گروه شیمی

گرایش شیمی آلی

سنتز پلی اتیلن ایمین (با وزن مولکولی ۱۸۰۰ دالتون) اصلاح شده با مشتقات برموآلکان و بررسی اثر طول زنجیره هیدروفوب مشتق برمو آلکان بر روی خصوصیات نانولیپوزوم های حاوی لیپوپلیمر تهیه شده

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته شیمی آلی

استاد راهنما:

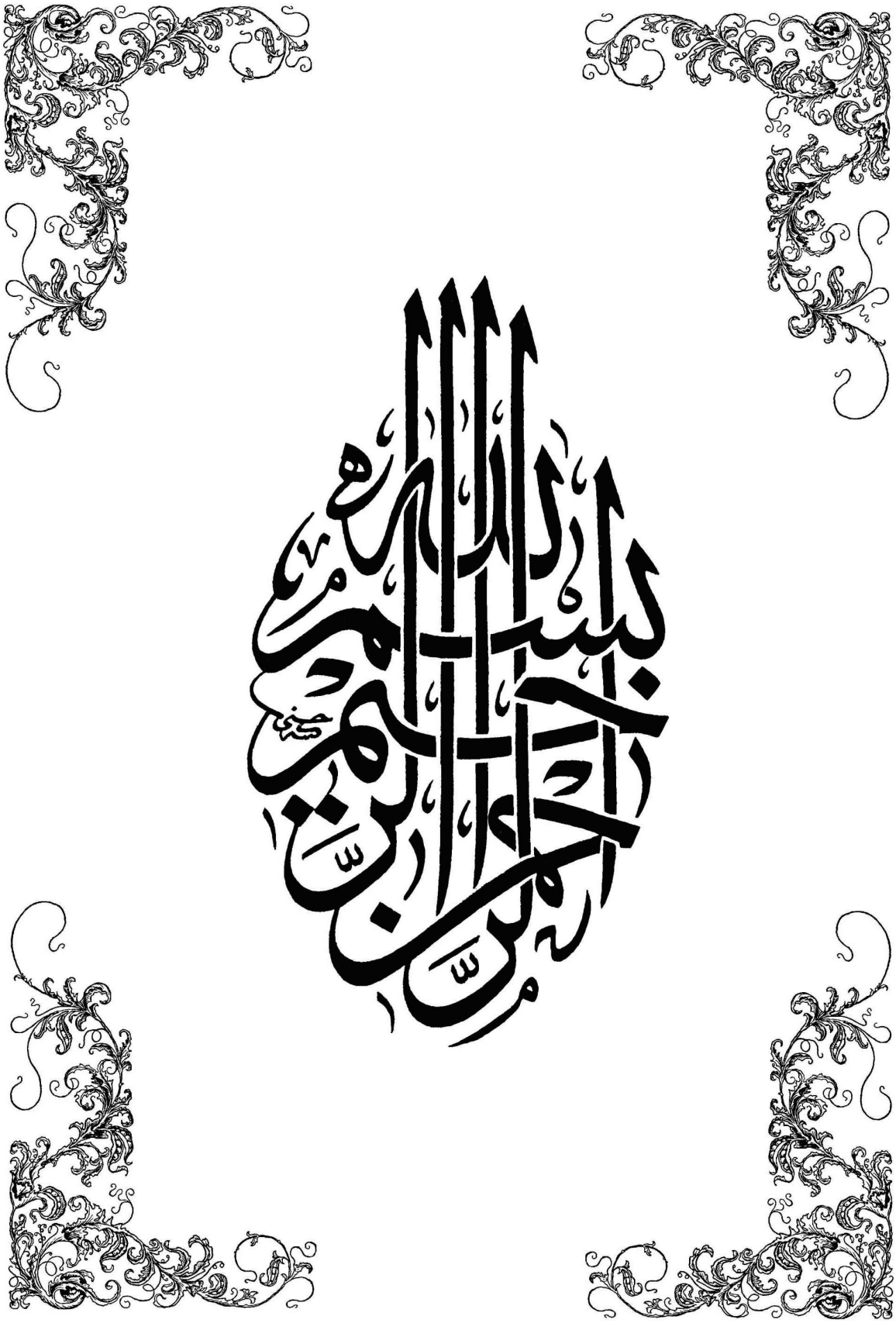
دکتر بیژن ملائکه نیکویی

استاد مشاور:

دکتر عبدالحسین مسعودی

تهیه و تنظیم :

محمدرضا بقایری پور



فصل اول مقدمه و اصول تئوری

۱-۱ روش‌های انتقال ژن ٤

۱-۱-۱ حامل‌های بیولوژیکی (ویروس‌ها) ٤

۱-۱-۱ آدنو ویروس‌ها ٤

۱-۱-۳ رترو ویروس‌ها ٥

۱-۱-٤ هرپس سیمپلکس ویروس (HSV) ٥

۱-۱-٥ Adeno-associated ویروس‌ها ٥

۱-۱-٦ پاکس ویروس‌ها ٥

۱-۱-۷ حامل‌های غیربیولوژیک ٦

۱-۱-۷-۱ پلیمرهای کاتیونی ٦

۱-۱-۷- ۲پلی ال لیزین (PLL) ۷

۱-۱-۷-۳کیتوزان ۸

۱-۱-۷-٤ دندریمرها ۸

۱-۱-۷-٥ پلی اتیلن ایمین ۹

۱-۱-۷-٦ پپتیدهای کاتیونی ۹

۱-۱-۷-۷ لیپیدهای کاتیونی ۱۰

۱-۱-۷-۸ سیستم های ژن رسانی بر پایه ی میسل های حاوی کمپلکس پلی الکترولیتی ۱۰

۱-۲ ورود پلی پلکس به سلول ۱۳

۱-۲-۱ آماده سازی ژن برای ورود به سلول ۱۳

۱-۲-۲ عبور پلی‌پلکس از غشاء و ورود به سلول ۱۵
۱-۲-۲-۱ فاگوسیتوز ۱۵
۱-۲-۲-۲ ماکروپینوسیتوز ۱۵
۱-۲-۲-۳ اندوسیتوز با واسطه کلاترین (CME) ۱۶
۱-۲-۲-٤ اندوسیتوز با واسطه Caveolae ۱۶
۱-۲-۲-۵ اندوسیتوز با واسطه گیرنده ۱۶
۱-۲-۳ پلی پلکس در داخل سلول (مراحل داخل سیتوزولی) ۱۷
۱-۲-۳-۱ پدیده اسفنج پروتونی ۱۷
۱-۲-۳-۲ ورود پلی پلکس به داخل هسته ۱۹
۱-۳ مشکلات موجود فرا روی ژن درمانی ۲۰
۱-۳-۱ موانع بیولوژیک ۲۰
۱-۳-۲ برهمکنش‌های غیراختصاصی ۲۰
۱-۳-۳ سمیت سلولی ۲۱
۱-۳-٤ تحریک سیستم ایمنی ۲۱
فصل دوم پلی‌اتیلن ایمین وکتوری غیر بیولوژیک
۲-۱ ساختمان پلی اتیلن ایمین ۲۳
۲-۱-۱ پلی اتیلن ایمین خطی (l-PEI) ۲۳
۲-۱-۲ پلی اتیلن ایمین شاخه‌دار (b-PEI) ۲٤
۲-۲ کارایی ترانسفکشن با PEI ۲۵

۲-۲-۱ اندازه ذره‌ای ۲۵
۲-۲-۲ وزن مولکولی پلیمر ۲۵
۲-۲-۳ میزان شاخه‌دار بودن پلیمر ۲۶
۲-۲-٤ بار سطحی پلی پلکس ۲۶
۲-۳ اصلاحات ساختاری PEI ۲۷
۲-۳-۱ هیدروفوب کردن ۲۷
۲-۳-۲ پوشاندن ۲۷
۲-۳-۲-۱ پگیلاسیون ۲۸
۲-۳-۲-۲ ترانسفرین ۲۸
۲-۳-۲-۳ دکستران ۲۹
۲-۳-۲-٤ پلورونیک ۲۹
۲-۳-۳ هدفمند کردن ۲۹
۲-۳-۳-۱ ترانسفرین ۳۰
۲-۳-۳-۲ گلیکوزیله کردن پلی پلکس ۳۰
۲-۳-۳-۳ فولات ۳۱
۲-۳-۳-٤ آنتی‌بادی‌ها ۳۱
۲-۳-۳-۵ اینتگرین‌ها ۳۱
۲-۳-۳-٦ فاکتورهای رشد ۳۱

فصل سوم مواد و دستگاهها

۳-۱ مواد لازم ۳۳

۳-۲ دستگاههای لازم ۳٤
۳-۳ وسایل لازم ۳٤

فصل چهارم روش کار

٤-۱ سنتز محصولات ۳٦
٤-۱-۱ پوشش ٪۱۰ آمین‌های نوع اول ۳٦
٤-۱-۲ پوشش ٪۳۰ آمین‌های نوع اول ۳۷
٤-۲ سنتز مشتق حاصل از برومودکان و PEI با وزن مولکولی PEI ۱۸۰۰Da ۳۹
٤-۲-۱ پوشش ۱۰٪ آمین های نوع اول ۳۹
٤-۲-۲ پوشش ۳۰٪ آمین‌های نوع اول ۳۹
٤-۳ سنتز مشتق حاصل از برومو اکتادکان و PEI ۱۸۰۰Da ٤۰
٤-۳-۱ پوشش ۱۰٪ آمین‌های نوع اول ٤۱
٤-۳-۲ پوشش ۳۰٪ آمین‌های نوع اول ٤۱
٤-٤ تهیه لیپوزوم کاتیونی از پلیمر PEI اصلاح شده و فسفولیپید ٤۲
٤-٤-۱ تهیه لیپوزوم با استفاده از لیپوپلیمر ٪۱۰ PEI – ٦c ٤۳
٤-٤-۲ تهیه لیپوزوم با استفاده از لیپوپلیمر ٪۳۰ PEI – ٦c ٤٤
٤-٤-۳ تهیه لیپوزوم با استفاده از لیپوپلیمر ٪۱۰ PEI – ۱۰c ٤٤
٤-٤-۳ تهیه لیپوزوم با استفاده از لیپوپلیمر ۳۰ ٪ PEI – ۱۰c ٤٥
٤-٤-٦ تهیه لیپوزوم با استفاده از لیپوپلیمر٪۳۰ PEI – ۱۸c ٤٦

٤-٦ ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی وکتورها ٤٧
٤-٧ آزمون TNBS٢, ٤, ٦ Trinitrobenzene sulfonic acid ٤٧
٤-٨ تهیه بافربورات ٤٨
٤-٩ تهیه محلول استوک استاندارد ٤٨
٤-١٠ تهیه غلظت های مناسب از محلول استوک استاندارد ٤٨
٤-١١ تهیه غلظت های مناسب از محلول استوک نمونه‌ها ٤٩
٤-١٢ تهیه معرف (picrylsul fonicacid ٥٪) ٤٩
٤-١٣ آزمون اتیدیوم بروماید (Et – Br , Exclusion assay) ٥٠
٤-١٣-١ -تهیه بافر HBG (HEPES – buffered glucose) ٥٠
٤-١٣٢-- روش تهیه بلانک ٥٠
٤-١٣٣-- روش انجام آزمون ٥١
٤-١٤ تعیین اندازه و پتانسیل زتای لیپوپلی پلکس‌ها ٥٢
٤-١٥ ارزیابی خصوصیات بیولوژیکی لیپوپلی پلکس ٥٢
٤-١٦ ترانسفکشن ٥٣
٤-١٦-١ کاشتن (seed) سلولها ٥٣
٤-١٦-٢ آماده کردن پلی لیپولکس ٥٤
٤-١٦-٣ اندازه‌گیری میزان ترانسفکشن ٥٧
فصل پنجم نتایج
٥-١ نتایج آزمون ها ٥٩
٥-١-١ نتایج آزمون اتیدیوم بروماید بر روی محصولات ٥٩

۵-۱-۲ نتایج آزمون TNBS بر روی محصولات..... ۶۳

۵-۱-۲-۱ نتیجه آزمون TNBS بر روی محصولات ٪۱۰-PEI_۶C، ٪۱۰-PEI_۱۰C و ٪۱۰-PEI_۱۸C ۶۳

۵-۲-۳ نتایج آزمون تعیین سایز و پتانسیل زتای لیپو پلی پلکس‌ها ۶۷

۵-۲-٤ نتیجه آزمون Transfection ۷۲

۵-۲-۵ نتیجه آزمون سمیت سلولی ۷۵

فصل ششم بحث

۶-۱ـ سایز لیپوپلی پلکس‌ها ۷۹

۶-۲ـ پتانسیل زتای لیپوپلی پلکس‌ها..... ۸۱

۶-۳ـ ترانسفکشن ۸۲

مراجع..... ۸۷

داده های خام ۹۹

فصل اول

مقدمه و اصول

تئوری

مقدمه

ژن را می‌توان کدی دانست که تمامی اطلاعات زیستی سلول را جهت فعالیت بهینه در خود جای داده است. سنتز پروتئین از روی ژن، در واقع بیان آن کدهای اطلاعاتی، در راستای حفظ ساختار و عملکرد طبیعی سلول و در نهایت حفظ حیات می‌باشد. از سوی دیگر بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی همچون سیستیک فیبروزیس، تالاسمی، هموفیلی و غیره را نتیجه تغییراتی در ژن می‌دانیم که طبق بیان فوق، این تغییرات، عملکرد طبیعی سلول را مختل می‌کنند. تغییراتی که گاه با جزئی بودنشان اثر بسیار بزرگ بر روند فعالیت‌های سلول گذاشته و گاه در عین بزرگ بودن تغییرات، اثر اندکی بر این روند گذاشته‌اند. توجه به این مسئله که اصلاح ژن معیوب در این بیماری‌ها تنها راه درمان اساسی و ریشه‌ای می‌باشد، ما را به سمت اهمیت ژن درمانی رهنمون می‌سازد. زیرا ژن درمانی اصلاح ماده ژنتیکی سلول زنده جهت پیش‌گیری، درمان و یا تشخیص بیماری‌های انسانی، می‌باشد[۱].

ژن درمانی به طرق مختلفی می تواند به این مهم (پیش گیری، درمان، تشخیص بیماری ها)، دست یابد. از آن جمله، شناسایی ژن با عملکرد معیوب، روشن یا خاموش کردن برخی ژن‌ها، استفاده از کپی‌های عملکردی آن ژن، معرفی ژن به سلولهای سرطانی جهت سرکوب تومور به واسطه مهار جریان خون به آن و یا تحریک سیستم ایمنی برای حمله به انواع خاصی از سلولها را می‌توان نام برد[۲]. در کنار اهمیت ژن درمانی و راهکارهایش، باید توجه داشته باشیم که در ژن درمانی، ژن مستقیماً به سلولهای انسانی وارد می‌گردد. بنابراین بهینه سازی روشهای این نوع درمان جهت کاهش خطرات و عوارض ناخواسته، که زیاد نیز می‌باشد، در عین افزایش کارایی و موفقیت آنها، مدنظر می‌باشد. از جمله این عوارض ناخواسته، سمیت سلولی، تحریک سیستم ایمنی یا تأثیر بر سیستم کمپلمان و فعال سازی آن را می‌توان نام برد [۳].

۱–۱ روش‌های انتقال ژن

جهت ورود ژن به داخل سلول و جایگزینی مناسب آن در داخل هسته سلول مورد نظر، طراحی سیستم‌های انتقال ژن کارا، ضروری می‌باشد. DNA به تنهایی به علت تخریب سریع توسط نوکلئازهای سرمی بسیار ناپایدار می‌باشد بنابراین به کار بردن حامل‌هایی به منظور حفاظت از تخریب و تسهیل در جذب بوسیله سلولهای هدف و انتقال ماده ژنتیکی به داخل سیتوپلاسم و هسته، لازم است[٦]. کشف سیستم‌های بیولوژیکی، امیدی تازه و گاهی اساسی در این راستا می‌باشد. اما امروزه به دلیل برخی محدودیت‌ها، سمیت‌ها و عوارض آنها، توجه به سمت سیستم‌های غیربیولوژیک افزایش یافته است که تلاش جهت افزایش کارایی این سیستم‌ها، همچنان ادامه دارد.

۱–۱–۱ حامل‌های بیولوژیکی (ویروس‌ها)

ویروس‌ها توانایی ذاتی در انتقال ماده ژنتیکی دارند که این امر موجب افزایش بازده انتقال ژن گردیده است و موجب شده بسیاری روشهای درمانی بر پایه کاربرد آنها استوار گردد. [۹،۱۰]

با اینکه خصوصیات بیماری‌زایی ویروس‌ها را می توان کاهش داد، اما باز هم سمیت آنها و ظرفیت بارگیری محدود و مشکلات در سطح تولید وسیع، بررسی‌ها را به سمت سیستم‌های غیربیولوژیکی برده است [۱۱]. این حامل‌ها را می‌توان یا به طور مستقیم به داخل بافت مورد نظر یا از طریق تجویز داخل وریدی استفاده کرد. یا می‌توان سلولهای جدا شده از بیمار را در معرض حامل قرار داده و بعد از ورود ژن مورد نظر به داخل سلول، این سلولها را به بیمار بازگرداند [۹]. در ادامه برخی از این نوع ویروسها توضیح داده می‌شود.

۱–۱–۲ آدنو ویروس‌ها

این ویروس‌ها را می‌توان از جمله عوامل مهم در ایجاد بیماری‌های تنفسی فوقانی و تحتانی و فارنژیت دانست. اینها ویروس‌هایی بدون پوشش و با DNA ۲ رشته‌ای خطی می‌باشند که جهت درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفته‌اند[۱۲].

۱-۱-۳ رترو ویروس‌ها

ژنوم این ویروس‌ها به صورت ۲ رشته یکسان RNA تک رشته‌ای خطی می‌باشد و دارای پوشش هستند. دو دسته انکوویروس‌ها و لنتی ویروس‌ها (HIV) در این گروه قرار دارند. به علت مکان ویژه[۱] نبودن ادغام این ویروس‌ها، خطر جهش‌زایی با آنها کمتر است. DNA این ویروسها با DNA ژنوم میزبان ادغام شده و مدت زمان ماندن ژنوم ویروس در سلول آلوده را افزایش می‌دهد[۱۳].

۱-۱-۴ هرپس سیمپلکس ویروس (HSV)

ویروسهایی پوشش‌دار با DNA دورشته‌ای خطی هستند که سبب ایجاد عفونت‌های خفته می‌گردند. توانایی آنها در آلودگی اعصاب حسی و نرون‌ها باعث شده از آنها در انتقال ژن به سلولهای سرطانی مغز استفاده شود [۱٤].

۱-۱-۵ Adeno-associated ویروس‌ها

DNA تک رشته‌ای کوچکی دارند. مانند رترو ویروس‌ها DNA شان با ژنوم میزبان ادغام می‌شود و توانایی ترانسداکشن[۲] آنها از آدنوویروسها کمتر است. همانگونه که بیان شد خطر جهش زایی در اننتقال ژن توسط رترو ویروس ها کم است. اما در مورد این ویروس ها به دلیل ادغام در کروموزوم انسانی، این خطر افزایش می یابد [۹].

۱-۱-۶ پاکس ویروس‌ها

کمی سمیت و ظرفیت بالای این ویروس‌ها برای DNA خارجی، آنها را به حامل‌های مناسب برای ژن‌رسانی تبدیل کرده است. DNA آنها دو رشته‌ای و جزء بزرگترین ویروسها می‌باشند. انواع پاکس ویروس به عنوان واکسن‌های ویروسی مطرح‌اند (آبله)[۱۵].

۱- site-specific

۲- انتقال ژن توسط ویروس ها، ترانسداکشن (Transduction) نام دارد

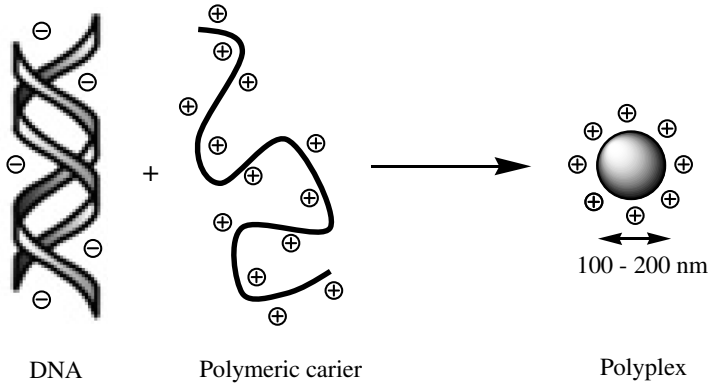
۱-۱-۷ حامل‌های غیربیولوژیک

مسائل و مشکلات بیان شده در مورد حامل‌های ویروسی، باعث گرایش به سمت انواع غیربیولوژیک گردید. DNA به علت داشتن گروههای فسفات با بار منفی، در pH فیزیولوژیک دارای بار الکتریکی منفی می‌باشد که باعث برهمکنش DNA با حامل های غیر بیولوژیکی است که ذاتاً بار مثبت دارند. این مسئله اساس استفاده از این حاملها می‌باشد. همچنین مثبت بودن بار کلی کمپلکس حامل و DNA باعث برهمکنش آن با غشاء سلولی که بار منفی دارد، می‌گردد. به عبارت دیگر با ایجاد کمپلکس، بار منفی DNA خنثی گردیده و از دافعه الکتریکی بین آن و سطح آنیونی سلول جلوگیری می‌شود[١٦].

پلیمرهای کاتیونی و لیپیدهای کاتیونی از مهمترین این حاملها می‌باشند[١٨]. فشرده‌سازی ساختار DNA جهت ورود به سلول (به واسطه مکانیسم‌هایی که بیان خواهد شد) و حفظ آن در برابر نوکلئازها در داخل و خارج سلول هم، از موارد مهمی است که توسط این سیستم‌های ژن‌رسانی تأمین می شود[١٩].

۱-۱-۷-۱ پلیمرهای کاتیونی

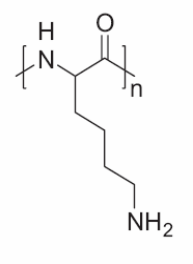
از این دسته می‌توان به پلیمرهای پلی ال لیزین (PLL) و پلی اتیلن ایمین (PEI) که مطالعات زیادی روی آنها انجام شده، اشاره کرد[٩]. این پلیمرها توانایی اتصال به DNA را دارند و کمپلکس حاصل، پلی پلکس نام دارد که می‌تواند ژن را به داخل سلول منتقل کند[١٨].



شکل ۱-۱) نمایی از برهمکنش پلیمر کاتیونی با DNA و تشکیل پلی پلکس[٢١]

۱-۱-۷-۲ پلی ال لیزین (PLL [۱])

این پلیمر کاتیونی، دارای واحدهای تکراری از اسیدآمینه لیزین می‌باشد که همین ساختار اسیدآمینه‌ای آن، موجب زیست تخریب پذیر بودنش گردیده است[۲۰].



Poly (L-lysine)

شکل ۱- ۲) ساختار پلی ال لیزین[۱۹]

توانایی ترانسفکشن آن در صورتی که تغییرات اصلاح کننده روی آن انجام نشود، پایین می‌باشد [۲۷]. پوشاندن آن با PEG[۲] یا افزودن بخش‌های هیستیدین به اسکلت آن، می‌تواند باعث افزایش ترانسفکشن توسط آن گردد [۹،۲۸]. PLL به سرعت با پروتئین‌های پلاسما باند شده و از گردش خون حذف می‌گردد [۲۹،۳۰]. کمبود گروههای آمینی روی این پلیمر را می‌توان علت ترانسفکشن پایین آن دانست. چون پاره شدن اندوزوم و رها شدن پلی پلکس را به تأخیر می‌اندازد و از طرفی این تأخیر موجب اتصال لیزوزوم ها به آن و تخریب پلی پلکس می‌شود. بنابراین استفاده از عوامل اندوزومولیتیک و نیز عوامل لیزوزوموتروپیک می‌تواند در افزایش بازده ژن‌رسانی مؤثر باشد [۲۰،۲۸]. به کار بردن زنجیره‌های اندوزومولیتیک برای فرار اندوزومال، باعث بهبود انتقال ژن می‌شود [۳۰]. در مورد پلی ال لیزین، همچون PEI[۳]، با افزایش وزن مولکولی، بازده ترانسفکشن افزایش می‌یابد اما سمیت سلولی نیز افزایش خواهد یافت [۹]. لازم به ذکر است که پلی ال لیزین اولین پلیمر کاتیونی مورد استفاده در انتقال ژن به روش غیر

۱- Poly (L-lysine)

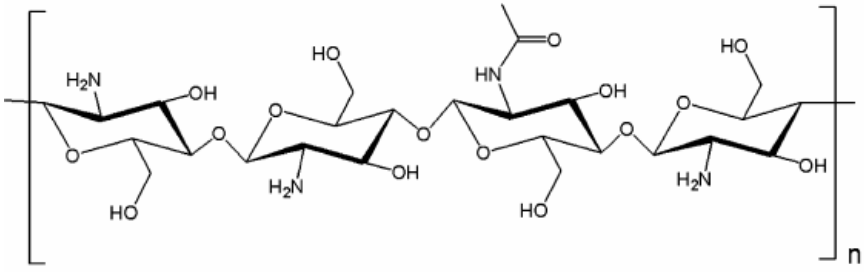
۲ - Poly Ethylene Glycol

۳ - Poly Ethylene Imine

بیولوژیک می باشد [۳۱].

۱-۱-۷-۳ کیتوزان

آمینو پلی ساکارید خطی و زیست تخریب پذیر بوده و از واحدهای D- گلوکزآمین و N- استیل - D گلوکز آمین تشکیل شده است.



شکل ۱-۳) ساختار کیتوزان [۲۲]

از مزایای آن، تشکیل کمپلکس‌های کوچک و نسبتاً پایدار با DNA و محافظت از آن در برابر تخریب توسط آنزیم‌های نوکلئاز و از معایب آن تأخیر رهایی پلی‌پلکس از اندوزوم است که باعث تخریب پلی پلکس و کاهش بازده ترانسفکشن می‌گردد. با اتصال عوامل پپتیدی اندوزومولیتیک به پلی پلکس حاوی کیتوزان، این مشکل برطرف می‌شود[۳۲]. کیتوزان می‌تواند رهش DNA و مدت زمان عمل را در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی کنترل کند [۳۳].

۱-۱-۷-۴ دندریمرها

انواع دارای گروه های فسفر وپلی آمید و آمین در سیستم های ژن رسانی مورد بررسی قرار گرفته اند[۳٤]. کمپلکس آنها با DNA از طریق اندوسیتوز وارد سلول شده و قادر به رهایی پلی‌پلکس از اندوزوم به صورت بسیار کارآمد می‌باشد. این تخریب و رهایی از اندوزوم، با قدرت بافرکنندگی آنها در ارتباط می‌باشد[۳۵]. دندریمرها، پلیمرهایی با شاخه‌های متعدد و کروی‌اند. جهت کاربرد در ژن‌درمانی از

روش واگرا[۱] برای سنتز آنها استفاده می‌گردد. در این روش از یک مولکول به عنوان هسته مرکزی استفاده می‌شود و در روشی دیگر، شروع سنتز از قسمتی است که در نهایت بخش محیطی ساختار مولکول را تشکیل خواهد داد که روش همگرا[۲] نام دارد. عدم توسعه تجاری آنها، به علت گران بودن و آهسته بودن فرآیند تولیدشان و واکنش‌های بسیار زیاد، در این فرآیند می‌باشد. گروههای آمینی انتهایی با DNA از طریق تداخلات الکترواستاتیکی متصل می‌شوند [۳۶].

۱-۱-۷-۵ پلی اتیلن ایمین

در مورد این پلیمر کاتیونی که امروزه در انتقال ژن بسیار مورد توجه قرار گرفته، در فصل بعد به طور کامل توضیح داده می شود.

۱-۱-۷-۶ پپتیدهای کاتیونی

از مزایای مهم پپتیدهای صناعی جهت کاربرد در انتقال ژن، تعیین دقیق و آسان ساختار مولکولی و خلوص واکنش‌گرها می‌باشد. همچنین می‌توان با تغییر در طراحی، ساختار کمپلکس نهایی را به علت انعطاف پذیری آنها، تغییر داد. این پپتیدها آمفی فیلیک اند. در محیط‌های اسیدی دچار تغییر کنفرماسیون می‌شوند و به این ترتیب از مسیرهای لیزوزومی اندوزومی فرار می‌کنند. آنها DNA را به صورت مؤثری فشرده می‌کنند. زیرا حاوی اسیدهای آمینه با بار مثبت مثل لیزین، هیستیدین و آرژنین می‌باشند [۲۸]. در تجمع و فرار اندوزومی، بخش‌های هیدروفوب نقش مهمی دارند و کارایی حامل‌های پپتیدی وابسته به این بخش‌ها می‌باشد [۳۷،۳۸] کارایی این حامل‌ها، ۱۰ تا ٤٠ برابر کمتر از سیستم‌هایی همچون لیپوزوم‌ها و حامل‌های PEI می‌باشد [۳۹].

۱- Divergent

۲- Convergent

۱-۱-۷-۷ لیپیدهای کاتیونی

استفاده از لیپیدهای با بار مثبت، متشکل از یک یا دو لایه زنجیر اسید چرب و یا آلکیل، به همراه یک بخش اتصال دهنده و گروه هیدروفیلیک آمینو، که بتوانند به DNA که بار منفی دارد، متصل شوند، به عنوان حامل‌های ژن‌رسانی مطرح می‌باشد [۱۷،٤۰].

لیپیدهای کاتیونی به فرم لیپوزوم فرموله شده و با DNA کمپلکس می‌شوند [٤۱]. این کمپلکس، لیپوپلکس نام دارد [۱۲]. نوع خنثی این لیپیدها مثل DOPE [۱] با ایجاد بی‌ثباتی در غشاء اندوزومی و تسهیل به هم خوردگی‌های غشایی، باعث رهایی بیشتر کمپلکس از اندوزوم می‌شوند [٤۲]. بنابراین به عنوان عامل کمکی، همراه انواع کاتیونی به کار می‌روند. مسلماً نوع آنیونی آنها نمی‌توانند با DNA اتصال برقرار کند [۱۸]. لیپوپلکس‌های با سایز ۵۰۰nm < بیشتر از طریق اندوسیتوز غیروابسته به کلاترین وارد سلول می‌شوند درحالی که کمپلکس‌های کوچکتر از ۲۰۰nm می‌توانند از طریق مسیرهای وابسته به کلاترین و غیراختصاصی وارد شوند[٤۳]. سمیت وابسته به دوز لیپیدهای کاتیونی و ضعف آنها در عبور از اندوزوم، کاربردشان را محدود کرده و تمایل به سمت پلیمرهای کاتیونی بیشتر گردیده است [٤٤].

۱-۱-۷-۸ سیستم های ژن رسانی بر پایه ی میسل های حاوی کمپلکس پلی الکترولیتی

الیگونوکلئوتید های آنتی سنس (antisense ODNs [۲]) و RNAهای مداخله کننده کو چک(siRNAs [۳]) به علت توانایی تنظیم بیان ژن به صورت کاملاً اختصاصی نسبت به توالی نوکلئوتیدی ژن ها، در زمینه‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته اند که از جمله آنها می توان به بیولوژی سلولی_مولکولی، علوم پزشکی و علوم دارویی اشاره کرد. به علاوه از این ترکیبات به عنوان ابزار های قدرتمندی جهت کشف داروهای

۱- Di Oleoyl Phosphatidyl Ethanolamine

۲- antisense oligonucleotides

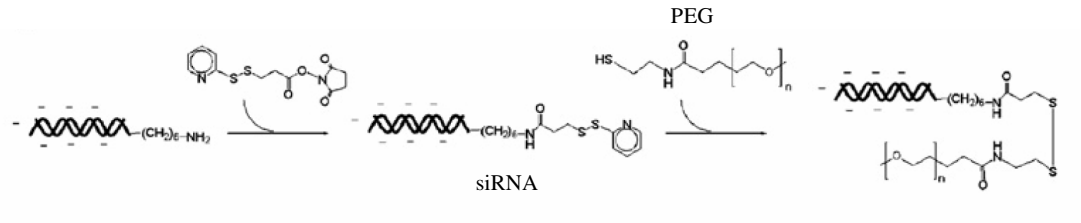
۳- small interfering RNAs

جدید نیز، نام برده می‌شود [٤٥،٤٦]. علی رغم مطالب ذکر شده در مورد استفاده بالینی از داروهای اسید نوکلوئیکی، هنوز تردید ها و مشکلاتی وجود دارد که مهمترین دلیل آن آسیب پذیری ذاتی این داروها نسبت به هیدرولیز توسط نوکلئاز ها و همچنین برداشت و جذب سلولی کم این داروها می‌باشد[٤٧].

تشکیل کنژوگه بین اسید نوکلئیک و پلی اتیلن گلیکول (PEG) هیدروفیل، در حضور پلی کاتیون ها مانند پلیمرهای کاتیونی پپتید ها یا لیپیدها در محیط آبی، به طور خود به خودی موجب تشکیل میسل های حاوی کمپلکس پلی الکترولیتی (PEC [۱]) می شود [۲۳].

میسل‌های PEC دارای یک ساختار شامل هسته و پوسته می‌باشند که در این ساختار یک هسته بدون بار و خنثی در داخل و یک پوسته هیدروفیل از جنس PEGدر سطح و اطراف هسته قرار گرفته (شکل ۱-۷). این ساختار میسلی شکل نه تنها موجب افزایش حلالیت در محیط آبی می‌شود، بلکه به علت حضور زنجیره‌های پلی‌اتیلن گلیکولی هیدروفیل و انعطاف‌پذیر در سطح خارج میسل‌ها، موجب پایداری کلوئیدی میسل‌ها در محلول و در جریان خون نیز، می‌شود که این امر کاهش چسبندگی بین ذره‌ای و کاهش جذب سطحی غیراختصاصی اجزای سرم را بر روی میسل‌ها در هنگام حضور میسل در جریان خون سیستمیک در پی دارد. میسل‌های PEC دارای شکل کروی و اندازه کمتر از ۱۰۰ nm و توزیع اندازه ذره ای باریک می باشند [٢٤]. میسل های PEC محافظت بالایی را از داروهای اسید نوکلوئیکی که در هسته مرکزی آنها قرار می گیرند، نسبت به هیدرولیز آنزیمی، ایجاد می نمایند[٤٨]. یک سیستم ژن رسانی siRNA بر پایه میسل PEC اخیراً ارائه شده است که در آن PEG از طریق یک پیوند دی سولفیدی قابل احیاء باsiRNA کنژوگه شده است. (siRNA – PEG) . (شکل ۱-٦)

۱- Polyelectrolyte complex



شکل ۱-٦)کنژوگه شدن PEG از طریق یک پیوند دی سولفیدی قابل احیاء با siRNA.[۲٤]

میسل های PEC در محیط خارج سلولی پایدار هستند اما هنگامی که در محیط سیتوزولی و احیاء کننده ی داخل سلول قرار می گیرند، siRNA جدا شده و آزاد می شود [۲٤].

میسل های PEC حاوی siRNA – PEG / PEI توانستند به نحو مؤثری siRNA را از حمله توسط نوکلئازها محافظت نمایند بعلاوه میسل های PEC حاوی siRNA مربوط به VEGF[۱] توانستند به نحو مؤثری بیان VEGF را در سلول های سرطان پروستات سرکوب نمایند که این مهار با اختصاصیت بالایی نسبت به توالی نوکلئوتیدی صورت گرفت [۲٤] . میسل های PEC در حیوانات زنده دارای خواص هدف یابی تومور و تجمع بالا در تومور بودند که مشاهدات حاصل از تکنیک عکس برداری فلورسانس در محل، مؤید این امر می باشد. این یافته ها نشان می دهند که میسل های PEC قادر به حفظ اندازه و پایداری خود در هنگام حضور در جریان خون سیستمیک می باشند و از این رو گزینه مناسبی جهت استفاده در درمان سیستمیک سرطان با استفاده از siRNA داروئی می‌باشند [۲۳].

۱- Vascular Epidermal Growth Factor