



ستنتر نانوذره مغناطیسی اصلاح شده با پلی کاپرو لاکتون-پلی اتیلن گلیکول (PCL-PEG) حاوی داروی سیس پلاتین و ارزیابی اثربخشی آن ها بر روی رده سلولی لنفوما

ارسطو حسینی: دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

فریبیز کیهان فرد: استاد داروشناسی (فارماکولوژی)، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

فهمیه حاجی احمدی: دانشیار بیو شیمی بالینی، گروه علوم و فناوری تصویر برداری پزشکی (گرایش تصویر برداری مولکولی)، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران ایران

لیلا حسن زاده: استادیار داروسازی هسته ای، گروه پزشکی هسته ای، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

رویا قدس: استادیار پزشکی مولکولی، گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران ایران

داؤد احمدوند: دانشیار بیو شیمی بالینی، گروه علوم و فناوری تصویر برداری پزشکی (گرایش تصویر برداری مولکولی)، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران ایران (※ نویسنده مسئول) d.ahmadvand@iums.ac.ir

چکیده

کلیدواژه ها

نانوذره مغناطیسی اصلاح شده،
سیس پلاتین،
پلی کاپرو لاکتون،
پلی اتیلن گلیکول،
سرطان

زمینه و هدف: امروزه استفاده از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن در حوزه های مختلف پزشکی برای تصویر برداری و انتقال دارو مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه نانوذرات مغناطیسی آهن سنتر شده به عنوان سیستم دارو رسانی کارا در ارائه دوز کمتری از عامل شیمی درمانی و از بین بدن سلول های سرطان لنفوما مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش کار: در مطالعه حاضر، نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن Fe_3O_4 اصلاح شده با کوپلیمر های کاپرو لاکتون و پلی اتیلن گلیکول حاوی داروی شیمی درمانی سیس پلاتین به روش هم رسوی سنتر شدند. میزان بارگذاری دارو به واسطه روش اسپکتروسکوپی UV اندازه گیری شد. اندازه و مورفولوژی نانو پارتیکل های سنتر شده به واسطه پراکندگی نور دینامیکی و میکرو سکوپ الکترونی SEM مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت اثرات سمیت سلولی نانوذرات سنتر شده بر روی رده سلولی سرطانی لنفوما U937 مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: داروی سیس پلاتین با راندمان بالای در حدود ۹۸ درصد در نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده با کوپلیمر PCL-PEG تهیه گردید. ساختارهای تهیه شده با توجه به تصاویر میکرو سکوپ الکترونی SEM از مورفولوژی مناسب و یکدستی برخوردار بودند. نانوذرات مغناطیسی لود شده با سیس پلاتین در مقایسه با کاربرد سیس پلاتین به صورت آزاد اثرات کشنده بالاتری در دوز پایین تری از سیس پلاتین بر روی رده سلولی سرطانی لنفوما U937 نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه صورت گرفته نشان داد که نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده با کوپلیمر را می توان به عنوان یک حامل مناسب در بارگذاری سیس پلاتین برای درمان هدفمند سرطان مورد استفاده قرار داد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه علوم پزشکی ایران

شیوه استناد به این مقاله:

Hosseini A, Keyhanfar F, Hajiahmadi F, Hassanzadeh L, Ghods R, Ahmadvand D. Cisplatin-loaded Superparamagnetic Nanoparticles Modified with PCL-PEG Copolymers and Their Effectiveness Evaluation on Lymphoma Cell Line. Razi J Med Sci. 2023;30(3): 157-167.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

Cisplatin-loaded Superparamagnetic Nanoparticles Modified with PCL-PEG Copolymers and Their Effectiveness Evaluation on Lymphoma Cell Line

Arastoo Hosseini: Department of Medical Nanotechnology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Fariborz Keyhanfar: Professor of Pharmacology, Department of Pharmacology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Fahimeh Hajiahmadi: Associate Professor of Clinical Biochemistry, Department of Medical Imaging Technology, School of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Leila Hassanzadeh: Assistant Professor of Nuclear Pharmacy, Department of Nuclear Medicine, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Roya Ghods: Assistant Professor of Molecular medicine, Department of Molecular Medicine, School of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Davoud Ahmadvand: Associate Professor of Clinical Biochemistry, Department of Medical Imaging Technology, School of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (* Corresponding Author) d.ahmadvand@iums.ac.ir

Abstract

Background & Aims: Cancer is one of the causes of morbidity and mortality in developed and under-developed countries. Different strategies are under evaluation for cancer therapy including chemotherapy, radiotherapy, and surgery. However, the treatment can be affected because of the lack of the desired effect and severe side effects. For these reasons, discovering an improved cancer therapy strategy has been one of the most important research efforts worldwide. Cisplatin is considered one of the most effective used chemotherapy agents in the treatment of a variety of tumors. However, its use is limited because of its toxicity to normal cells. In addition, non-specificity and high dosage of drugs are the other important reasons which practically limit their application. Drug delivery systems can overcome these challenges by enhancing the therapeutic efficacy and reducing the adverse effects of anticancer agents. The application of nanoparticles as drug carriers has been widely studied for more than a decade (3). Magnetic nanoparticles are popular candidates in therapeutic systems and diagnostic applications that approved for clinical use by the Food and Medicine Administration (FDA) (5). In this study, we prepared superparamagnetic iron oxide nanoparticles Fe_3O_4 (SPIONs) that were modified through triblock poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) nanoparticles. These modified nanoparticles have been utilized for Cisplatin delivery on the lymphoma cell line (U937).

Methods: Magnetic nanoparticles were prepared by a co-precipitation method in the presence of Fe^{2+} and Fe^{3+} (9). In order to synthesize the polymer, ϵ -caprolactone and polyethylene glycol were polymerized by a ring-opening polymerization method. Triblock copolymer PCL-PEG-PCL was prepared through the ring-opening polymerization method (10). Magnetic iron nanoparticles were also prepared and confirmed using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction spectrum (XRD). Superparamagnetic nanoparticles modified with PCL-PEG-PCL copolymers loaded with cisplatin were developed using the double emulsion solvent evaporation method (11). The encapsulation efficiency of cisplatin loaded in nanoparticles was evaluated through UV spectroscopy at 280 nm (12).

Keywords
Modified Magnetic Nanoparticle, Cisplatin, Polycaprolactone, Polyethylene glycol, Cancer

Received: 08/04/2023

Published: 10/06/2023

Synthesized nanoparticles were evaluated in terms of particle size and morphology by dynamic light scattering (DLS) analysis and Scanning Electron Microscope (SEM), respectively. In addition, the chemical structure of PCL-PEG-PCL triblock copolymer and superparamagnetic nanoparticles modified with PCL-PEG-PCL copolymers loaded with cisplatin was confirmed using FTIR and proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR). Finally, the effect of synthesized nanoparticles on the lymphoma cell line (U937) was investigated using MTT assay (13).

Results: Magnetic iron nanoparticles were confirmed using FTIR and XRD. The size and shape of the nanoparticles were evaluated using DLS and SEM. The results show that the particle size was around 100-130 nm and the synthesized nanoparticles had uniform dispersion without aggregation. High entrapment of cisplatin was achieved using the double emulsion solvent evaporation method (98/07%). The hysteresis curves of iron magnetic nanoparticles and cisplatin-encapsulated magnetic nanoparticles PCL-PEG-PCL exhibited that in the presence of a magnetic field with an intensity up to 8000 Gauss, these particles have shown the magnetic properties (about 70 emu/g). When the magnetic field was removed, these nanoparticles lost their magnetic properties (0 emu/g). So, in the presence of a magnetic field, a magnetic orientation was demonstrated. The results of the cell viability assay using MTT dye showed that IC₅₀ of free Cisplatin and Cisplatin-encapsulated magnetic nanoparticles PCL-PEG-PCL on the U937 cancerous cell line is $119.70 \pm 4.46 \mu\text{g/ml}$, $17.35 \pm 1.48 \mu\text{g/ml}$, $13.58 \pm 1.59 \mu\text{g/ml}$ and $29.67 \pm 1.99 \mu\text{g/ml}$, $11.24 \pm 0.82 \mu\text{g/ml}$, $7.10 \pm 1.37 \mu\text{g/ml}$ respectively for 24, 48 and 72 hours incubation time. The anti-proliferative effect of cisplatin encapsulated in magnetic nanoparticles was more significantly cytotoxic on the cancerous target cells than free cisplatin.

Conclusion: Over the last decade, scientists have tried to develop new strategies for enhancing the therapeutic index while reducing side effects. In this regard, nanotechnology is considered one of the most effective strategies to which a huge share of research in this area is dedicated (3). Among all the nanoparticles SPIONs have attracted significant attention in cancer therapy because of their unique properties such as biocompatibility, biodegradability, and ease of chemical modification (5). The results of the study demonstrated that superparamagnetic nanoparticles modified with PCL-PEG copolymers efficiently delivered cisplatin into the U937 cells and demonstrated potent in-vitro anticancer activity which had a significant cytotoxic effect against lymphoma cell line (U937). Therefore, this delivery system can potentially be applied for the delivery of anti-cancer drugs and holds a great promise as an effective strategy for cancer treatment.

Conflicts of interest: None

Funding: Iran University of Medical Sciences

Cite this article as:

Hosseini A, Keyhanfar F, Hajiahmadi F, Hassanzadeh L, Ghods R, Ahmadvand D. Cisplatin-loaded Superparamagnetic Nanoparticles Modified with PCL-PEG Copolymers and Their Effectiveness Evaluation on Lymphoma Cell Line. Razi J Med Sci. 2023;30(3): 157-167.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

پلی کاپرولاتون‌ها اشاره کرد. این پلیمرها زیست‌سازگار بوده و با قابلیت تجزیه شدن در محیط بیولوژیک بدن حداقل سمتی را برای سلول‌های بدن در پی دارد. از طرفی پلی اتیلن گلیکول (PEG) پلیمری هیدروفیل است که به دلیل ایجاد پوشش هیدروفیل برای ترکیبات پلیمری موجب فرار آنها از سیستم ایمنی میزان و در نتیجه افزایش ماندگاری ترکیبات در خون شده و به همین دلیل در ترکیب بسیاری ازنانوذرات استفاده می‌شود (۸، ۷). در مطالعه حاضر نانو ذرات مغناطیسی آهن همراه با پوشش کوپلیمری کاپرولاتون‌ها و پلی اتیلن گلیکول به همراه داروی شیمی درمانی سیس پلاتین به عنوان سیستم دارو رسانی کارا در ارائه دوز کمتری از عامل شیمی درمانی، کنترل توزیع دارو در بدن و از بین بدن سلول‌های سرطان لنفوکما مورد مطالعه قرار گرفته است.

مقدمه

سرطان دسته‌ای از بیماری‌ها می‌باشد که به واسطه رشد و انتشار کنترل نشده سلول‌های غیر طبیعی ایجاد می‌گردد. سیس پلاتین (Sisplatin دی‌آمینو دی‌کلروپلاتین-۴) یک کمپلکس معدنی آسیب‌رسان به DNA است، که به طور گسترده‌ای برای درمان انواع مختلفی از سرطان‌ها شامل ریه، پستان، مثانه، تخمدان، دهانه رحم، پروستات، بیضه و سرطان گردن و سر استفاده می‌شود. یکی از معایب در کاربرد سیس پلاتین، غیرفعال شدن آن به علت تشکیل کمپلکس پیچیده با پروتئین‌پلاسمای و بافت و ایجاد مقاومت به سیس پلاتین است (۱، ۲). با توجه به افزایش شیوع و مرگ و میر ناشی از سرطان - سایه مختلط - فونق - صان روشنای شیمی درمانی و پرتو درمانی در فرم‌های پیشرفتی سرطان، نیاز به شیوه‌های جدیدی برای درمان سرطان احساس می‌شود. یکی از روشنایی‌های امیدبخش برای غلبه این مشکل استفاده از نانو ذرات برای حمل دارو به سلول‌های سرطانی است. نانو ذرات به عنوان ذرات خیلی کوچک با سایز بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر تعریف شده است. سیستم‌های دارورسانی با نانو ذرات منجر به پایداری دارو، افزایش زمان ماندگاری در جریان خون، ارائه دوز کمتری از عوامل موثر شیمی درمانی شده و کنترل توزیع دارو را در داخل بدن فراهم می‌کند (۳، ۴). امروزه استفاده از نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن در حوزه‌های مختلف پژوهشی برای تصویربرداری و انتقال دارو مورد توجه قرار گرفته است که نتایج موفقیت آمیزی در کاربرد تشخیصی و درمانی نشان داده اند. امتیاز این گونه نانوذرات مغناطیسی سهولت و تسريع آزادسازی بیومولکول‌های ویژه از مخلوط کمپلکس آن‌ها می‌باشد. این امر به این دلیل امکان‌پذیر است که بیومولکول‌های ثبت شده روی نانوذرات مغناطیسی به آسانی تو سط میدان مغناطیسی خارجی تحت کنترل هستند. علاوه بر این ثابت شده است که نانوذره‌های سوپرپارامغناطیس اکسید آهن می‌تواند از طریق افزایش دما در اطراف بافت توموری به درمان موثر تومورهای سرطانی نیز کمک کند (۵، ۶). برای بالا بردن قدرت درمانی و تشخیصی نانوذرات مغناطیسی معمولاً آن‌ها را به و سیله پلیمرهای مختلف پوشش می‌دهند. از مهمترین این پلیمرها می‌توان به

روش کار

تهیه نانوذرات مغناطیسی (Fe_3O_4) به روش هم‌رسوبی: برای تهیه نانوذرات مغناطیسی آهن از روش مرسم هم‌رسوبی (Co-Precipitation) استفاده شد (۹). در ابتدا مقدار ۷/۸۰۶ گرم (۲۸mmol) از FeCl₃.6H₂O و ۲/۹۶۷ گرم (۱۶mmol) از FeCl₂.4H₂O در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطور بدون اکسیژن به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط گردید. سپس محلول به دست آمده با عبور دادن جریان گاز نیتروژن اکسیژن‌زدایی شده و بالون سه دهانه به حمام سیلیکون دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. در ادامه میزان ۹۰ میلی‌لیتر آمونیاک ۰.۲۵٪ به داخل مخلوط واکنش وارد شد و در دمای اتاق روی همزن مغناطیسی با قدرت ۱۳۰۰ rpm قرار داده شد. به محض افزودن آمونیاک محلول زرد رنگ به یک باره سیاه رنگ می‌شود که نشانگر تشکیل نانوذرات مغناطیسی است که می‌توان توسط آهن ربا از آب جدا نمود.

سنتر کوپلیمر پلی کاپرولاتون-پلی اتیلن-گلیکول: برای سنتر کوپلیمرها از روش پلیمریزا سیون حلقه گشای مونومر کاپرولاتون و پلی‌اتیلن گلیکول به صورت پلیمریزا سیون انبوه استفاده شد (۱۰). مقدار مشخصی از پلی کاپرولاتون (PCL) و پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) (به نسبت ۳:۱ مولی) در یک بالون سه دهانه

از معادلات زیر محاسبه شد. (۱۳). درصد راندمان بارگزاری دارو = (مقدار داروی بارگزاری شده بر مقدار کل داروی اضافه شده) $\times 100$
 درصد دارو در نانوذره = (مقدار داروی بارگزاری شده بر مقدار نانوذره) $\times 100$

بررسی خصوصیات فیزیکی نانوذرات سنتز شده:
 مورفولوژی نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده با کوپلیمر PCL-PEG به همراه داروی بارگذاری شده سیسپلاتین با استفاده از میکرو سکوپ الکترونی SEM و در یک ولتاژ ۱۰ کیلووات مشاهده شد. قطر نانوذره ها نیز به واسه نرم افزار J-Image نیز مورد بررسی قرار گرفت. همچنین جهت بررسی سایز نانوذرات به دست آمده از روش پراکندگی نور دینامیکی به واسطه Dynamic Light Scattering particle size (DLS) استفاده شد.

بررسی سمیت سلولی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن بارگذاری شده با سیسپلاتین: در این مطالعه رده سلولی سرطانی لنفوما U937 که از بانک سلولی انسی-تیتو پاس-تور ته-ران خری-داری گردید مورد استفاده واقع شد. سلول ها در محیط کشت RPMI-1640 با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، سدیم پیرووات ۱۰۰ میلی مولار، ۱/۵ g/L سدیم بیکربنات و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنیسیلین-استرپتومایسین در انکوباتور (BINDER, USA) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی اکسید کربن نگهداری شدند. به منظور بررسی اثر سمیت نانوذرات سنتز شده بر روی تکثیر سلول های سرطانی از روش رنگ سنجی MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) استفاده شد. این روش یک تست متabolik رقابتی میتوکندریایی است و بر اساس شکستن نمک تترازولیوم توسعه آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول های زنده استوار است. در این روش تعداد مشخصی از سلول به همراه محیط کشت در پلیت ۹۶ خانه ای قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت غلظت دارو به واسطه روش اسپکتروسکوپی UV در nm ۲۸۰ اندازه گیری شد. راندمان بارگزاری دارو با استفاده

مجهز به ورودی و خروجی گاز نیتروژن قرار گرفتند. بالن بر روی همزن مغناطیسی مجهز به هیتر، به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد. برای کنترل دقیق دما در تمامی مراحل یک دماسنجد در درون حمام با ارتفاع ثابت و مساوی از ته بالون قرار داده شد. پس از ذوب شدن PEG، دما تا 120°C افزایش داده شد. سپس به ماده ای مذاب شده، اکتووات قلع (۰.۰۵٪ وزنی مواد اولیه) به عنوان کاتالیزور اضافه گردید تا واکنش پلیمریزاسیون شروع گردد. پلیمریزاسیون در این دما توان با هم زدن ملایم و جریان گاز نیتروژن ادامه یافت. برای خالص سازی پلیمر ناخالص و جدا کردن آن از مونومرهای باقی مانده، در دمای اتاق پلیمر جامد در دی کلرومتان حل شد و به داخل حجم زیادی از دی اتیل اتر خشک ریخته شد. دی اتیل اتر به عنوان حللال عمل کرده و منجر به تشکیل پلیمر گردید. این فرایند دو بار تکرار شد. در نهایت پلیمر به روش صاف کردن از حللال جدا شده و سپس در شرایط خلا متصل به دسیکاتور خشک گردید (۱۱).

بارگذاری داروی سیسپلاتین در نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده با کوپلیمر PCL-PEG
 جهت آماده سازی نانوذرات مغناطیسی تغییر یافته شده با کوپلیمر PCL-PEG و بارگذاری دارو به درون آن از روش امولسیون دوگانه (Double Emulsion) آغاز شد (۱۲). در ابتدا ۵ میلی گرم از نانوذره مغناطیسی و $2/6$ میلی گرم از داروی سیسپلاتین در ۲ میلی لیتر دی کلرومتان حاوی ۱۰۰ میلی گرم کوپلیمر PCL-PEG حل گردید. با استفاده از سونیکاتور پروپدار با توان ۱۰ وات به مدت ۴۵ ثانیه امولسیون اولیه W/O تهیه گردید. امولسیون اولیه به محلول آبی حاوی پایدار کننده (محلول ۰.۵٪ PVA) با حجم ۶-۱۰ میلی لیتر اضافه شده و مجددا در سونیکاتور پروپدار با توان ۱۸ وات به مدت ۶۰ ثانیه هموژنیزه گردید. امولسیون دوگانه W/O/W به دست آمده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد لیوفیلیزه گردید. در نهایت جهت بررسی میزان بارگذاری دارو، غلظت دارو به واسطه روش اسپکتروسکوپی UV در nm ۲۸۰ اندازه گیری شد. راندمان بارگزاری دارو با استفاده

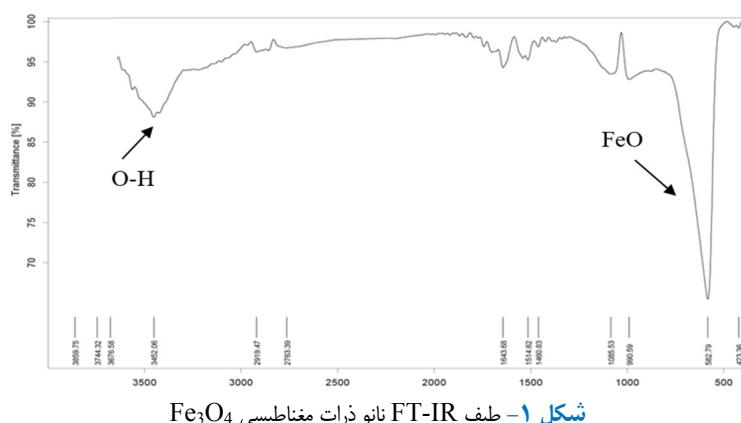
(۱۴).

یافته‌ها

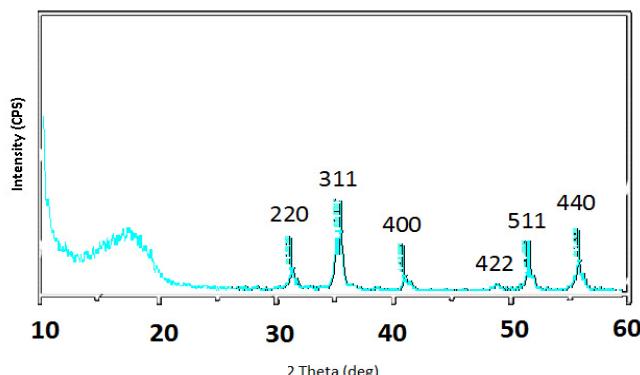
طیف FT-IR نانوذرات مغناطیسی آهن: شکل شماره یک مربوط به طیف FT-IR نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 می‌باشد. در این طیف نوار جذبی شدید در فرکانس حدود 582 cm^{-1} که مربوط به FeO می‌باشد و نوار جذبی متوسطی در فرکانس 3452 cm^{-1} که مربوط به O-H می‌باشد دیده می‌شود.

بررسی پراش اشعه ایکس (XRD) نانوذرات مغناطیسی آهن: ساختار کریستالی نانوذرات مغناطیسی سنتز شده، بو سیله‌ی XRD آنالیز گردید. مقدار 2θ در گستره‌ی بین ۲۰ تا ۱۰۰ در نظر گرفته شد. همانطور که انتظار می‌رود الگوی پراش یک ساختار مکعبی اسپینل تک فازی را برای مگنتیت نشان می‌دهد. در شکل شماره ۲ طیف XRD نانوذرات

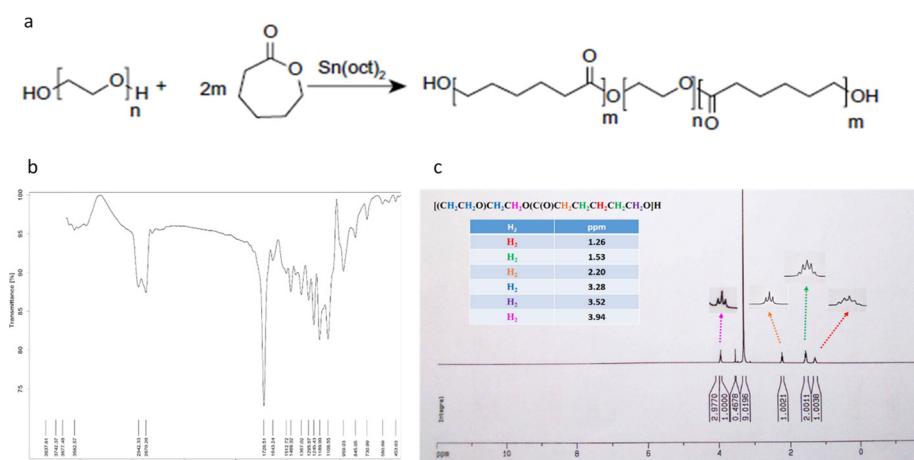
مقادیر مشابه از داروی سیس پلاتین آزاد به سلولها اضافه شد و به ترتیب طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند، پس از طی زمان‌های مذکور به هر خانه پلیت ۲۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۵ میلیگرم بر میلی لیتر اضافه شد و به مدت ۴ ساعت دیگر در تاریکی انکوبه شد. پس از طی زمان لازم محیط کشت حاوی MTT به دقت خارج شد و به هر خانه پلیت میزان ۲۰۰ میکرولیتر دی متیل اکساید جهت حل کردن فورمازان ارغوانی رنگ اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الایزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر در برابر طول موج رفرانس ۶۹۰ نانومتر قرائت شد. نتایج حاصله به صورت میزان بقای سلولی و IC50 غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد می‌شود براساس منحنی غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر) گزارش شدند



شکل ۱- طیف FT-IR نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4



شکل ۲- طیف پراش اشعه ایکس (XRD) مربوط به Fe_3O_4



شکل ۳-(a) ساختمان شیمیایی و روش تهیه کopolymer تری بلک PCL-PEG-PCL (b) طیف FT-IR (c) PCL-PEG-PCL کopolymer 1H-NMR

جدول ۱- شرایط سنتز و مشخصات کopolymer

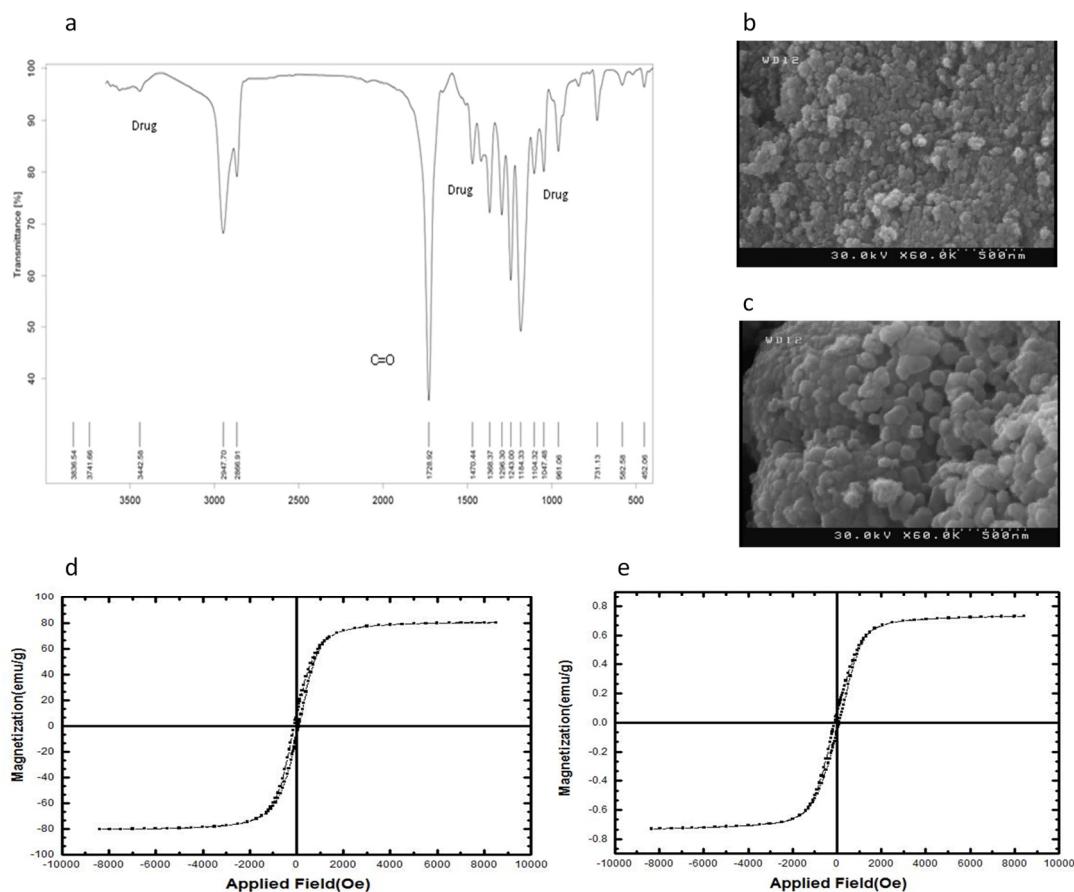
اندیس دیسپرسیون	جرم مولکولی پلیمر	بهره پلیمریزاسیون	نسبت PEG به PCL	علامت پلیمر
۱/۷	۱۲۰۰	%۸۵	۴۰:۱۰۰	PCL-PEG-PCL

۱۲۴۶ cm^{-1} به ترتیب ارتعاشات کششی پیوند C-O-C واحدهای -OCH₂CH₂-، پلی اتیلن گلیکول و پیوند -COO⁻ زنجیره پلیمر، و باند ۲۹۴۴ و ۲۸۶۶ cm^{-1} مخصوص ارتعاشات کششی پیوندهای C-H مربوط به CH₂CH₂ های کاپرولاکتون میباشند. باند جذبی در PCL-PEG ۳۴۳۶ cm^{-1} گروه هیدروکسیل انتهایی-CH₂CH₂ را نشان میدهد. پیک شارپ در δ ۳.۶۵ ppm مربوط به پروتون های متیلن PEG است. پیک ضعیف در δ ۴.۲۳ ppm پروتون های متیلن انتهایی PEG را نشان میدهد. پیک های مشاهده شده در ۱.۳۸، ۱.۶۵، ۲.۳۱، ۴.۰۶ ppm به ترتیب مربوط به پیوند های OCOCH₂CH₂-CH₂-CH₂-، OCOCH₂CH₂-CH₂-CH₂CH₂-، OCO-CH₂-(CH₂)_۴، CH₂-CH₂ موجود در پلی کاپرو لاکتون است.

PCL-PEG **طیف FT-IR نانوذرات مغناطیسی** **PCL** **بارگذاری شده با سیسپلاتین:** شکل شماره ۴ طیف FT-IR نانوذرات بارگذاری شده با سیسپلاتین و نانوذرات آهن را نشان میدهد. نتایج نشان داد که نوار جذبی شدید در فرکانس ۱۱۸۴ cm^{-1} مربوط به کششی پیوند های اتری (C-O-C) میباشد و نوار جذبی در

مغناطیسی آهن نشان داده شده است. شش پیک Fe₃O₄ به ترتیب ۵۱۱، ۴۴۰، ۴۲۲، ۳۱۱، ۲۲۰، ۱۱۱ ام مشخص شده که با خطوط طیفی ارائه شده در مراجع مطابقت کامل دارد. در کریستال های مربوط به نانوذرات Fe₃O₄ شدیدترین پیک مربوط به انعکاس ۳۱۱ است که تعیین کننده میانگین اندازه کریستال ها بوده که از فرمول دبای شر (Dhkl = ۰.۹λ (βCosθ)) حدود اندازه نانوذرات ۹ نانومتر بدست آمد. در این فرمول β نصف پهنه ای پراش XRD را نشان می دهد و λ برابر ۰/۱۵۴ نانومتر بوده و θ برابر نصف زاویه پراش ۲θ است.

کopolymer PCL-PEG با ساختمان شیمیایی مشخص که در شکل شماره ۳ نشان داده شده است از مونومر اپسیلون کاپرولاکتون و پلی اتیلن گلیکول به روش پلیمریزاسیون حلقه گشا با کاتالیست Sn(oct)₂ تهیه شد. در جدول شماره ۱ اطلاعات مربوط به شرایط سنتز و مشخصات کopolymer سنتز شده مورد بررسی قرار گرفته است. طیف مادون قرمز (FT-IR) و ۱H-NMR این کopolymer نیز در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. باند جذبی در ۱۷۲۵ cm^{-1} نشان دهنده ارتعاشات



شکل ۴-(a) طیف FTIR کوپلیمر بارگذاری شده با نانوذرات مغناطیسی و سیس پلاتین.(b): تصویر SEM نانوذرات مغناطیسی در بزرگنمایی 60.0k نشان می دهد. (c): تصویر SEM نانوذرات مغناطیسی PCL-PEG-PCL بارگذاری شده با سیس پلاتین (x60.0 k) (d) منحنی VSM نانوذرات مغناطیسی آهن، (e) منحنی VSM نانوذرات مغناطیسی PCL-PEG-PCL بارگذاری شده با سیس پلاتین

نانوذرات آهن رفتار سوپر پارامغناطیسی را بدون هیسترزیس مغناطیسی نشان می دهند. به این معنی که در حضور میدان مغناطیسی و با افزایش شدت میدان تا حدود ۸۰۰۰ گاوس، خاصیت مغناطیسی در حدود ۷۰ emu/g از خود نشان می دهند ولی به محض خارج کردن از میدان مغناطیسی این ذرات خاص بیت مغناطیسی خود را به طور کامل از دست می دهند (۰.۰ emu/g). پس در حضور میدان جهت گیری های مغناطیسی صورت می گیرد که با برداشتن میدان این جهت گیری ها به هم می خورند. پس می توان نتیجه گرفت Fe_3O_4 تهییه شده یک ذرهی سوپر پارامغناطیس است که با اعمال میدان مغناطیسی، خاصیت مغناطیس

فرکانس حدود 3677cm^{-1} مربوط به گروههای هیدروکسیل پلیمر می باشد. همچنین نوار جذبی در فرکانس حدود 3442cm^{-1} و 3442cm^{-1} مربوط به داروی سیس پلاتین و نوار جذبی در فرکانس حدود 450cm^{-1} مربوط به پیوند Fe-O می باشد. علاوه بر آن نوار جذبی تیز و شدیدی در فرکانس 1728cm^{-1} مشاهده شد که وجود گروههای کربوکسیلیک استری را نشان می دهد. در شکل شماره ۴ (d) و (e) منحنی هیسترزیس (تأخیر تغییر دانسیته شار مغناطیسی نسبت به شدت میدان مغناطیسی) نانوذرات مغناطیسی آهن و نانوذرات ذرات مغناطیسی PCL-PEG-PCL بارگذاری شده با سیس پلاتین نشان داده است. نتایج نشان داد که

ذرات در مایع به شکل کروی هستند. همچنین نتایج پراکندگی نور دینامیکی نشان داده شد که اندازه سایز نانوذرات پس از اصلاح سطحی نانوپارتیکل های نانومغناطیسی و لود دارو از ۱۰۰ نانومتر به ۱۳۰ نانومتر افزایش یافته است. بهره انکپسولاسیون دارو در نانوذرات به روش غیرمستقیم و با اندازه گیری غلظت دارو در محلول باقی مانده از امولسیفیکا سیون تعیین گردید که نتایج درصد بالایی از لود دارو را نشان داد (جدول شماره ۲).

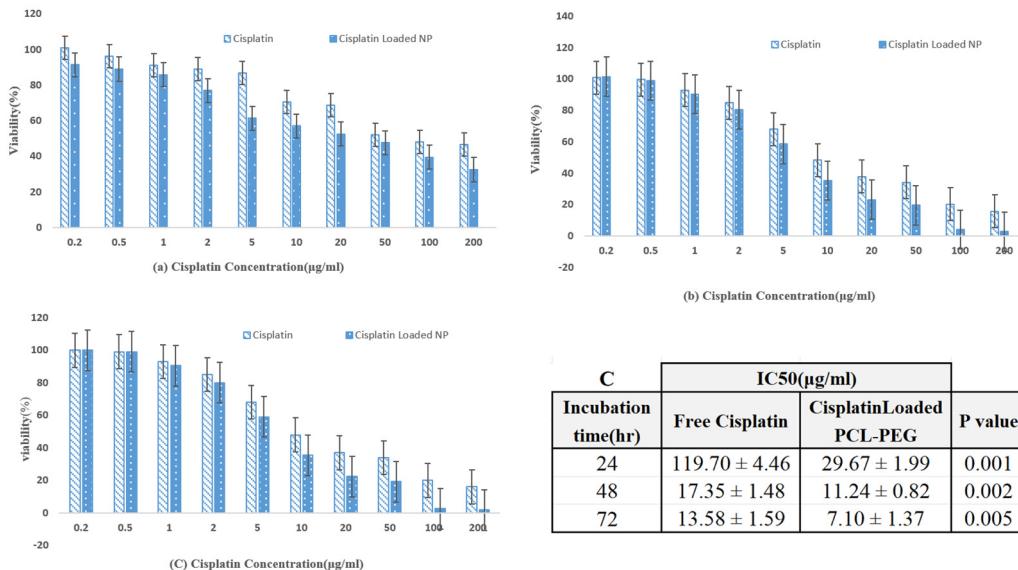
بررسی سمیت سلولی سیسپلاتین و نانوذرات سنتز شده بر روی رده سلولی لنفوما U937: اثر سیسپلاتین به تنهایی و به همراه نانو ذرات مغناطیسی در غلظت های مختلف بر روی رده سلولی لنفوما U937 در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (شکل شماره ۵). نتایج نشان داد که سیس

قوی در حدود ۷۰ emu/g از خود نشان می دهد که به محض حذف این میدان نانوذرات مغناطیسی با یک تکان آرام پخش می شوند. این خاصیت نانو ذرات مغناطیسی در کاربردهای گسترده‌ی آن‌ها در شاخه‌های بیومدیکال و بیومهندسی حائز اهمیت است.

خصوصیات فیزیکو شیمیایی نانوذرات سنتز شده: جهت بررسی سایز و مرغولوزی نانوذرات سنتز شده از روش پراکندگی نور دینامیکی به واسطه DLS و میکروسکوپ الکترونی SEM به ترتیب استفاده شد (جدول شماره ۲). جهت عکس برداری با میکروسکوپ ابتدا کوپلیمر ها در مقادار جزئی آب حل شده و سوسپانسیون حاصل در روی گرید طلا مورد تصویربرداری SEM قرار گرفت. شکل شماره ۴ (b) و (c) تصویر میکروسکوپی نانوذرات مغناطیسی تهیه شده را در بزرگنمایی ۶۰.۰k نشان می دهد. نتایج نشان داد که

جدول ۲- مشخصات فیزیکو شیمیایی نانوپارتیکل های PCL-PEG-PCL حاوی سیسپلاتین

بهره انکپسولاسیون	نسبت دارو به پلیمر	نسبت PEG به CL	PCL-PEG-PCL
% ۹۸/۰	۵:۱۰	۱۰۰:۴۰	



شکل ۵- مقایسه سمیت سیسپلاتین آزاد و نانوذره حاوی دارو بر رده سلولی U937 پس از ۲۴ ساعت (a)، ۴۸ ساعت (b)، ۷۲ ساعت (c) جدول نتایج IC50 به دست آمده در روزهای مختلفی از استفاده دارو (d)

کوپلیمرهای PCL به طور گستردگی به منظور نانو انکپسولاسیون انواع داروها استفاده شده است. در مطالعه ای که توسط Feng و همکاران انجام شد، کوپلیمرهای مختلفی توسط کاپرولاكتون و PEG4000 و PEG6000 تهیه شدند و برای نانو انکپسولاسیون و انتقال دارویی کورکومین مورد استفاده قرار گرفته شد. نانوذرات سنتز شده به واسطه روش اموالسیون-تبخیر تهیه گردید و سایز آن‌ها در حدود ۶۶ nm گزارش شده است (۱۵). در این پژوهه همانطور که تو ضیح داده شد از روش اموالسیون دوتایی W/O/W برای تهیه نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده به واسطه کوپلیمرهای (PCL-PEG-PCL) در بارگذاری و انتقال داروی سیسپلاتین استفاده گردید. اندازه این نانوذرات در حدود ۱۳۰ nm و میزان لود دارو به میزان بالایی به دست آمد (حدود ۹۸٪) (جدول ۲).

علاوه بر این نانوذره تهیه شده، یک ذره‌ی سوپر پارامغناطیس بوده که با اعمال میدان مغناطیسی، خاصیت مغناطیس قوی در حدود ۷۰ emu/g از خود نشان می‌دهد. از این خاصیت نانو ذرات مغناطیسی می‌توان در جهت انتقال هدفمند دارو به محل بافت‌های سرطانی استفاده کرد. همچنین ساختارهای تهیه شده با توجه به تصاویر میکروسکوپ الکترونی رویشی از مورفولوژی مناسب و یکدستی برخوردار بودند. از طرفی با توجه به اینکه نانوذرات سنتز شده حساس به دما و pH هستند، داروی ضد سرطان با تغییر هر کدام از این شرایط در محیط خارج سلولی بافت‌های سرطانی، به آسانی در این محیط می‌تواند رهایش یابد. مطالعات کشت سلولی نشان دادند که نانوذرات بدون دارو (بلانک) هیچ سمتی از خود نشان نمی‌دهند. همچنین در صد بقاء و زنده ماندن سلول در مورد ذرات حاوی داروی ضد سرطان وابسته به زمان است، یعنی با گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با نانوذرات، این نانوذرات همچنان بسته به میزان داروی بارگذاری شده اثر کشنده‌گی خود را حفظ می‌کنند. در حالی که در مورد داروی سیسپلاتین آزاد در همان ساعت‌های اولیه (حداکثر تا ۲۴ ساعت)، اثر کشنده‌گی مشاهده می‌شود پس از این مدت به دلیل حذف دارو، نیاز به

پلاتین نانوکپسوله شده میزان کشنده‌گی بیشتری بر روی سلول‌های هدف سرطانی دارد. همچنین نتایج نشان داد که IC50 سیسپلاتین لود شده در PCL-PEG-PCL کمتر از IC50 سیسپلاتین به تنها یکی در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت می‌باشد. بررسی نانوکپسول به تنها یکی بر روی سلول‌ها در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت هیچگونه سمتی بر روی سلول‌ها نشان نداد.

بحث

سیسپلاتین به عنوان یک داروی شیمی درمانی در درمان بسیاری از انواع مختلفی از سرطان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد اما عواملی از قبیل ناپایداری شیمیایی، نفوذ پذیری پایین دارو به داخل سلول و سمتی بالای آن منجر به استفاده محدود این دارو شده است. استفاده از این داروها به صورت غیر اختصاصی بوده که پس از تزریق، دارو به طور تصادفی از طریق گردش خون در بدن انتشار یافته که می‌تواند باعث ایجاد عوارض جانبی در سلول‌های سالم شود یا این که با داروهای دیگری که برای بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد ناسازگار باشد و باعث اختلال شود. بنابراین انتقال این دسته از داروها به ناحیه مورد هدف می‌تواند تا میزان زیادی عوارض جانبی و میزان داروی مورد نیاز را کاهش دهد. امروزه جهت انتقال دارو و بهبود پروسه درمان، نانو ساختارهای فراوانی تهیه گردیده که در این میان نانوذرات مغناطیسی به عنوان یکی از حاملین دارویی موثر مطرح می‌باشد. به طوریکه با ایجاد یک میدان مغناطیسی خارجی می‌توان دارو را به صورت هدفمند به محل مورد نظر هدایت کرد (۵). در این مطالعه از نانو ذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده با یک پوشش پلیمری به عنوان سیستم حامل برای داروی شیمی درمانی سیسپلاتین استفاده شد. یکی از مهمترین مزیت استفاده از این پوشش‌های پلیمری مورد استفاده در سیستم‌های دارو رسانی هدفمند به حداقل رساندن جذب آن‌ها توسط سیستم رتیکولوندوتلیال و متعاقب آن افزایش نیمه عمر این نانوذرات بوده است (۷). در سال‌های اخیر از

رصد رفتار دارو در بدن می باشد

تقدیر و تشکر

نویسنده‌گان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران به دلیل حمایت و تأمین هزینه های طرح کمال تشکر را دارند. (کد طرح پژوهشی: ۹۶-۰۲-۸۷-۳۰۵۳۲)

References

- Catanzaro D, Nicolosi S, Cocetta V, Salvalaio M, Pagetta A, Ragazzi E, et al. Cisplatin liposome and 6-amino nicotinamide combination to overcome drug resistance in ovarian cancer cells. *Oncotarget*. 2018;9(24):16847.
- Cox TR. The matrix in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2021;21(4):217-38.
- Vargason AM, Anselmo AC, Mitragotri S. The evolution of commercial drug delivery technologies. *Nat Biomed Eng*. 2021;5(9):951-67.
- Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(2):101-24.
- Fathallah AH, Akbar HS, Al-Deen FMN. Preparation and Characterization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (Fe_3O_4) for Biological Applications. *Tikrit J Pure Sci*. 2021;26(1):76-84.
- Salvador M, Gutiérrez G, Noriega S, Moyano A, Blanco-López MC, Matos M. Microemulsion synthesis of superparamagnetic nanoparticles for bioapplications. *Int J Mol Sci*. 2021;22(1):427.
- Cui Y, Jin R, Zhou Y, Yu M, Ling Y, Wang L-Q. Crystallization enhanced thermal-sensitive hydrogels of PCL-PEG-PCL triblock copolymer for 3D printing. *Biomed Mat*. 2021;16(3):035006.
- Fu Y, Ding Y, Zhang L, Zhang Y, Liu J, Yu P. Poly ethylene glycol (PEG)-Related controllable and sustainable antidiabetic drug delivery systems. *Eur J Med Chem*. 2021;217:113372.
- Birnbaum DT, Brannon-Peppas L. Microparticle drug delivery systems. *Drug delivery systems in cancer therapy*: Springer; 2004. p. 117-35.
- Carrot G, Rutot-Houzé D, Pottier A, Degée P, Hilborn J, Dubois P. Surface-initiated ring-opening polymerization: A versatile method for nanoparticle ordering. *Macromolecules*. 2002;35(22):8400-4.
- Thi Hong Anh Nguyen¹ and Van Cuong Nguyen² Formation of nanoparticles in aqueous solution from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethyleneglycol)-poly(ϵ -

استفاده‌های مجدد از سیسپلاتین وجود دارد، که در سطح بالینی در هر مرحله عوارض جانبی زیادی از خود بر جای می‌گذارند و این مطلوب نیست. با توجه به مقادیر P-value بدست آمده کمتر از ۰/۰۵ برای IC50 ها در دو حالت داروی سیسپلاتین آزاد و داروی نانوکپسوله شده در زمانهای ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت می‌توان نتیجه گرفت میزان کشندگی دارو در دو گروه اختلاف معنی داری دارند. همچنین از آنجاییکه داروی سیسپلاتین جهت تاثیر سایتوکسیک نیاز به عبور از غشاء سلول و رسیدن به DNA سلول را دارد که با توجه به ساختار نمک مانند آن میزان ورود دارو بصورت انتقال غیر فعال تنها به صورت کسر کوچکی از میزان دارو انجام می‌گیرد. ولی از آنجایی که میسلهای PCL-PEG-PCL (Core Shell) دارند و ساختار هسته پوسته (Core Shell) قسمت هسته و PEG قسمت پوسته را تشکیل می‌دهد(16). لذا به دلیل بالا بودن لیپوفیلیسیته قسمت پوسته (PEG) می‌توان فرض کرد که میزان ورود نانوکپسول به داخل سلول در مقایسه با داروی سیسپلاتین بصورت آزاد افزایش یافته است. لذا میزان دارویی که به DNA سلول می‌رسد در حالتی که دارو نانوکپسوله شده است بیشتر می‌باشد و نتیجه میزان کشندگی بالاتر داروی سیسپلاتین در حالت نانوکپسول می‌تواند باشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه نانو کوپولیمر PCL-PEG-PCL با ترکیب ساختمانی جدید و با بهره انکپسولاسان مطلوب داروی سیسپلاتین تهیه گردید که به جهت حضور Fe_2O_3 خاصیت مغناطیس پذیری از خود نشان می‌دهد. مطالعات in-vitro اثر کشندگی مطلوب و بلند مدت را برای داروی انکپسوله در مقایسه با داروی آزاد سیسپلاتین به علت تغییرات ایجاد شده از نظر میزان آب دوستی نشان داد که می‌تواند امیدوار کننده در شیمی درمانی سرطان، در انتقال هرچه بیشتر دارو به بافت هدف و کاهش عوارض ناشی از اثر داروی آزاد بر بافتها و سلولهای نرمал باشد. جهت بحث پیرامون نتایج مشاهده شده در بدن، نیاز به مطالعات in-vivo جهت

caprolactone). Advances in natural sciences: Nanosci. Nanotechnol. 1(2010) 025012 (5pp).

12. Zambaux MF, Bonneaux F, Gref R, Maincent P, Dellacherie E, Alonso M, et al. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. J Control Release. 1998;50 (31):1-40.

13. Zhang Z, Feng SS. The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly (lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles. Biomaterials. 2006;27(21):4025-33.

14. Kim JH, Kim YS, Park K, Lee S, Nam HY, Min KH, et al. Antitumor efficacy of cisplatin-loaded glycol chitosan nanoparticles in tumor-bearing mice. J Control Release. 2008;127(1):41-9.

15. Feng R, Song Z, Zhai G. Preparation and in vivo pharmacokinetics of curcumin-loaded PCL-PEG-PCL triblock copolymeric nanoparticles. Int J Nanomed. 2012;7:4089.

16. Reynolds AR, Moghimi SM, Hodivala-Dilke K. Nanoparticle-mediated gene delivery to tumour neovasculature. Trends Mol Med. 2003;9(1):2-4.