

Research Paper:

Evaluation of the Toxicity Effects of Polyethyleneimine (Pei) on Cell Viability and Morphology of VSMC Cells

Fahimeh Zamani-Garmsiri¹ , Mohammad Najafi² , Asghar Mohammadi³, Farhad Shaikhnia² , Ghasem Ghasempour^{2*} 

1. Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2. Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.



Citation Zamani-Garmsiri F, Najafi M, Mohammadi A, Shaikhnia F, Ghasempour Gh. Evaluation of the Toxicity Effects of Polyethyleneimine (Pei) on Cell Viability and Morphology of VSMC Cells. Qom University of Medical Sciences Journal. 2021; 15(6):426-433. <https://doi.org/10.32598/qums.15.6.2353.1>

 <https://doi.org/10.32598/qums.15.6.2353.1>



Received: 20 May 2021

Accepted: 01 Aug 2021

Available Online: 01 Sep 2021

Keywords:Polyethyleneimine,
Muscle, Smooth, Vascular,
Cell survival**ABSTRACT**

Background and Objectives Today, PEI is used for high-efficiency gene transfection. This polycation can have toxic effects on cells due to charged amine groups. This study evaluated the toxic effects of PEI in both single and oligonucleotide-binding modes on VSMC cells.

Methods First, VSMC cells were cultured and then transfected by nanoparticles in two PEI states alone and containing oligonucleotides. After 24 hours, cell viability and morphology were assessed using MTT and electron microscopy methods respectively. Data were analysed using the one-way ANOVA, followed by the Tukey Post-Hoc test.

Results The results showed that nanoparticles significantly reduced the cell viability by causing toxicity to cells ($P < 0.0001$) and also its images showed cell death and apoptosis. But PEI containing oligonucleotides had no toxic effects on cell viability ($P = 0.7414$). Its electron microscope image also showed a normal cell morphology.

Conclusion Overall, this study showed that the effect of PEI toxicity on VSMC cells is inhibited by oligonucleotide sequencing and thus neutralizing the positive charges of the amine group.

*** Corresponding Author:**

Ghasem Ghasempour, PhD.

Address: Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Tel: +98 (935) 3500919

E-Mail: ghasempourghasem66@gmail.com

مقاله پژوهشی:

بررسی اثر نانوذره پلی اتیلن ایمین بر زنده‌مانی و مورفولوژی سلول‌های عضله صاف عروق

فهیمة زمانی گرمسیری^۱، محمد نجفی^۲، اصغر محمدی^۲، فرهاد شیخ‌نیا^۲، قاسم قاسم‌پور^۲

۱. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
۳. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۳۰ اردیبهشت ۱۴۰۰
تاریخ پذیرش: ۱۰ مرداد ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۱۰ شهریور ۱۴۰۰

زمینه و هدف: امروزه نانوذره پلی اتیلن ایمین (PEI) برای انتقال ژن با کارایی بالا مورد استفاده قرار می‌گیرد. این نانوذره به واسطه گروه‌های آمین باردار می‌تواند اثرات توکسیکی بر سلول داشته باشد. در این مطالعه اثر نانوذره پلی اتیلن ایمین بر زنده‌مانی و مورفولوژی سلول‌های عضله صاف (VSMC) مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی: ابتدا سلول‌های عضله صاف عروق کشت شدند و سپس توسط نانوذره در دو حالت PEI تنها و حاوی الیگونوکلوئید ترانسفکت شدند. پس از ۲۴ ساعت با استفاده از روش‌های MTT و میکروسکوپ الکترونی میزان زنده‌مانی و مورفولوژی سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. برای آنالیز داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد نانوذره تنها با ایجاد سمیت برای سلول‌ها میزان زنده‌مانی را به صورت معنی‌داری کاهش داده است ($P < 0.0001$) و همچنین تصاویر آن نشان‌دهنده مرگ و آپوپتوز سلولی بود. اما نانوذره حاوی الیگونوکلوئید اثر سمیتی بر میزان زنده‌مانی سلول‌ها نداشت ($P = 0.7414$). تصویر میکروسکوپ الکترونی آن نیز شکل سلول را نرمال نشان داد.

نتیجه‌گیری: در مجموع، این مطالعه نشان داد اثر سمیت PEI بر سلول‌های VSMC با اتصال توالی اولیگونوکلوئید و در نتیجه خنثی‌سازی بارهای مثبت گروه آمین، مهار می‌شود.

کلیدواژه‌ها:

پلی اتیلن ایمین،
سلول‌های عضله صاف
عروق، زنده‌مانی

مقدمه

PEI^۱ یک پلیمر کاتیونی ارگانیک است که به واسطه داشتن تعداد زیاد گروه‌های آمین قابلیت پروتونه شدن دارد [۳]. از دلایلی که از PEI به عنوان یکی از بهترین عوامل انتقال ژن استفاده می‌شود می‌توان به موارد ذیل اشاره کرد: توانایی بالای آن در انتقال ژن به بسیاری از سلول‌ها، سهولت ایجاد کمپلکس PEI/DNA، پایداری بالای آن حتی در ۴ درجه سانتی‌گراد، ارزان و دسترس بودن طیف وسیعی از PEI با وزن‌های مولکولی متفاوت، سازگاری بیولوژیکی خوب، ایمنی‌نویزیستی پایین و به واسطه داشتن گروه‌های آمین فعال تغییراتی از قبیل کونژوگاسیون یا کونژوگاسیون با پلی اتیلن گلیول^۲ روی آن به آسانی صورت می‌پذیرد. پلیمرهای PEI دارای وزن‌های مولکولی متنوعی هستند که در برداشت و سمیت سلولی نقش مهمی دارند. مشتقات PEI

امروزه جهت انتقال ژن به درون سلول از روش‌های گوناگونی از قبیل وکتورهای ویروسی و غیرویروسی می‌توان استفاده کرد [۱]. وکتورهای ویروسی دارای بهترین کارایی و نتیجه در انتقال ژن هستند، اما معایبی مثل سمیت سلولی، القای پاسخ ایمنی، هزینه تولید بالا و محدودیت در اندازه ژن مورد انتقال را نیز دارند [۱، ۲]. وکتورهای غیرویروسی شامل لیپیدهای کاتیونی (مانند لیپوفکتامین) و پلیمرهای کاتیونی، لیپوزوم‌ها و نانوپارتیکل‌ها هستند. لیپوزوم‌ها به دلیل داشتن معایبی از جمله پایداری پایین، کارایی پایین و پاک شدن سریع از جریان خون، کاربردشان محدود شده است. در مقابل، پلیمرهای کاتیونی در مقایسه با وکتورهای ویروسی کم‌هزینه‌تر، در دسترس‌تر و غیرپاتوژنیک بوده و از ایمنی بالاتری برخوردار هستند [۱، ۳، ۴].

1. Polyethylenimine
2. PEGylation

نویسنده مسئول:

دکتر قاسم قاسم‌پور

نشانی: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی.

تلفن: ۳۵۰۰۹۱۹ (۹۳۵) ۹۸+

رایانامه: ghasempourghasem66@gmail.com

روش بررسی

سلول‌های عضله صاف عروق (VSMC C591) از مؤسسه پاستور (ایران، تهران) تهیه و در محیط کشت DMEM F-12 حاوی 10% FBS (Gibco) و 1% pen-strep (Sigma-Aldrich، USA) کشت شدند. سلول‌های کشت‌شده در شرایط نرمال (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، دی‌اکسیدکربن ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد) در انکوباتور نگهداری شدند.

ترانسفکشن با نانوذره

ابتدا سلول‌های کشت‌شده به دو گروه تقسیم شدند، به طوری که گروه اول با نانوذره PEI (25kDa) خالی و گروه دوم با نانوذره PEI حاوی یک توالی نوکلئوتیدی بی‌معنا ترانسفکت شدند. برای انجام ترانسفکت، ابتدا نانوذره PEI به دو صورت محلول خالی و محلول همراه با توالی الیگونوکلئوتیدی آماده شد. در گروه نانوذره حاوی توالی الیگونوکلئوتیدی از نسبت نیتروژن به فسفر ۲۰ (N/P=۲۰) استفاده شد. نیتروژن و فسفر به ترتیب اشاره به گروه‌های آمین موجود در نانوذره و گروه‌های فسفات توالی الیگونوکلئوتیدی دارند. سپس سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در محیط کشت حاوی نانوذره خالی یا نانوذره حاوی الیگونوکلئوتید در انکوباتور نگهداری شدند. آنگاه، محیط کشت سلول‌ها با محیط تازه تعویض و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط نرمال در انکوباتور حفظ شدند [۹، ۱۰].

میکروسکوپ فلورسنت

برای مشاهده میکروسکوپی کارایی PEI در ترانسفکشن، از الیگونوکلئوتید متصل شده به فلئورسین ایزوتیوسیانات^۶ به عنوان انتشاردهنده فلورسانس سبز استفاده شد. پس از ترانسفکشن سلولی توسط PEI حاوی الیگونوکلئوتید متصل به FITC، سلول‌ها در شرایط طبیعی به مدت ۴ ساعت در دستگاه انکوباتور نگهداری شدند. سپس توسط بافر فسفات سالین^۷ شسته و توسط میکروسکوپ Olympus IX71 تصویربرداری شدند.

میکروسکوپ الکترونی

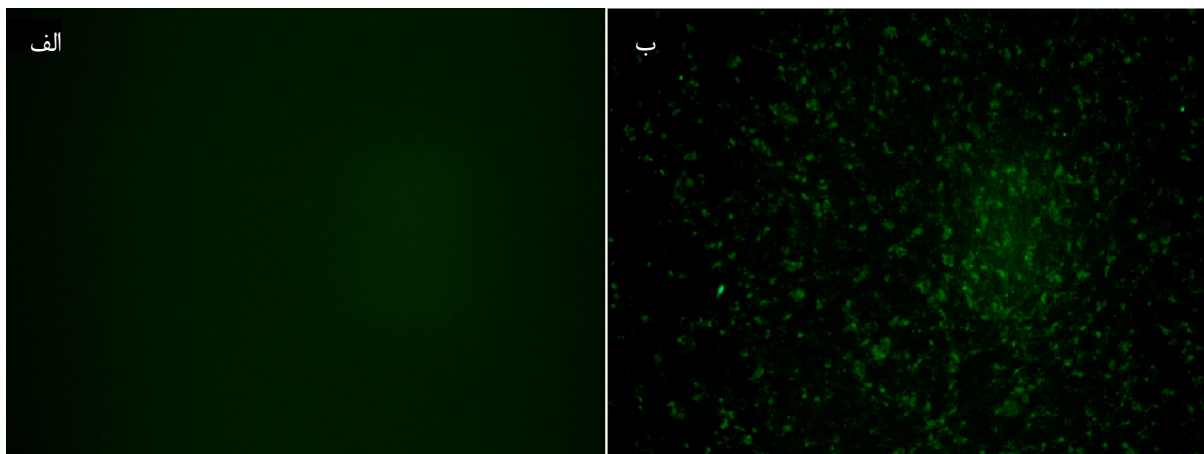
سلول‌های ترانسفکت‌شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (LEO 906; Zeiss) مورد بررسی قرار گرفتند. برای این کار ابتدا سلول‌های ترانسفکت‌شده با PBS شسته و تثبیت اولیه در گلوکار آلدهید ۲/۵ درصد به مدت ۲ ساعت انجام شد. سپس، سلول‌ها سه بار با استفاده از PBS شست‌وشو داده شدند تا گلوکار آلدهید اضافی از بین برود. پس از آن، سلول‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در ۱ درصد اسمیم غوطه‌ور شدند. سپس دهیدراسیون کردن سلول‌ها در غلظت‌های متفاوت استون (۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد) صورت

با وزن مولکولی بالا علی‌رغم کارایی بالا در انتقال ژن، سمیت بالاتری نیز ایجاد می‌کنند [۵].

پلیمرهای PEI شامل دو نوع شاخه‌دار (B) و خطی (L) هستند و وزن مولکولی ایده‌آل PEI برای انتقال ژن بین ۵ تا ۲۵ کیلودالتون است. از میان این وزن‌های مولکولی، PEI شاخه‌دار با وزن مولکولی ۲۵ کیلودالتون بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲]. سمیت سلولی PEI، علاوه بر وزن مولکولی، به درجه شاخه‌دار بودن، قدرت یونی محلول، پتانسیل ژتا و اندازه پلی‌پلکس بستگی دارد [۶]. سمیت سلولی PEI عموماً به دو فاز تقسیم‌بندی می‌شود: فاز I شامل ناپایداری غشا و تغییر موقعیت فسفاتیدیل‌سرین است و فاز II شامل آپوپتوز است که طی آن سیتوکروم C از میتوکندری آزاد شده و با فعال‌سازی کاسپاز ۳ فرایند آپوپتوز آغاز می‌شود [۷، ۱۱]. همچنین مشخص شده است که این نانوذره باعث القای سمیت سلولی در سلول‌های Neuro2A می‌شود، به صورتی که میزان بیان ژن‌های Grp78 (Bip) و Atf4 (Chop) را افزایش می‌دهد [۸]. این قابلیت را دارد که با برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک به DNA متصل شود و تشکیل کمپلکس DNA/PEI را بدهد. اتصال این پلی‌پلکس‌ها^۳ به سلول به دو روش وابسته و غیروابسته به گیرنده صورت می‌گیرد. در حالت بدون رسپتور، پلیمرهای کاتیونی به پروتئوگلیکان‌های آنیونی متصل شده و سپس به داخل سلول وارد می‌شوند. مدیفیکاسیون وکتورها با لیگاندها یا آنتی‌بادی‌های اختصاصی از قبیل ترانسفرین سبب ورود به سلول از طریق اندوسیتوز به واسطه گیرنده می‌شود. از جمله سایر لیگاندها می‌توان به انسولین، فاکتور رشد مبدل^۴، فولات و فاکتور رشد فیبروبلاستی^۵ اشاره کرد. ورود به سلول عمدتاً از دو طریق اندوسیتوز وابسته به کلترین یا کاوئول (Caveola) صورت می‌پذیرد. پس از ورود به اندوزوم و پمپ شدن پروتون به آن، به خاطر خاصیت PEI در بافر کردن pH، سبب تجمع پروتون در اندوزوم شده که باعث تورم اسموتیک و پارگی اندوزوم می‌شود که به آن «اثر اسفنجی پروتون» گفته می‌شود [۴، ۵]. سمیت سلولی ایجادشده در اثر PEI به لحاظ زمانی نیز به دو نوع سریع و کند تقسیم‌بندی می‌شود. نوع سریع آن در رابطه با PEI آزاد است که در این حالت PEI با پروتئین‌های سرم دارای بار منفی مثل آلبومین واکنش داده و تشکیل رسوب می‌دهد که به سطح سلول‌ها متصل شده و باعث ناپایداری غشا می‌شود. PEGylation یکی از راهکارهای مقابله با این وضعیت است. نوع کند به آزاد شدن DNA از PEI مرتبط است. در این حالت PEI با اجزای سلولی برهم‌کنش داده و مانع از انجام پروسه‌های طبیعی سلول می‌شود. چروکیدگی سلول، کاهش تعداد میتوز و واکوولیزاسیون سیتوپلاسم از وقایع این مرحله است [۶]. در این مطالعه اثر سمیت نانوذره PEI بر سلول‌های عضله صاف مورد مطالعه قرار گرفت.

3. Polyplexes
4. TGFα
5. FGF

6. FITC
7. PBS



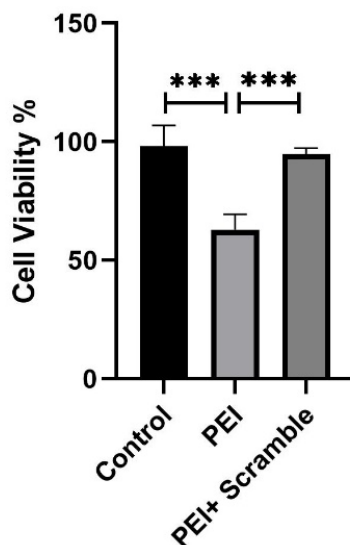
مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۱. تصویر الف گروه کنترل را نشان می‌دهد؛ تصویر ب به وضوح نشان‌دهنده ترانسفکشن سلولی توسط PEI حاوی الیگنوکلئوتید متصل به FITC است.

یافته‌ها

ارزیابی کارایی ترانسفکشن سلولی با میکروسکوپ فلورسنت

تصاویر میکروسکوپی فلورسنت نشان داد PEI با کارایی بالایی سبب انتقال توانی الیگنوکلئوتید به سلول‌های VSMC می‌شود (تصویر شماره ۱).



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۲. درصد زنده‌مانی سلول

میزان زنده‌مانی سلول‌ها در گروه نانوذره خالی (PEI) به میزان معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0.0001$). اما زنده‌مانی سلول در گروه نانوذره حاوی الیگنوکلئوتید بی‌معنا (PEI + Scramble) نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری را نشان نداد ($P = 0.7414$). در مقابل، گروه نانوذره حاوی الیگنوکلئوتید (PEI + Scramble) از نظر آماری افزایش معنی‌داری را در سطح زنده‌مانی سلول در مقایسه با گروه نانوذره خالی نشان داد ($P = 0.0002$).

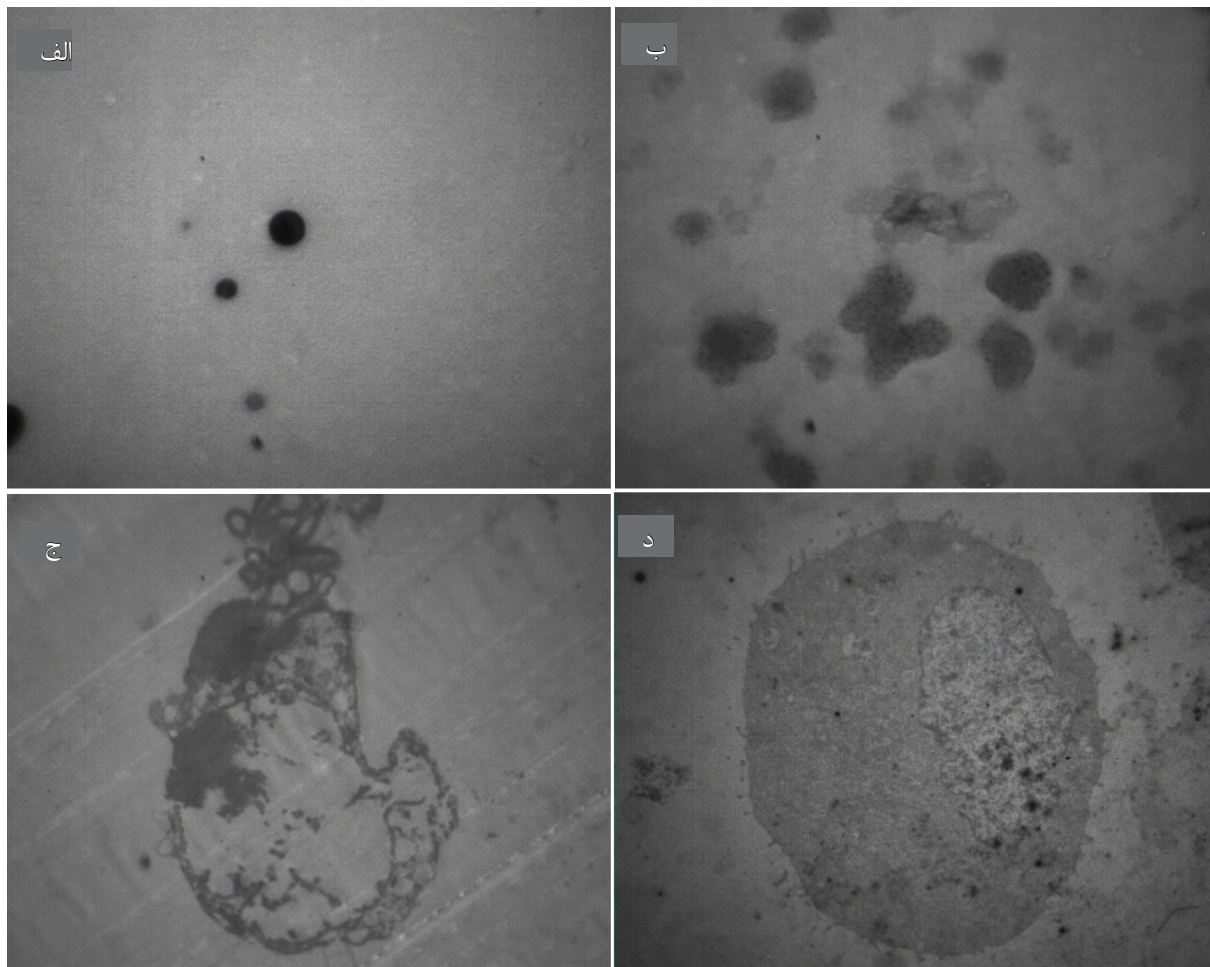
گرفت و سلول‌ها در رزین خالص ثابت شدند. سرانجام، برش‌های نازک (۵۰ نانومتر) برای میکروسکوپ الکترونی تهیه شد و گریدهای بدون پوشش ۲۰۰ مش استفاده شد. نانوذرات منفرد همچنین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روی شبکه‌های مسی با پوشش کربن مورد بررسی قرار گرفتند [۱۱].

تست MTT

در یک پلیت ۹۶ خانه، ۵۰۰۰ سلول VSMC به ازای هر چاهک کشت شدند و بعد از آماده‌سازی محلول نانوذره چه به صورت تنها و چه همراه با توانی الیگنوکلئوتیدی، سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در معرض این محلول‌ها قرار گرفتند. سپس محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت تازه جایگزین شد و سلول‌ها ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند [۹]. پس از ۲۴ ساعت نگهداری در انکوباتور، سلول‌ها به مدت ۲ ساعت در محلول MTT ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر انکوبه شدند، سپس محیط رویی برداشته و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (دی‌متیل سولفوکسید) اضافه شد که سبب حل شدن کریستال‌های تشکیل شده فورمازان می‌شود. پس از ۱۵ دقیقه شیک ملایم، میزان جذب نوری رنگ تشکیل شده، در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۲].

آنالیز آماری

در این مطالعه برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار گراف پدپریم (نسخه ۸) و آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. داده‌های با P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شدند. شاخص‌ها به صورت میانگین همراه با انحراف معیار گزارش شدند.



تصویر ۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری

الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوذره PEI خالی (مقیاس ۳۳۶ نانومتر)؛ ب) تصویر نانوذره PEI همراه با الیگنوکلئوتید بی معنا (مقیاس ۲۶۰ نانومتر)؛ ج) تصویر میکروسکوپ الکترونی سلول‌های ترانسفکت شده با PEI خالی (مقیاس ۸/۱ میکرومتر)؛ د) تصویر میکروسکوپ الکترونی سلول ترانسفکت شده با نانوذراتی که حاوی الیگنوکلئوتید بی مفهوم هستند (۷/۲ میکرومتر).

میزان زنده‌مانی سلول

تصاویر میکروسکوپ الکترونی

تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که سلول‌های ترانسفکت شده با نانوذره خالی واکوئله شده و نشان‌دهنده القای مسیر آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با نانوذره پلی اتیلن ایمین است (تصویر شماره ۳ ج). در حالی که سلول‌های ترانسفکت شده با نانوذره حاوی الیگنوکلئوتید بی معنا دچار آپوپتوز نشده و ظاهری نرمال دارند (تصویر شماره ۳ د).

بحث

انتقال ژن‌ها به داخل سلول به دو روش ویروسی و غیرویروسی انجام می‌شود. روش غیرویروسی مزایای خاصی نسبت به وکتورهای ویروسی دارد، چون در روش ویروسی امکان ایجاد سمیت سلولی، محدودیت در اندازه ژن، ایجاد پاسخ‌های ایمنی،

همان‌طور که تصویر شماره ۲ نشان می‌دهد، نانوذره خالی (PEI) در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی‌داری میزان زنده‌مانی سلول را کاهش داده است ($P < 0.0001$). اما زنده‌مانی سلول در گروه نانوذره حاوی الیگنوکلئوتید بی معنا (PEI + Scramble) نسبت به گروه کنترل دستخوش تغییر معنی‌داری نشده است ($P = 0.7414$). از طرفی نشان داده شده است که میزان زنده‌مانی سلول‌ها در گروه نانوذره حاوی الیگنوکلئوتید بی معنا معنی‌داری بالاتر از گروه نانوذره خالی است ($P = 0.0002$). میانگین همراه با انحراف معیار زنده‌مانی سلول‌ها در گروه کنترل برابر با 98.2 ± 8.6 ، در گروه نانوذره برابر با 62.9 ± 6.5 و در گروه PEI + scramble برابر با 98.42 ± 2.4 درصد بود.

نتیجه‌گیری

درمجموع، این مطالعه نشان داد اثر سمیت PEI بر سلول‌های VSMC احتمالاً با اتصال توالی اولیگونوکلوئید و در نتیجه خنثی‌سازی بارهای مثبت گروه آمین، مهار می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مقاله مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایران قرار گرفته است (کد: IR.IUMS.FMD.REC.1397.067).

حامی مالی

این مقاله مرتبط با طرحی است که حامی مالی آن دانشگاه علوم پزشکی ایران بوده است (کد طرح: ۳۲۹۹۷-۳۰-۰۲-۹۷).

مشارکت‌نویسندگان

طراحی پروژه: فهیمه زمانی و قاسم قاسم‌پور؛ انجام پروژه: اصغر محمدی و فرهاد شیخ‌نیا؛ آنالیز داده‌ها: محمد نجفی و فهیمه زمانی؛ نگارش مقاله: قاسم قاسم‌پور و فرهاد شیخ‌نیا.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

هزینه بالا و پتانسیل ایجاد پاسخ‌های ایمنی وجود دارد. علاوه بر این، وکتورهای ویروسی امکان ایجاد جهش و تبدیل سلول‌ها به حالت سرطانی را دارند [۱۳]. وکتورهای غیرویروسی از قبیل لیپیدهای کاتیونی (مانند لیپوفکتامین) و پلیمرهای کاتیونی همانند PEI جایگزین امیدوارکننده‌ای بوده و مزایایی از جمله آماده‌سازی، تولید، تخلیص و تغییرات شیمیایی آسان، پاسخ ایمنی کمتر در مقابل وکتور ویروسی و پایداری بالاتری دارند [۱، ۳، ۴]. PEI به واسطه داشتن تعداد زیاد بار مثبت در گروه‌های آمین خود با بارهای منفی اسیدهای نوکلئیک واکنش الکتروستاتیک برقرار کرده و بدین ترتیب سبب سهولت انتقال ژن‌ها می‌شود. از ویژگی‌های اصلی PEI که موجب انتقال ژن با کارایی بالا شده است می‌توان به مواردی از قبیل انتقال ژن‌ها در طیف وسیعی از سلول‌ها و سهولت در ایجاد کمپلکس PEI/DNA اشاره کرد [۵].

تا کنون مطالعات مختلفی به بررسی اثر سمیت و زنده‌مانی سلول توسط PEI پرداخته‌اند. بورچارد و همکاران زنده‌مانی سلول و کارایی انتقال ژن توسط PEI را در رده‌های سلولی مختلف مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها نشان دادند کارایی PEI در انتقال ژن و سمیت آن در رده‌های سلولی مختلف، متفاوت است [۱۴]. وانگ و همکاران نشان دادند میزان زنده‌مانی سلول و کارایی انتقال ژن توسط PEI (تغییر یافته) با وزن مولکولی پایین افزایش می‌یابد [۱۵]. رضایی و همکاران جهت انتقال ژن توسط PEI با کارایی بالا و سمیت سلولی پایین، از PEI با وزن مولکولی بالا و تغییر یافته توسط یک زنجیره کربنی استفاده کردند و ثابت نمودند که بهترین نتیجه در PEI تغییر یافته با زنجیره کربنی (10C) حاصل می‌شود [۱۶]. هم‌راستا با گزارش توماس و کلیبانو [۱۷]، ما نیز در این مطالعه نشان دادیم که سمیت PEI سبب از بین رفتن ۳۵ درصد سلول‌ها شده است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد این سمیت از طریق واکنش شدن سلول و در نهایت آپوپتوز ایجاد می‌شود. احتمالاً اثرگذاری نانوذره PEI بر القای مسیر آپوپتوز به صورتی است که ابتدا با ناپایداری غشا و سپس با آزادسازی سیتوکروم c از میتوکندری و متعاقباً فعال‌سازی کاسپاز ۳ منجر به فعال‌سازی آپوپتوز می‌شود [۱، ۷]. همچنین این نانوذره به واسطه افزایش بیان ژن‌هایی همانند Atf4 و Chop در القای آپوپتوز می‌تواند نقش مهمی ایفا کند [۸]. از طرف دیگر، ما مشاهده کردیم که نانوذره PEI متصل‌شده به الیگونوکلوئیدی که هدف خاصی را دنبال نمی‌کند سمیت سلولی نداشته و درصد زنده‌مانی سلول تغییر نکرده است. این عدم سمیت توسط تصاویر میکروسکوپی نیز تأیید شد. نانوذره PEI به خاطر بار مثبت گروه‌های آمین که واکنش‌پذیر هستند منجر به آسیب سلولی می‌شود [۱۷]. خنثی شدن بارهای مثبت گروه‌های آمین به واسطه برهم‌کنش توالی نوکلئوتیدی، قدرت واکنش‌پذیری PEI و در نتیجه سمیت آن را مهار می‌کند. به عبارت دیگر، ما نشان دادیم که سمیت PEI در فرایند انتقال ژن به واسطه اتصال توالی نوکلئوتیدی مهار شده و مشکلی ایجاد نمی‌کند.

References

- [1] Pishavar E, Shafiei M, Mehri S, Ramezani M, Abnous K. The effects of polyethylenimine/DNA nanoparticle on transcript levels of apoptosis-related genes. *Drug Chem Toxicol.* 2017; 40(4):406-9. [PMID]
- [2] Craciun BF, Gavril G, Peptanariu D, Ursu LE, Clima L, Pinteala M. Synergistic effect of low molecular weight polyethylenimine and polyethylene glycol components in dynamic nonviral vector structure, toxicity, and transfection efficiency. *Molecules.* 2019; 24(8):1460. [DOI:10.3390/molecules24081460] [PMID] [PMCID]
- [3] Vancha AR, Govindaraju S, Parsa KV, Jasti M, González-García M, Ballesterio RP. Use of polyethylenimine polymer in cell culture as attachment factor and lipofection enhancer. *BMC Biotechnol.* 2004; 4:23. [DOI:10.1186/1472-6750-4-23] [PMID] [PMCID]
- [4] Kuo WT, Huang HY, Huang YY. Intracellular trafficking, metabolism and toxicity of current gene carriers. *Curr Drug Metab.* 2009; 10(8):885-94. [PMID]
- [5] Neuberger P, Kichler A. Recent developments in nucleic acid delivery with polyethylenimines. *Adv Genet.* 2014; 88:263-88. [DOI:10.1016/B978-0-12-800148-6.00009-2] [PMID]
- [6] Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release.* 2006; 114(1):100-9. [DOI:10.1016/j.jconrel.2006.04.014] [PMID]
- [7] Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Poly (ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release.* 1999; 60(2-3):149-60. [DOI:10.1016/S0168-3659(99)00090-5]
- [8] Dabbaghi M, Kazemi Oskuee R, Hashemi K, Afkhami Goli A. Evaluating polyethylenimine/DNA nanoparticles-mediated damage to cellular organelles using endoplasmic reticulum stress profile. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018; 46(1):192-9. [PMID]
- [9] Valente JFA, Pereira P, Sousa A, Queiroz JA, Sousa F. Effect of plasmid DNA size on chitosan or polyethylenimine polyplexes formulation. *Polymers.* 2021; 13(5):793. [DOI:10.3390/polym13050793] [PMID] [PMCID]
- [10] Ghasempour G, Mohammadi A, Zamani-Garmsiri F, Najafi M. miRNAs through β -ARR2/p-ERK1/2 pathway regulate the VSMC proliferation and migration. *Life Sci.* 2021; 279:119703. [DOI:10.1016/j.lfs.2021.119703] [PMID]
- [11] Ghasempour G, Mahabadi VP, Shabani M, Mohammadi A, Zamani-Garmsiri F, Amirfarhangi A, et al. miR-181b and miR-204 suppress the VSMC proliferation and migration by downregulation of HCK. *Microvasc Res.* 2021; 136:104172. [DOI:10.1016/j.mvr.2021.104172] [PMID]
- [12] Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018; 2018(6). [DOI:10.1101/pdb.prot095505] [PMID]
- [13] Hao F, Li Y, Zhu J, Sun J, Marshall B, Lee RJ, et al. Polyethylenimine-based formulations for delivery of oligonucleotides. *Curr Med Chem.* 2019; 26(13):2264-84. [PMID]
- [14] Florea BI, Meaney C, Junginger HE, Borchard G. Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *AAPS PharmSci.* 2002; 4(3):E12. [DOI:10.1208/ps040312] [PMID] [PMCID]
- [15] Wang M, Lu P, Wu B, Tucker JD, Cloer C, Lu Q. High efficiency and low toxicity of polyethylenimine modified pluronics (PEI-pluronic) as gene delivery carriers in cell culture and dystrophic mdx mice. *J Mater Chem.* 2012; 22(13):6038-46. [DOI:10.1039/c2jm15625c]
- [16] Rezaee M, Gholami L, Gildeh MS, Ramezani M, Oskuee RK. Charge reduction: An efficient strategy to reduce toxicity and increase the transfection efficiency of high molecular weight polyethylenimine. *J Pharm Invest.* 2019; 49(1):105-14. [DOI:10.1007/s40005-018-0388-2]
- [17] Thomas M, Klibanov AM. Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(23):14640-5. [DOI:10.1073/pnas.192581499] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank
