیمر PCL-PEG-PCL

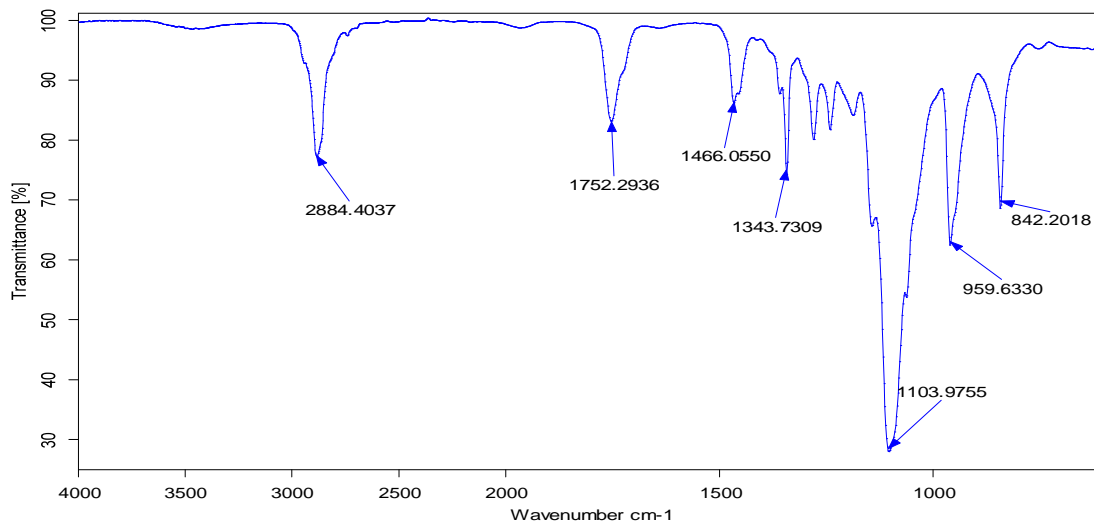


شکل ۴- طیف ۱ HNMR کوپلیمر mPEG-PCL

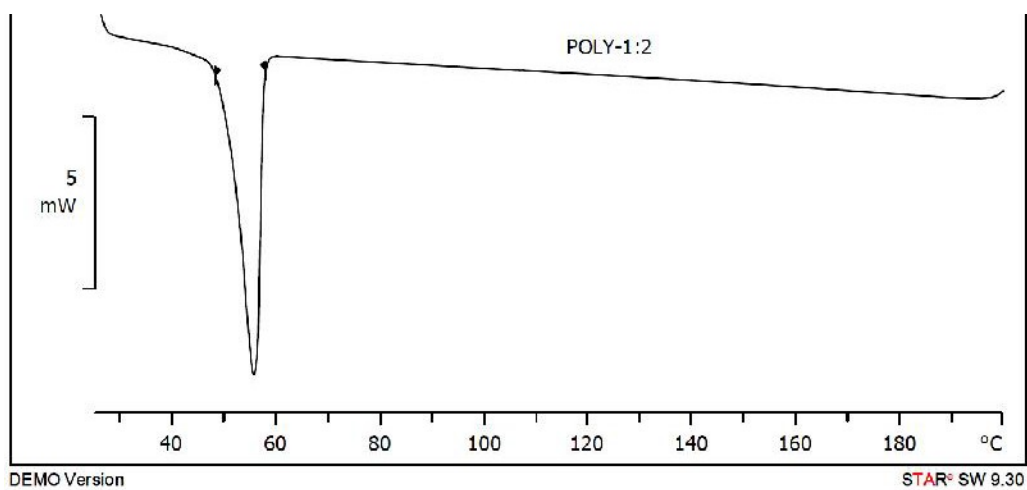




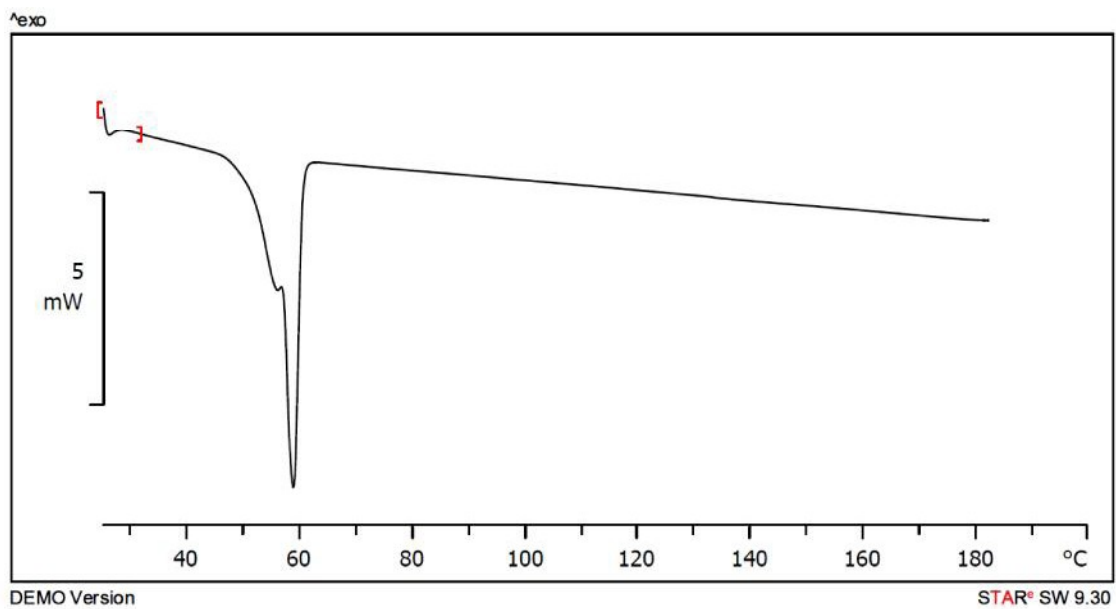
شکل ۵- طیف FT-IR کopolymer PCL-PEG-PCL



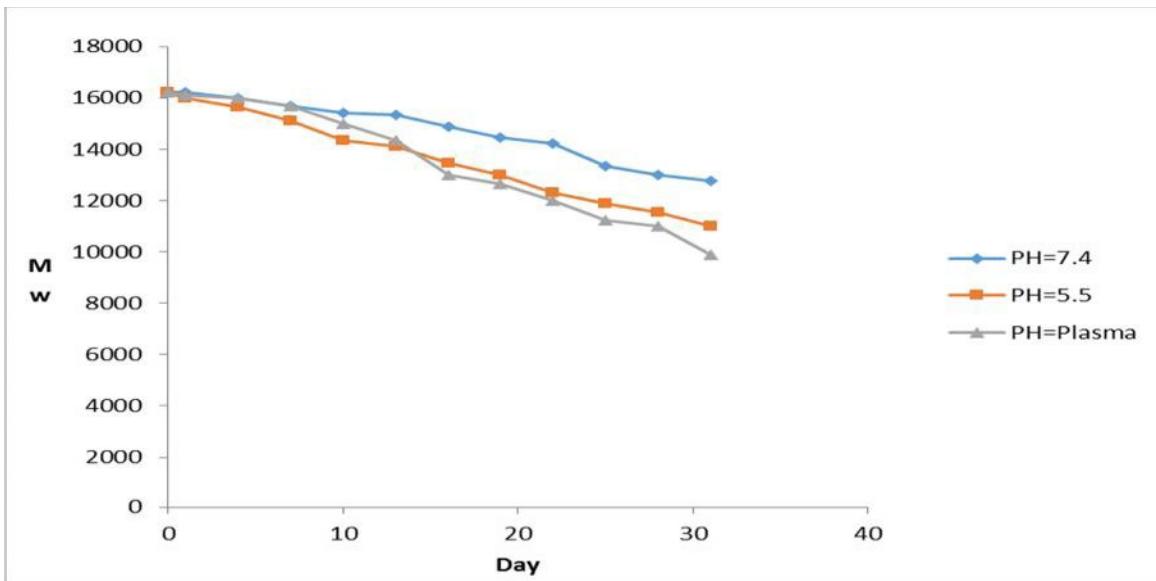
شکل ۶- طیف FT-IR کopolymer mPEG-PCL



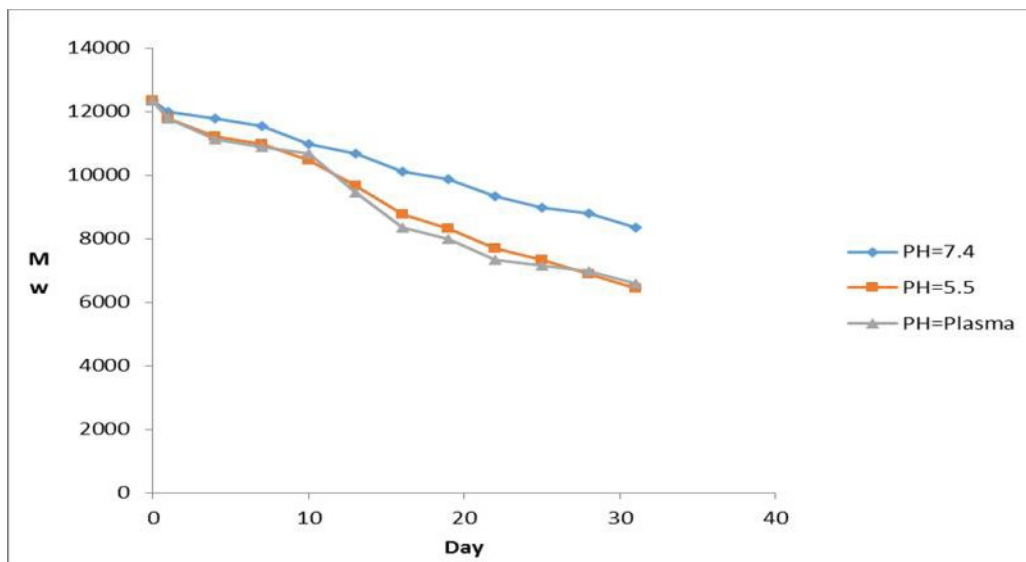
شکل ۷- طیف DSC مربوط به کوپلیمر PCL-PEG-PCL



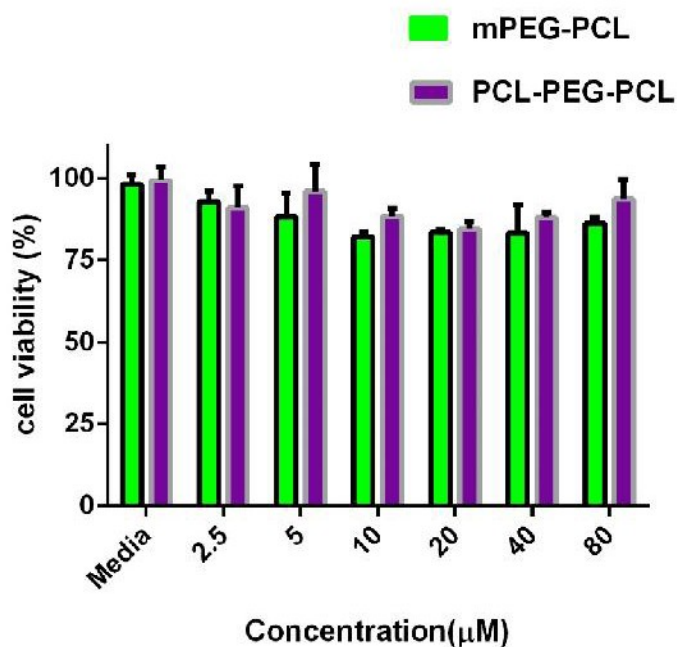
شکل ۸- طیف DSC مربوط به کوپلیمر mPEG-PCL



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



شکل ۱۱- منحنی IC<sub>50</sub> کopolymerهای سه تایی و دوتایی بر روی سلولهای سالم کلیه

### بحث

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 کopolymer می باشد. که این نتایج با مطالعات قبلی صورت گرفته در این رابطه مطابقت دارد (۱۶ و ۶). یافته های تخریب پذیری نشان می دهد که تخریب پذیری کopolymerهای 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 کopolymerهای 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 یافته های IC<sub>50</sub> برای هر

یافته های این پژوهش نشان می دهد که کopolymerهای دو تایی و سه تایی بطور کامل سنتز گردیده اند. همانطور که در بخش نتایج مشاهده گردید از طیف FT-IR و HNMR کopolymerهای دوتایی و سه تایی اینگونه استنتاج می شود که این کopolymerها بدرستی سنتز گردیده و نتایج بدست آمده از این طیفها با مطالعات قبلی برای سنتز این کopolymerها کاملاً منطبق می باشد (۱۶ و ۱۰). مطالعات قبل نشان داده است هوموپلیمرهای PEG و PCL که هر دو جزء پلیمرهای نیمه بلوری محسوب می شوند دارای نقطه ذوب در این محدوده می باشند (۱۸). با این وصف در طیف DSC کopolymerهای دوتایی و سه تایی رویداد حرارتی متعلق به دمای ذوب PEG و PCL دیده شده است که با مطالعات قبلی کاملاً همخوانی دارد (۶). پلی دیسپرسیته کopolymerهای

کوپلیمر این گونه استنتاج می شود که کوپلیمرهای دو تایی و سه تایی هیچ گونه سمیتی نداشته اند و کاملاً زیست سازگار هستند. که این مطالعه با مطالعات قبلی کاملاً منطبق می باشد (۲۰ و ۱۵). Zange و همکاران 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 فیروبلست L929 بررسی نمودند (۱۴). HU و همکاران در سال ۲۰۱۲ زیست تخریب پذیر کوپلیمرهای PEG-PLA و-PLGA را با تست MTT Assay بر روی سلولهای نرمال بررسی نمودند (۱۵).

### نتیجه گیری

کوپلیمرهای سه تایی PCL-PEG-PCL و دو تایی mPEG-PCL سنتز شده و از تکنیکهای مختلفی مانند، GPC، FT-IR، HNMR و DSC برای شناسایی آنها استفاده گردید و از این کوپلیمرها برای آزمایشات تخریب پذیری کوپلیمرها و زیست سازگاری پلیمرها استفاده گردید. نتایج نشان می دهد که این پلیمرها کاملاً زیست تخریب پذیر و کاملاً 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 Sulforaphane 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<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 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: A novel 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 vulgaris: In-vitro efficacy of lauric acid- loaded PCL-PEG-PCL on propionibacterium acne. *International Conference on Nanotechnology and Biosensors, 2015; IPCBEE 2 IACSIT Press, Singapore.*

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.