

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

Kheiri Manjili H., PhD¹, Danafar H., PhD², Sharafi A., PhD³

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 31st day, molecular weights of diblock and tri block Copolymers were 7852 and 9586 Dalton respectively. Based on IC₅₀, 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

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

حمیدرضا خیری منجیلی^۱، حسین دانافر^۱، علی شرفی^۲

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

۲. استادیار گروه نانوتکنولوژی دارویی داشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران (مولف مسؤول)، تلفن

ثبت: ۰۲۴-۳۳۴۷۳۶۳۵، danafar@zums.ac.ir

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

چکیده

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

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

یافته ها: نتایج HNMR و FTIR صحت تشکیل کوپلیمرهای سه تایی و دوتایی سنتز شده را تایید نموده و با استفاده از تکنیک DSC نقطه ذوب کوپلیمرهای سه تایی و دوتایی به ترتیب در 55°C و 68°C و 58°C باشد و همچنین این کوپلیمرها به ترتیب ارای جرم مولکولی میانگین 16000 و 12223 دالتون می باشد. تخریب پذیری این کوپلیمرها در محیط بافری صورت گرفت که در انتهای روز 31 جرم مولکولی پلیمر دوتایی و کوپلیمر 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 کوپلیمرهای دوتایی و سه تایی هیچ گونه سمیتی نداشته اند و کاملاً زیست سازگار هستند.

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

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

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

آنها در زمینه‌های مختلف بویژه دارورسانی شده است(۱۳و۱۴). از جمله‌ی این کوپلیمرها می‌توان به کوپلیمرهای PCL-PEG-PCL و mPEG-PCL اشاره کرد که به دلیل خاصیت دوگانه دوستی قادر است انواع ذرات پلیمری را با تغییر نسبت جزء آبگریز به آبدوست ایجاد کند(۱۱و۱۰). از خصوصیات بارز این کوپلیمرها زیست تخریب پذیری آنها می‌باشد که در محیط بدن به متabolیتهای غیر سمجح با قابلیت جذب در بدن تبدیل می‌شود(۱۶و۱۵). از این کوپلیمر برای ایجاد سیستم‌های حامل دارو، آهسته رهش استفاده می‌شود. کوپلیمرهای حامل دارو، آهسته رهش استفاده می‌شود. کوپلیمرهای PCL-PEG-PCL با رفتار دوگانه دوست برای تشکیل مایسل‌های با ساختار هسته-پوسته مورد استفاده قرار می‌گیرند(۱۷-۱۸). این حاملهای پلیمری به عنوان حامل داروهای آبگریز، باعث افزایش زمان گردش در خون و کاهش جذب نانوذرات توسط کبد می‌شوند(۲۳-۲۴). 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 دوتایی بر پایه پلی اتیلن گلیکول با پلی کاپرولاکتون را در سیستمهای *in vivo* در موش صحرایی بررسی نمودند(۱۱). با در نظر گرفتن مزايا و ويژگیهای نانوساختارهای 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 فرا روی محققین قرار دهد.

روش بررسی سترن کوپلیمر سه تایی PCL-PEG-PCL و دوتایی mPEG-PCL

مقدمه

واژه زیست تخریب پذیر یا Biodegradable به معنی موادی است که به سادگی توسط فعالیت موجودات زنده به زیروحدهای سازنده خود تجزیه شده و بنابراین در محیط باقی نمی‌مانند(۱). پلیمرهای زیست تخریب پذیر، مزایای متعددی نسبت به پلیمرهای غیر 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 سمجح است(۴). با توجه به خواص مکانیکی مناسب، آنها برای طیف گسترده‌ای از مشخصات مناسب هستند(۶و۵). نانو ذرات پلیمری که برای سیستم‌های داروسازی به کار می‌روند لازم است از پلیمرهای زیست تخریب پذیر^۱ 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 نحوه 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 پلی اتیلن گلیکول با پلی اتیلن اکسید، کیتوزان و پلیمرهای زیست تخریب پذیر طبیعی مانند ژلاتین، آلبومین، PEO(پلی کاپرولاکتون)، PLA(پلی لاكتیک اسید)، استرهای آلیفاتیک مانند PLGA(پلی گلیکولیک اسید) و گلیکولیک اسید) به طور کامل برای سیستم‌های دارورسانی مورد بررسی قرار گرفته‌اند(۱۰-۱۲). امروزه با توجه به ویژگی‌های متنوع و خاص کوپلیمرها توجه زیادی به کاربرد

^۱Biodegradable

DSC استفاده شد. نمونه‌ها با سرعت $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ حرارت داده شده و اندازه گیری در محدوده $200^{\circ}-250^{\circ}$ 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 تراهیدروفوران 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 g/mol تا 2900 g/mol رسم شده، جرم مولکولی و پلی دیسپرسیتی کوپلیمر سنتز شده محاسبه شد. برای انجام آنالیز GPC از دستگاه Knaure ساخت آلمان با دتکتور ضربی شکست با یک ستون با مشخصات $4.6^{\ast}30\text{ mm}$ و فاز متحرکی که شامل تراهیدروفوران است استفاده گردید.

تخریب پذیری پلیمرها در محیط خارج ازiden: ابتدا یک محلول آلی با مقدار وزن ۵ گرم از هر کدام از کوپلیمرها در 100 ml لیتر کلروفرم تهیه گردید و این محلول تحت هم زدن با دور 1500 rpm اضافه می‌شود. هم زدن تا تبخیر کامل حلال آلی در دمای اتاق ادامه پیدا کرده تا مدت 48 ساعت در دمای محیط نگهداری شده سپس با استفاده از فریزدرایر در دمای -72°C و در فشار 40 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 ml بافر فسفات با $\text{pH}=7/40$ ظرف محتوى بافر و پلیمر در دستگاه شیکرانکوباتور در دمای 37°C قرار داده و در زمان‌های مشخص یک قسمت از محلول برداشته، و با بافر تازه جایگزین و مقدار جرم پلیمر را با GPC اندازه گیری نموده، هر یک از اندازه گیری‌ها را سه مرتبه تکرار کرده و میانگین این سه داده برای محاسبه جرم مولکولی تخریب شده استفاده گردید. این کار برای محیط بافر فسفات با $\text{pH}=5/50$ انجام گرفت.

نوع مطالعه از نوع مطالعات آزمایشگاهی بوده که زیر شاخه مطالعه تجربی می‌باشد که کاربرد این مطالعه در زیست‌فن آوری و همچنین مطالعات کشت سلولی می‌باشد. 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 3 g از PEG با جرم مولکولی 6000 g/mol در داخل یک بالن دو دهانه وارد کرده و تحت خلاء و دمای 80°C به مدت 30 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°C رسانده شد. در ادامه 6 g از مونومر کاپرولاکتون را به ظرف واکنش اضافه کرده و بعد از ذوب شدن کامل کاپرولاکتون، کاتالیست را به اندازه 1 ml به آن افزوده و اجازه داده شد تا واکنش در دمای 120°C به مدت 12 ساعت پیش رو سپس سیستم را سرد کرده و کوپلیمر را داخل کلروفرم حل و در داخل دی اتیلن 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 و PCL-PEG-PCL:

کوپلیمرهای دوتایی mPEG-PCL برای تعیین ساختار کوپلیمر سه تایی PCL-PEG-PCL و کوپلیمرهای دوتایی mPEG-PCL از دستگاه ^1H NMR استفاده شده است. طیف‌های ^1H NMR با دستگاه Bruker 400 MHz استفاده شده است. طیف‌های ^{13}C NMR با دستگاه Bruker 25°C گرفته شدند. کلروفرم دوتره (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، استفاده از دستگاه اسپکتروسکوپی Bruker) ثبت گردید. برای مطالعه رفتار حرارتی از آنالیز

می باشد. ساختار و ترکیب کوپلیمرهای سنتز شده توسط $^1\text{H-NMR}$ در حلال CDCl_3 تعیین شد و در شکل ۴ و ۵ طیف آنها آورده شده است. برای کوپلیمر سه تایی همانطور که در طیف H-NMR (شکل ۳) دیده شده است وجود پروتونهای متیلن (CH_2) مربوط به جزئی PCL در $4.06, 1.3 \text{ ppm}, 1.6 \text{ ppm}, 2.2 \text{ ppm}$ مشاهده گردید و همچنین پروتونهای متیلن (CH_2) ppm مشاهده گردید و همچنین PEG در 3.63 ppm به صورت پیک یکتاپی ظاهر شد. همچنین جرم مولکولی کوپلیمر محاسبه شده توسط $^1\text{H NMR}$ (شکل ۱) می باشد. در طیف H-NMR کوپلیمر mPEG-PCL همانطور که در شکل ۴ مشاهده می شود وجود پیک در ناحیه $3.64, 3.38 \text{ ppm}$ به صورت پیک در 1.6 ppm و 1.3 ppm مربوط به گروه متوكسی و گروههای متیل PEG است. کاپرولاکتون است. در طیف FT-IR کوپلیمر- PCL (شکل ۵) نوارهای جنبی تیز و شدیدی در فرکانس‌های 1725 cm^{-1} و 1191 cm^{-1} مشاهده می گردد که به ترتیب وجود گروههای کربوکسیلیک استری (C=O) و گروههای اتری (C-O-C) را در ساختار کوپلیمر تائید می کند و نشان دهنده تشکیل کوپلیمر- PCL می باشد. از طیف FTIR مربوط به کوپلیمر PEG-PCL می توان اینگونه برداشت کرد که نوار جنبی در فرکانس 1106 cm^{-1} و 1240 cm^{-1} مربوط به پیوندهای کششی (C-O) می باشد. نوار جنبی تیز و شدیدی که در فرکانس 1752 cm^{-1} مشاهده می شود وجود گروههای استری کربونیل (C=O) را تأیید می کند و نشان دهنده تشکیل کوپلیمر mPEG-PCL می باشد. هیدروؤن‌های متیلن ($-\text{CH}_2-$) یک جذب C-H کششی می دهد که مربوط به جذب‌های کششی متقاضی می باشد، که در 2884 cm^{-1} جذب می دهد (شکل ۶). طیف DSC مربوط به کوپلیمرهای PCL-PEG-PCL در شکل ۷

و همچنین محیط پلاسمای تازه انسانی نیز انجام شد. نتایج اندازه گیری برای همه پلیمرها بصورت جداگانه انجام شد. تعیین سمیت سلولی کوپلیمرها بر روی سلول‌های نرم‌مال کلیه (HEK 293) (بوسیله MTT): هنگامی که سلول‌های موجود در ظرف کشت حدود ۸۰ درصد سطح ظرف خود را پوشانده بودند تریپسینه شده و سوسپانسیون سلولی حاصله بعد از شمارش سلولی به روش تریپان بلوبه تعداد ۱۰۰۰ سلول با حجم نهایی $1 \mu\text{l}$ در هر یک از چاهه‌های پلیت ۹۶ خانه برای ۶ غلظت دارویی و برای هر غلظت ۵ خانه کاشته شد. بعد از حدود ۲۴ ساعت از کشت سلول‌های مورد نظر تعویض محیط کشت با محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف کوپلیمرهای دوتایی و سه تایی (در رنج $2/5$ تا $80 \mu\text{M}$) انجام گرفت. بعد از ۵ روز به هر خانه حاوی محیط کشت $1 \mu\text{l}$ از محلول MTT افزوده شد سپس پلیت به مدت ۳ تا ۴ ساعت در انکوباتور 37°C درجه قرار داده شد بعد محیط کشت را خالی نموده و به هر خانه $1 \mu\text{l}$ از محلول DMSO اضافه گردید سپس جذب کریستال‌های بنفش رنگ حل شده فورمازان توسط دستگاه Tecan Plate Reader مدل 570 nm در طول موج 5630 nm خوانده شد. با استفاده از نتایج بدست آمده میزان IC_{50} برای کوپلیمرها محاسبه گردید که این بیانگر سمیت سلولی ترکیب می باشد.

داده‌ها با نرم افزار Graphpad prism آنالیز گردید. برای محاسبه IC_{50} از non-linear Regression استفاده شده است. تست Duncan با نرم افزار Graphpad prism استفاده می گردد.

یافته‌ها

بررسی ویژگیهای کوپلیمرهای سه تایی و دوتایی: شماتیک سنتز کوپلیمرهای دو تایی و سه تایی به ترتیب در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. میزان راندمان کوپلیمر سه تایی و دوتایی تشکیل شده به ترتیب در حدود 82% و 78%

مربوط به جزئ 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 پلاسمما 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 IC₅₀ برای هر ترکیب رسم شد که این منحنی در شکل ۱۱ آورده شده است. IC₅₀ برای هر کوپلیمر محاسبه شده است. از روی میزان IC₅₀ 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.

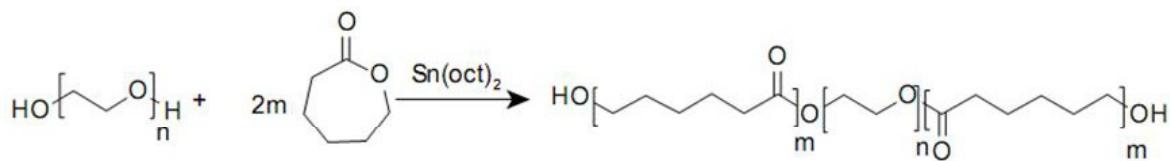
نشان داده شده است. برای کوپلیمر PCL-PEG-یک پیک گرم‌گیر در ۵۵°C ۵۸/۶۸°C مشاهده می گردد که حاصل از نمونه، در محدوده‌ی ۱۱/۱۰ KDa می باشد که یک پیک گرم‌گیر است.

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

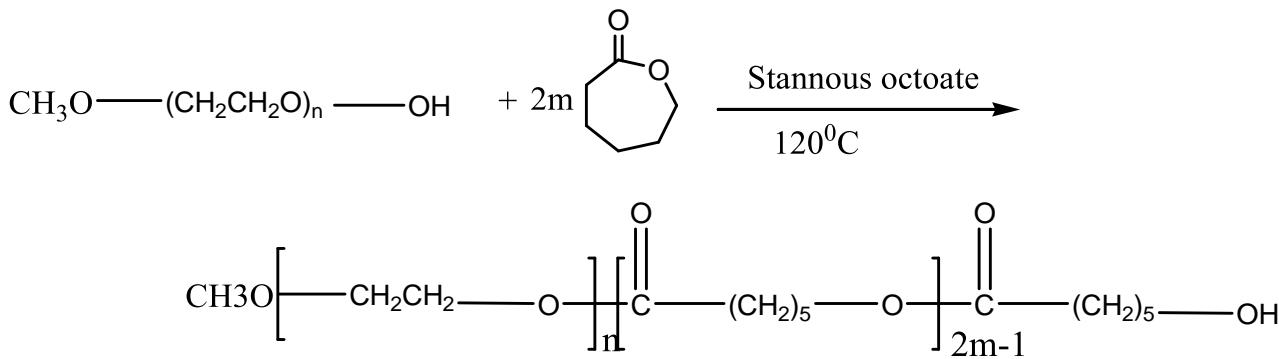
برای کوپلیمر دوتایی سنتز شده آنالیز GPC برای متوسط جرم مولکولی وزنی و متوسط جرم مولکولی عددی به ترتیب مقادیری برابر با ۱۲/۲۳ و ۱۱/۱۰ KDa را نشان می دهد و مقدار پلی دیسپرسیتی بدست آمده ۱/۱۰ می باشد و برای کوپلیمر سه تایی متوسط جرم مولکولی عددی و متوسط جرم مولکولی وزنی به ترتیب مقادیری برابر با ۱۵ و ۱۶ KDa را نشان می دهد و مقدار پلی دیسپرسیتی بدست آمده ۱/۱۰۲ می باشد. در جدول ۱ خصوصیات کوپلیمرهای سنتز شده نشان داده شده است.

بررسی زیست تخریب پذیری کوپلیمرهای PCL-PEG 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 پلاسمما بعلت وجود آنزیمهای استراز شکستن پیوندهای کربوکسیل لاکتیک اسید بهتر بوده و تخریب پذیری بیشتری صورت گرفت که در انتهای روز ۳۱ جرم مولکولی پلیمر در حدود ۹۵۸۶ دالتون می باشد و در PH اسیدی نیز نسبت به محیط



شکل ۱- مسیر سنتر کوپلیمر



شکل ۲- مسیر سنتر کوپلیمر دوتایی

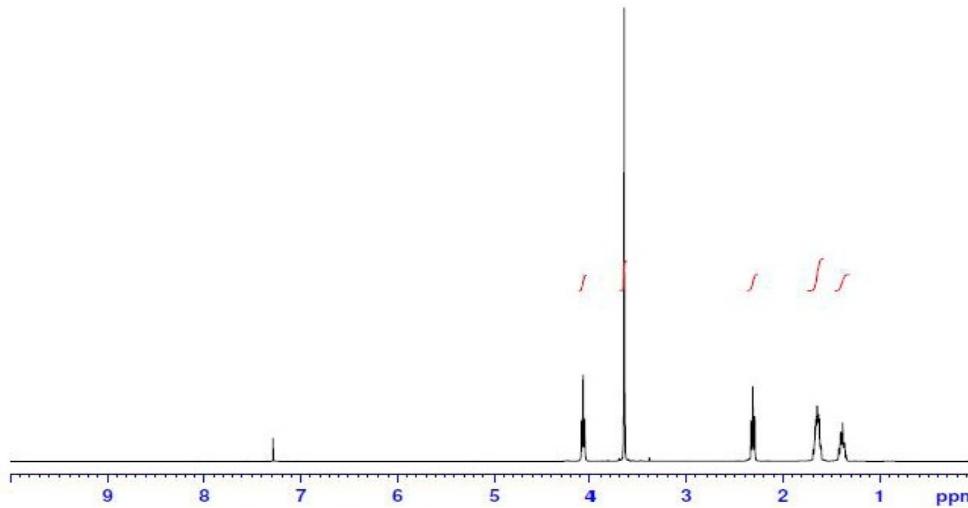
جدول ۱- خصوصیات کوپلیمرهای سه تایی و دوتایی سنتر شده

Copolymer	Mw ^a (KDa)	Mn ^a (KDa)	T _m (°C) ^b	CL / EG feed	DP _{PEG}	DP _{PCL}
PCL-PEG-PCL	16	15	55.00	2	136.36	87.61
mPEG-PCL	12.23	11.10	58.68	2	113.63	71.14

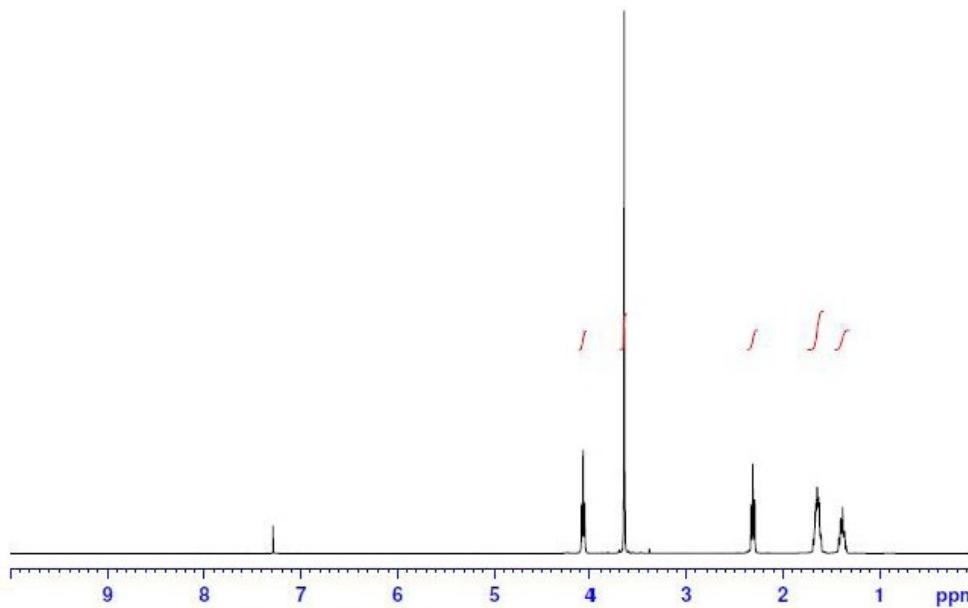
a Determined by GPC analysis using narrow molecular weight polystyrene standards.

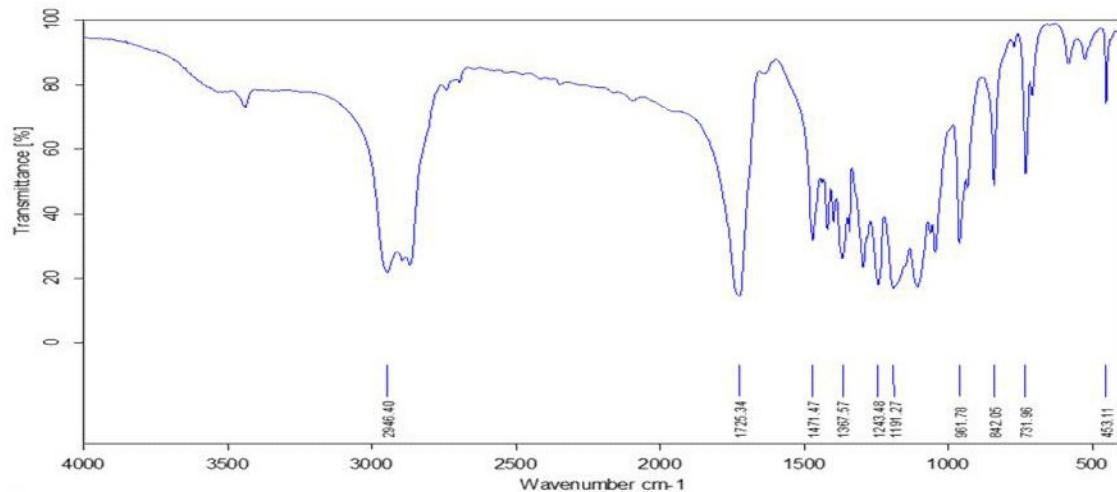
b Calculated from the first run of DSC

شکل ۳- طیف HNMR کوپلیمر PCL-PEG-PCL

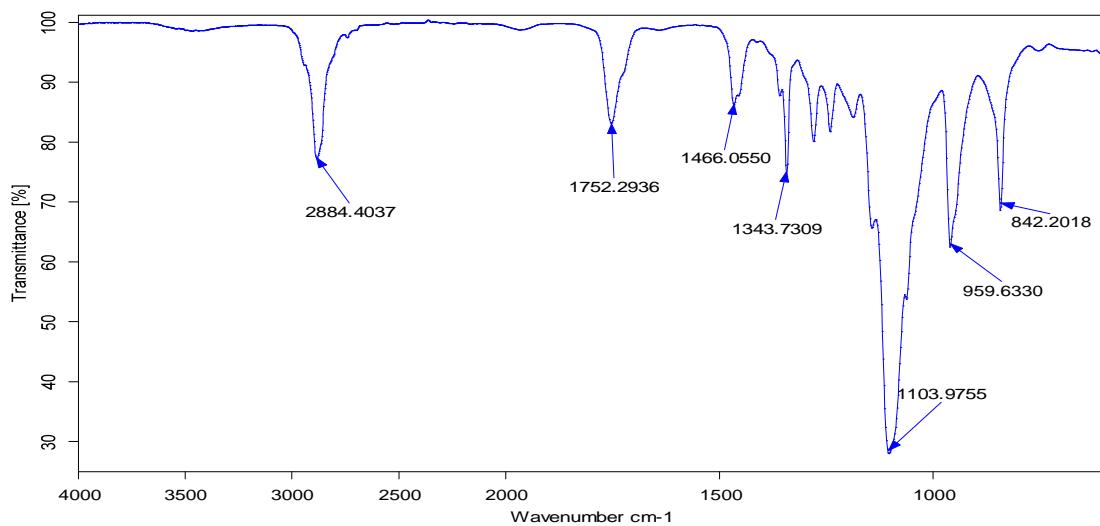


شکل ۴- طیف HNMR کوپلیمر mPEG-PCL

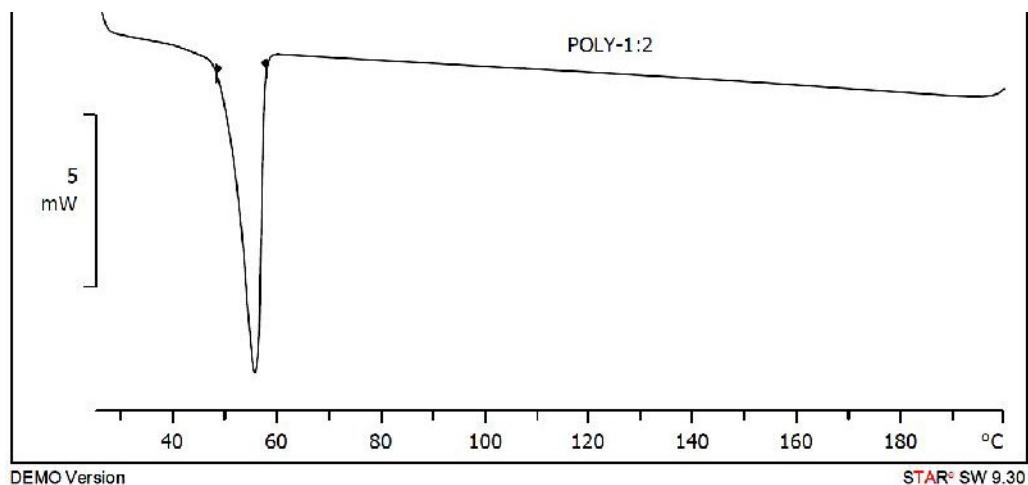




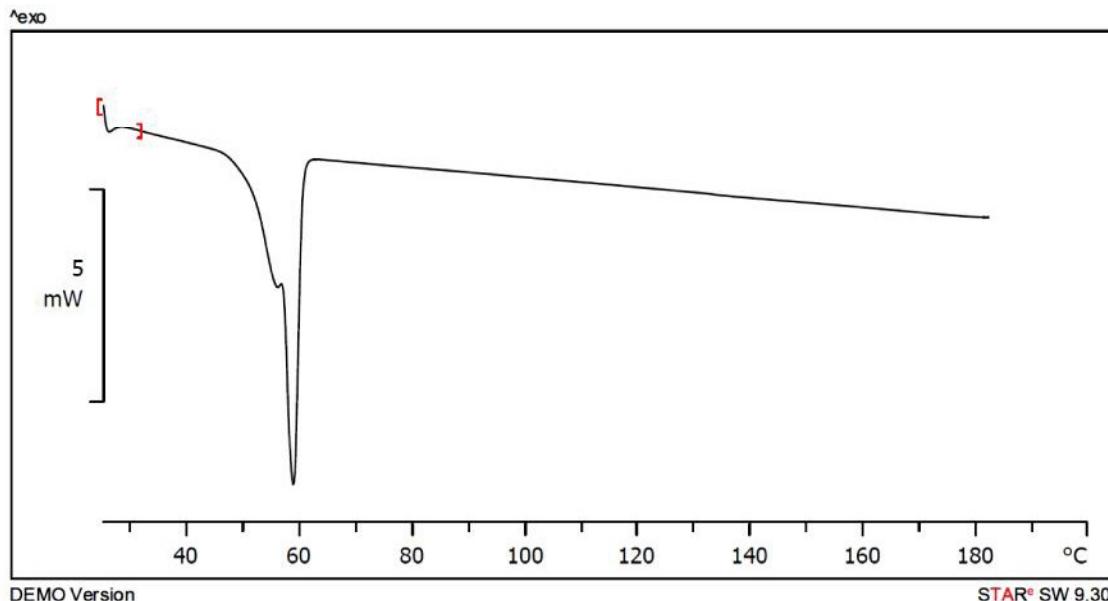
شکل ۵- طیف FT-IR کوپلیمر PCL-PEG-PCL



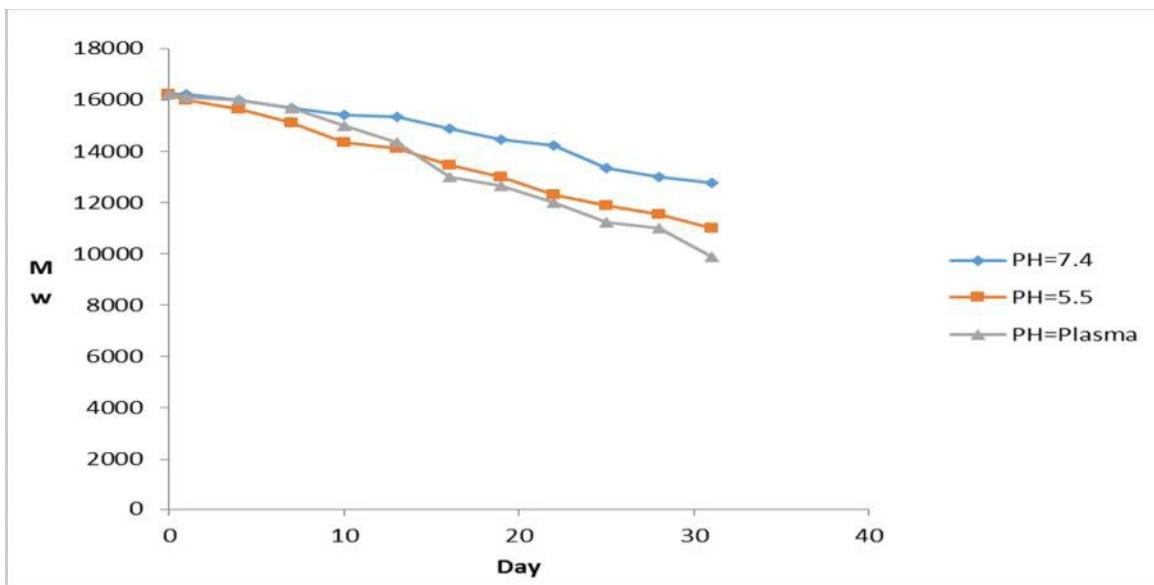
شکل ۶- طیف FT-IR کوپلیمر PCL-PEG-m



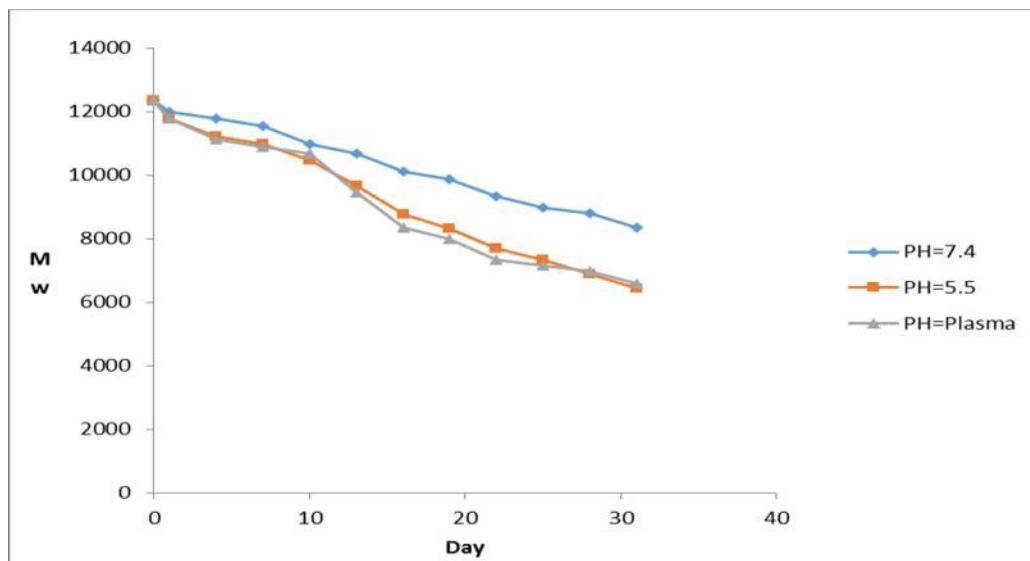
شکل ۷- طیف DSC مربوط به کوپلیمر PCL-PEG-PCL



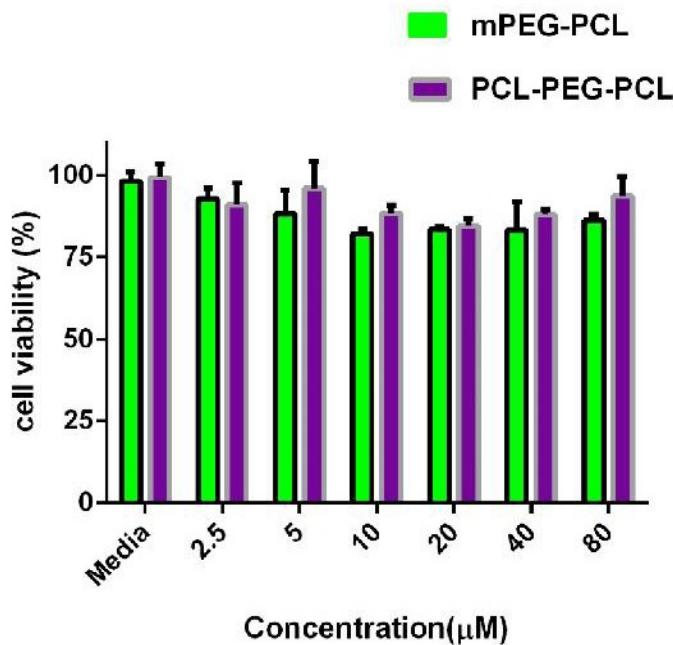
شکل ۸- طیف DSC مربوط به کوپلیمر mPEG-PCL



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



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



شکل ۱۱- منحنی IC₅₀ کوپلیمرهای سه تایی و دوتایی بر روی سلولهای سالم کلیه

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 PCL و mPEG و اکنش نکرده می باشد و این پیک نشان از خلوص کوپلیمر می باشد. که این نتایج با مطالعات قبلی صورت گرفته در این رابطه مطابقت دارد(۱۶و۱۷). یافته های تخریب پذیری نشان می دهد که تخریب پذیری کوپلیمرهای دوتایی و سه تایی در محیطهای اسیدی خیلی بیشتر از محیطهای بازی می باشد و این علت که در محیطهای اسیدی تحت تاثیر اسید پیوندهای استری به محیط اسیدی حساس بوده و تخریب پذیری راحتر صورت می گیرد(۱۸). همچنین تخریب پذیری کوپلیمرهای دوتایی و سه تایی در محیطهای پلاسمای انسانی بعلت وجود آنزیمهای استراز شکستن پیوندهای کربوکسیل لاکتیک اسید بهتر بوده و تخریب پذیری بیشتری صورت گرفت. از یافتهای IC₅₀ برای هر

بحث

یافته های این پژوهش نشان می دهد که کوپلیمرهای دو تایی و سه تایی بطور کامل سنتز گردیده اند. همانطور که در بخش نتایج مشاهده گردید از طیف HNMR و FT-IR کوپلیمرهای دوتایی و سه تایی اینگونه استنتاج می شود که این کوپلیمرها بدرستی سنتز گردیده و نتایج بدست آمده از این طیفها با مطالعات قبلی برای سنتز این کوپلیمرها کاملاً منطبق می باشد(۱۰و۱۶). مطالعات قبل نشان داده است که هر دو جزء پلیمرهای PEG و PCL که هموپلیمرهای PEG و PCL محسوب می شوند دارای نقطه ذوب در این نیمه بلوری محسوب می باشند(۱۸). با این وصف در طیف DSC محدوده می باشند(۱۸). کوپلیمرهای دوتایی و سه تایی رویداد حرارتی متعلق به دمای ذوب PEG و PCL دیده شده است که با مطالعات قبلی کاملاً همخوانی دارد(۱۸). پلی دیسپرسیتی کوپلیمرهای

نتیجه گیری

کوپلیمرهای سه تایی PCL-PEG-PCL و دو تایی mPEG-PCL متزر شده و از تکنیکهای مختلفی مانند، HNMR، FT-IR، GPC و DSC رای شناسایی آنها استفاده گردید و از این کوپلیمرها برای ازمایشات تخریب پذیری کوپلیمرها و زیست سازگاری پلیمرها استفاده گردید. نتایج نشان می دهد که این پلیمرها کاملا زیست تخریب پذیر و کاملا زیست سازگار هستند.

تقدیر و تشکر

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

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

Reference

- 1.Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010; 75:1-18.
- 2.Tian G, Li Y, Yuan Q, Cheng L, Kuang P, Tang P. The stability and degradation kinetics of Sulforaphene in microcapsules based on several biopolymers via spray drying. *Carbohydrate Polymers* 2015; 122: 5-10.
- 3.Ke X, Ng VWL, Ono RJ, Chan JM, Krishnamurthy S, Wang Y, Hedrick JL, et al. Role of non-covalent and covalent interactions in cargo loading capacity and stability of polymeric micelles. *J Control Release* 2014; 193:9–26.
- 4.Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010; 75:1-18.
- 5.Manjili HK, Ma'mani L, Tavaddod S, Mashhadikhan M, Shafiee A, Naderi-Manesh HD. L-Sulforaphane loaded Fe₃O₄ gold core shell nanoparticles: A potential sulforaphane delivery system. *PloS one* 2016; 11:e0151344.
- 6.Danafar H. Study of the composition of polycaprolactone/poly (ethylene glycol)/polycaprolactone copolymer and drug-to-polymer ratio on drug loading efficiency of curcumin to nanoparticles. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2016 doi: 10.17795/jjnpp-34179
- 7.Chen W, Zhang JZ, Hu J, Guo J.H , Yang Q.S. Preparation of amphiphilic copolymers for covalent loading of paclitaxel for drug delivery system. *J Polym Sci A Polym Chem* 2014; 52:366–374.
- 8.Danafar H, Rostamizadeh K, Davaran S, Hamidi M. Drug-conjugated PLA-PEG- PLA copolymers: Anovel approach for controlled delivery of hydrophilic drugs by micelle formation. *Pharm Dev Technol* 2015; DOI: 10.3109/10837450.2015.1125920
- 9.Keng. C, Chao C, Ming H, Chun H. The nanoparticles for combating acne vulgairs: In-vitro efficacy of lauric acid- loaded PCL-PEG-PCL on propionbactrium acne. International Conference on Nanotechnology and Biosensors, 2015; IPCBEE 2 IACSIT Press, Singapore.

- 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.