



سنتز نانوذره مغناطیسی اصلاح شده با پلی کاپرولاکتون-پلی اتیلن گلیکول (PCL-PEG) حاوی داروی سیس پلاتین و ارزیابی اثربخشی آن‌ها بر روی رده سلولی لنفوما

ارسطو حسینی: دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
فریبرز کیهان فرد: استاد داروشناسی (فارماکولوژی)، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران ایران
فهیمة حاجی احمدی: دانشیار بیوشیمی بالینی، گروه علوم و فناوری تصویربرداری پزشکی (گرایش تصویربرداری مولکولی)، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران ایران
لیلا حسن زاده: استادیار داروسازی هسته‌ای، گروه پزشکی هسته‌ای، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
رویا قدس: استادیار پزشکی مولکولی، گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران ایران
داود احمدوند: دانشیار بیوشیمی بالینی، گروه علوم و فناوری تصویربرداری پزشکی (گرایش تصویربرداری مولکولی)، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران ایران * (نویسنده مسئول) d.ahmadvand@iums.ac.ir

چکیده

کلیدواژه‌ها

نانوذره مغناطیسی اصلاح شده،
سیس پلاتین،
پلی کاپرولاکتون،
پلی اتیلن گلیکول،
سرطان

زمینه و هدف: امروزه استفاده از نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن در حوزه‌های مختلف پزشکی برای تصویربرداری و انتقال دارو مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه نانو ذرات مغناطیسی آهن سنتز شده به عنوان سیستم دارو رسانی کارا در ارائه دوز کمتری از عامل شیمی درمانی و از بین بردن سلول‌های سرطان لنفوما مورد مطالعه قرار گرفته است.
روش کار: در مطالعه حاضر، نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن Fe_3O_4 اصلاح شده با کopolymerهای کاپرولاکتون و پلی اتیلن گلیکول حاوی داروی شیمی درمانی سیس پلاتین به روش هم رسوبی سنتز شدند. میزان بارگذاری دارو به واسطه روش اسپکتروسکوپی UV اندازه گیری شد. اندازه و مورفولوژی نانو پارٹیکل‌های سنتز شده به واسطه پراکندگی نور دینامیکی و میکروسکوپ الکترونی SEM مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت اثرات سمیت سلولی نانوذرات سنتز شده بر روی رده سلولی سرطانی لنفوما U937 مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: داروی سیس پلاتین با راندمان بالایی در حدود ۹۸ درصد در نانو ذرات مغناطیسی اصلاح شده با کopolymer PCL-PEG تهیه گردید. ساختارهای تهیه شده با توجه به تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM از مورفولوژی مناسب و یکدستی برخوردار بودند. نانو ذرات مغناطیسی لود شده با سیس پلاتین در مقایسه با کاربرد سیس پلاتین به صورت آزاد اثرات کشندگی 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 نانو ذرات مغناطیسی اصلاح شده با کopolymer را می‌توان 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 3.0 CC BY-NC-SA 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

D 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 ($^1\text{H-NMR}$). 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.**

مقدمه

پلی کاپرولاکتون‌ها اشاره کرد. این پلیمرها زیست سازگار بوده و با قابلیت تجزیه شدن در محیط بیولوژیک بدن حداقل سمیت 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 میزبان و در نتیجه افزایش ماندگاری ترکیبات در خون شده و به همین دلیل در ترکیب بسیاری از نانوذرات استفاده می‌شود (۷، ۸). در مطالعه حاضر نانو ذرات مغناطیسی آهن همراه با پوشش کوپلیمری کاپرولاکتون‌ها 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 بردن سلول‌های سرطان لنفوما مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش کار

تهیه نانوذرات مغناطیسی (Fe_3O_4) به روش هم‌رسوبی: برای تهیه نانوذرات مغناطیسی آهن از روش هم رسوب سوبی (Co-Precipitation) استفاده شد (۹). در ابتدا مقدار $7/106$ گرم (2mmol) از $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ و $2/967$ گرم (16mmol) از $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ در 50 میلی لیتر آب مقطر بدون اکسیژن به مدت 30 دقیقه مخلوط گردید. سپس محلول به دست آمده با عبور دادن جریان گاز نیتروژن اکسیژن زدایی شده و بالون سه دهانه به حمام سیلیکون دمای 85 درجه سانتی گراد انتقال داده شد. در ادامه میزان 90 میلی لیتر آمونیاک 25% به داخل مخلوط واکنش وارد شد و در دمای اتاق روی همزن مغناطیسی با قدرت 1300 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 آهن‌ریا از آب جدا نمود.

سنتز کوپلیمر پلی کاپرولاکتون-پلی اتیلن-گلیکول: برای سنتز کوپلیمرها از روش پلیمریزاسیون حلقه گشای مونومر کاپرولاکتون و پلی اتیلن گلیکول به صورت پلیمریزاسیون انبوه استفاده شد (10). مقدار مشخصی از پلی کاپرولاکتون (PCL) و پلی اتیلن گلیکول (PEG) (به نسبت $3:1$ مولی) در یک بالون سه دهانه

سرطان دستهای از بیماری‌ها می‌باشد که به واسطه رشد و انتشار کنترل نشده سلول‌های غیر طبیعی ایجاد می‌گردد. سیس پلاتین (سیس دی آمینو دی کلروپلاتین-نوم) یک کمپلکس معدنی آسیب رسان 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 پروتئین پلاسما و بافت و ایجاد مقاومت به سیس پلاتین است (۱، ۲). با توجه به افزایش شیوع و مرگ و میر ناشی از سرطان‌ها - های مختل - ف و نق - صان روش‌های شیمی درمانی و پرتودرمانی در فرم‌های پیشرفته سرطان، نیاز به شیوه‌های جدیدی برای درمان سرطان احساس می‌شود. یکی از روش‌های 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 1 تا 100 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 پزشکی برای تصویر برداری و انتقال دارو مورد توجه قرار گرفته است که نتایج موفقیت آمیزی در کاربرد تشخیصی و درمانی نشان داده‌اند. امتیاز این گونه نانوذرات مغناطیسی سهولت و تسریع آزادسازی بیومولکول‌های ویژه از مخلوط کمپلکس آن‌ها می‌باشد. این امر به این دلیل امکان‌پذیر است که بیومولکول‌های تثبیت شده روی نانوذرات مغناطیسی به آسانی توسط میدان مغناطیس خارجی تحت کنترل هستند. علاوه بر این ثابت شده است که نانوذره‌های سوپراپارامغناطیس 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 وسیله پلیمرهای مختلف پوشش می‌دهند. از مهمترین این پلیمرها می‌توان به

از معادلات زیر محاسبه شد. (۱۳). درصد راندمان بارگزاری دارو = (مقدار داروی بارگزاری شده بر مقدار کل داروی اضافه شده) × ۱۰۰
در صد دارو در نانوذره = (مقدار داروی بارگزاری شده بر مقدار نانوذره) × ۱۰۰

بررسی خصوصیات فیزیکی نانوذرات سنتز شده:
مورفولوژی نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده با کوپلیمر PCL-PEG به همراه داروی بارگذاری شده سیس پلاتین با استفاده از میکرو سکوپ الکترونی SEM و در یک ولتاژ ۱۰ کیلووات مشاهده شد. قطر نانوذره ها نیز به واسطه نرم افزار Image J 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 سیس پلاتین: در این مطالعه رده سلولی سرطانی لنفوما U937 که از بانک سلولی انیس-تیتو پاس-تور ته-ران خریداری 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 پنسیلین-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 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) استفاده شد. این روش یک تست متابولیک رقابتی میتوکندریایی است و بر اساس شکستن نمک تترازولیوم توسط 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 های مختلفی از نانوذرات سنتز شده که محتوی مقادیر متفاوتی از داروی سیس پلاتین بودند و

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 دماسنج در درون حمام با ارتفاع ثابت و مساوی از ته بالن قرار داده شد. پس از ذوب شدن PEG، دما تا ۱۲۰ °C افزایش داده شد. سپس به ماده ی مذاب شده، اکتوات قلع (۵٪ وزنی مواد اولیه) به عنوان کاتالیزور اضافه گردید تا واکنش پلیمریزاسیون شروع گردد. پلیمریزاسیون در این دما توام 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 حلال عمل کرده و منجر به تشکیل پلیمر گردید. این فرایند دو بار تکرار شد. در نهایت پلیمر به روش صاف کردن از حلال جدا شده و سپس در شرایط خلا متصل به دسیکاتور خشک گردید (۱۱).

بارگذاری داروی سیس پلاتین در نانو ذرات مغناطیسی اصلاح شده با کوپلیمر PCL-PEG:
جهت آماده سازی نانو ذرات مغناطیسی تغییر یافته شده با کوپلیمر PCL-PEG و بارگذاری دارو به درون آن از روش امولسیون دو گانه (Double Emulsion) استفاده شد (۱۲). در ابتدا ۵ میلی گرم از نانوذره مغناطیسی و ۲/۶ میلی گرم از داروی سیس پلاتین در ۲ میلی لیتر دی کلرومتان حاوی ۱۰۰ میلی گرم کوپلیمر PCL-PEG حل گردید. با استفاده از سونیکاتور پروپ دار با توان ۱۰ وات به مدت ۴۵ ثانیه امولسیون اولیه W/O تهیه گردید. امولسیون اولیه به محلول آبی حاوی پایدارکننده (محلول ۰.۵٪ PVA) با حجم ۱۰-۶ میلی لیتر اضافه شده و مجددا در سونیکاتور پروپ دار 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 ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. راندمان بارگذاری دارو با استفاده

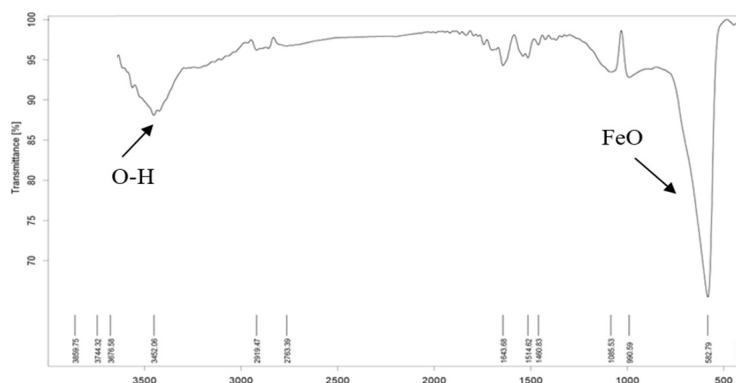
(۱۴).

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 رفرنس ۶۹۰ نانومتر قرائت شد. نتایج حاصله به صورت میزان بقای سلولی و IC50 غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد می شود براساس منحنی غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر) گزارش شدند

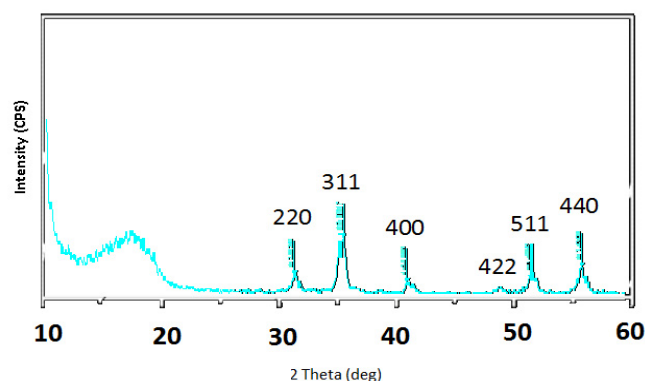
یافته‌ها

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

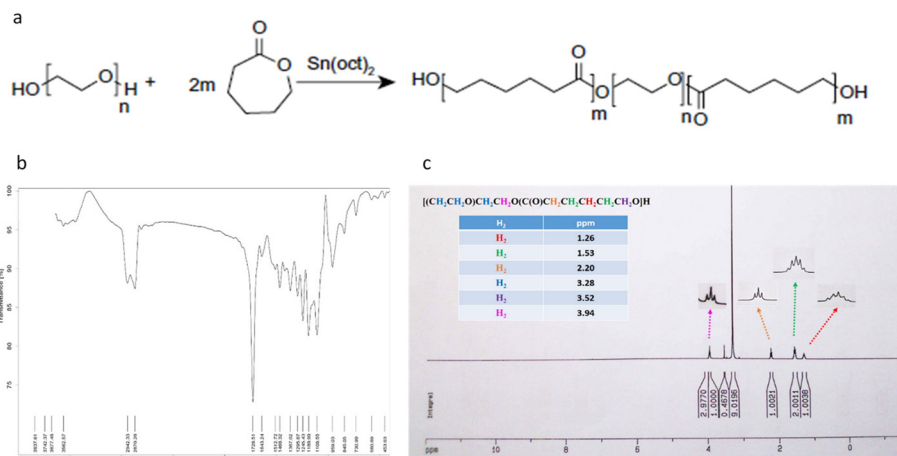
بررسی پراش اشعه ایکس (XRD) نانو ذرات مغناطیسی آهن: ساختار کریستالی نانو ذرات مغناطیسی سنتز شده، بوسیله XRD آنالیز گردید. مقدار 2θ در گستره‌ی بین ۲۰ تا ۱۰۰ در نظر گرفته شد. همانطور که انتظار می رود الگوی پراش یک ساختار مکعبی اسپینل تک فازی را برای مگنتیت نشان می دهد. در شکل شماره ۲ طیف XRD نانو ذرات



شکل ۱- طیف FT-IR نانو ذرات مغناطیسی Fe_3O_4



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



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

جدول ۱- شرایط سنتز و مشخصات کوپلیمر PCL-PEG-PCL

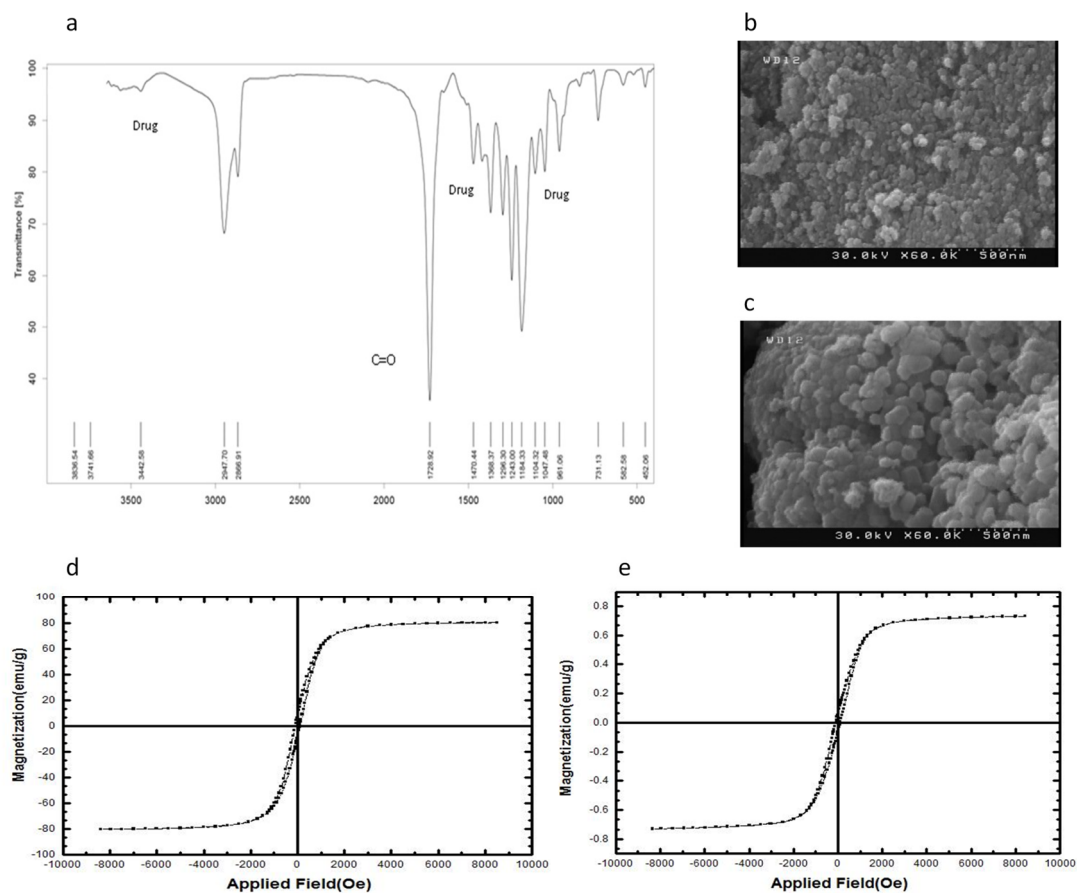
| اندیس دیسپرسیون | جرم مولکولی پلیمر | بهره پلیمریزاسیون | جرم مولکولی PEG | نسبت PEG به PCL | علامت پلیمر |
|-----------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------|
| ۱/۷ | ۱۲۰۰۰ | %۸۵ | ۱۰۰۰ | ۴۰:۱۰۰ | PCL-PEG-PCL |

1246 cm^{-1} به ترتیب ارتعاشات کششی پیوند C-O-C و واحدهای $\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{-}$ پلی اتیلن گلیکول و پیوند -COO^- زنجیره پلیمر، و باند 2944 و 2866 cm^{-1} مخصوص ارتعاشات کششی پیوندهای C-H مربوط به CH_2CH_2 های کاپرولاکتون می باشند. باند جذبی در 3436 cm^{-1} گروه هیدروکسیل انتهایی PCL-PEG- را نشان می دهد. پیک شارپ در 3.65 ppm مربوط به پروتون های متیلن PEG است. پیک ضعیف در 4.23 ppm پروتون های متیلن انتهایی PEG را نشان می دهد. پیک های مشاهده شده در 1.38 ، 1.65 ، 2.31 ، 4.06 ppm به ترتیب مربوط به پیوندهای $\text{OCOCH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ، $\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ ، $\text{OCO-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ موجود در پلی کاپرولاکتون است.

طیف FT-IR نانوذرات مغناطیسی PCL-PEG- بارگذاری شده با سیس پلاتین: شکل شماره ۴ طیف FT-IR نانوذرات بارگذاری شده با سیس پلاتین و نانوذرات آهن را نشان می دهد. نتایج نشان داد که نوار جذبی شدید در فرکانس 1184 cm^{-1} مربوط به پیوندهای اتری (C-O-C) می باشد و نوار جذبی در

مغناطیسی آهن نشان داده شده است. شش پیک Fe_3O_4 به ترتیب 511 ، 440 ، 422 ، 400 ، 311 ، 220 مشخص شده که با خطوط طیفی ارائه شده در مراجع مطابقت کامل دارد. در کریستال های مربوط به نانوذرات Fe_3O_4 شدیدترین پیک مربوط به انعکاس 311 است که تعیین کننده میانیگین اندازه کریستال ها بوده که از فرمول دبی شرر $(D_{hkl} = 0.9\lambda / (\beta \cos\theta))$ حدود اندازه نانوذرات 9 نانومتر بدست آمد. در این فرمول β نصف پهنای پراش XRD را نشان می دهد و λ برابر 0.154 نانومتر بوده و θ برابر نصف زاویه پراش 2θ است.

کوپلیمر 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 یک اطلاعات مربوط به شرایط سنتز و مشخصات کوپلیمر سنتز شده مورد بررسی قرار گرفته است. طیف مادون قرمز (FT-IR) و 1H-NMR این کوپلیمر نیز در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. باند جذبی در 1725 cm^{-1} نشان دهنده ارتعاشات کششی پیوند استری زنجیر اصلی پلیمر، در 1107 و



شکل ۴- طیف FTIR کopolymer بارگذاری شده با نانوذرات مغناطیسی و سیس پلاتین (b): تصویر SEM نانوذرات مغناطیسی PCL-PEG-PCL را در بزرگنمایی 60.0k نشان می‌دهد. (c): تصویر SEM نانوذرات مغناطیسی PCL-PEG-PCL بارگذاری شده با سیس پلاتین (x60.0 k) 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 هیستریزیس مغناطیسی نشان می‌دهند. به این معنی که در حضور میدان مغناطیسی و با افزایش شدت میدان تا حدود 8000 گاوس، خاصیت مغناطیسی در حدود 70 emu/g از خود نشان می‌دهند ولی به محض خارج کردن از میدان مغناطیسی این ذرات خاصیت مغناطیسی خود را به طور کامل از دست می‌دهند (0 emu/g). پس در حضور میدان جهت‌گیری‌های مغناطیسی صورت می‌گیرد که با برداشتن میدان این جهت‌گیری‌ها به هم می‌خورند. پس می‌توان نتیجه گرفت Fe_3O_4 تهیه شده یک ذره سوپر پارامغناطیس است که با اعمال میدان مغناطیسی، خاصیت مغناطیس

فرکانس حدود $3677 cm^{-1}$ مربوط به گروه‌های هیدروکسیل پلیمر می‌باشد. همچنین نوار جذبی در فرکانس حدود $3442 cm^{-1}$ و $731 cm^{-1}$ مربوط به داروی سیس پلاتین و نوار جذبی در فرکانس حدود $450 cm^{-1}$ مربوط به پیوند Fe-O می‌باشد. علاوه بر آن نوار جذبی تیز و شدیدی در فرکانس $1728 cm^{-1}$ مشاهده شد که وجود گروه‌های کربوکسیلیک استری را نشان می‌دهد. در شکل شماره 4 (d و e) منحنی هیستریزیس (تأخیر تغییر دانه‌سایته شار مغناطیسی نسبت به شدت میدان مغناطیسی) نانوذرات مغناطیسی آهن و نانوذرات مغناطیسی PCL-PEG-PCL بارگذاری شده با سیس پلاتین نشان داده شده 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 نانو پارتهیکیل 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 امولسیفیکاسیون تعیین گردید که نتایج درصد بالایی از لود دارو را نشان داد (جدول شماره ۲).

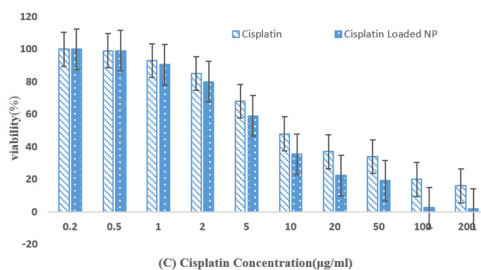
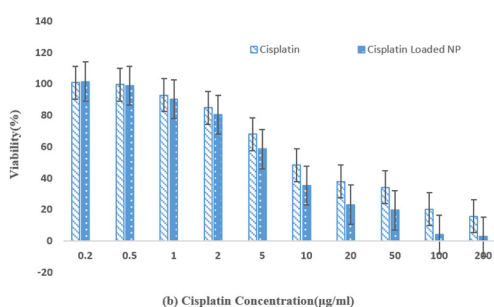
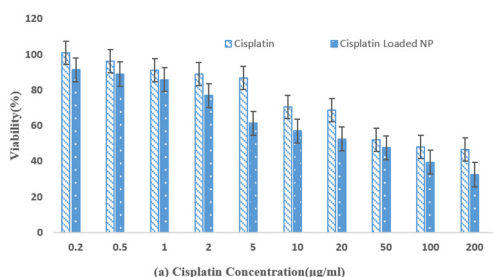
بررسی سمیت سلولی سیس پلاتین و نانوذرات سنتز شده بر روی رده سلولی لنفوما U937: اثر سیس پلاتین به تنهایی و به همراه نانو ذرات مغناطیسی در غلظت های متفاوت بر روی رده سلولی لنفوما U937 در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (شکل شماره ۵). نتایج نشان داد که سیس

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 گسترده ای آن ها در شاخه های بیومدیkal و بیومهندسی حائز اهمیت است.

خ صوصیات فیزیکی شیمیایی نانوذرات سنتز شده: جهت بررسی سایز و مرفولوژی 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 مقدار 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 60.0k نشان می دهد. نتایج نشان داد که

جدول ۲- مشخصات فیزیکی شیمیایی نانو پارتهیکل های PCL-PEG-PCL حاوی سیس پلاتین

| پلیمر | نسبت PEG به CL | نسبت دارو به پلیمر | بهره انکپسولاسیون |
|-------------|----------------|--------------------|-------------------|
| PCL-PEG-PCL | ۱۰۰:۴۰ | ۵:۱۰۰ | ٪ ۹۸/۰۷ |



| C | IC50(µg/ml) | | P value |
|---------------------|----------------|--------------------------|---------|
| | Free Cisplatin | Cisplatin Loaded PCL-PEG | |
| Incubation time(hr) | | | |
| 24 | 119.70 ± 4.46 | 29.67 ± 1.99 | 0.001 |
| 48 | 17.35 ± 1.48 | 11.24 ± 0.82 | 0.002 |
| 72 | 13.58 ± 1.59 | 7.10 ± 1.37 | 0.005 |

شکل ۵- مقایسه سمیت سیس پلاتین آزاد و نانوذره حاوی داروبر 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 گسترده‌ای به منظور نانو انکپسولاسیون انواع داروها استفاده شده است. در مطالعه ای که توسط Feng و همکاران انجام شد، کوپلیمرهای مختلفی توسط کاپرولاکتون و PEG4000 و PEG6000 تهیه شدند و برای نانو انکپسولاسیون و انتقال داروی کورکومین مورد استفاده قرار گرفته شد. نانوذرات سنتز شده به واسطه روش امولسیون-تبخیر تهیه گردید و سایز آن‌ها در حدود ۶۶ nm گزارش شده است (۱۵). در این پروژه همانطور که توضیح داده شد از روش امولسیون دو تایی W/O/W برای تهیه نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده به واسطه کوپلیمرهای (PCL-PEG) در بارگذاری و انتقال داروی سیس پلاتین استفاده گردید. اندازه این نانوذرات در حدود ۱۳۰ nm و میزان لود دارو به میزان بالایی به دست آمد (حدود ۹۸/۰۷٪) (جدول ۲).

علاوه بر این نانوذره تهیه شده، یک ذره‌ی سوپر پارامغناطیس بوده که با اعمال میدان مغناطیسی، خاصیت مغناطیسی 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 ریشی 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 سمیتی از خود نشان نمی‌دهند. همچنین درصد بقاء و زنده ماندن سلول در مورد ذرات حاوی داروی ضد سرطان وابسته به زمان است، یعنی با گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با نانوذرات، این نانوذرات همچنان بسته به میزان داروی بارگذاری شده اثر کشندگی خود را حفظ می‌کنند. در حالی که در مورد داروی سیس پلاتین آزاد در همان ساعت‌های اولیه (حداکثر تا ۲۴ ساعت)، اثر کشندگی مشاهده می‌شود پس از این مدت به دلیل حذف دارو، نیاز به

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

بحث

سیس پلاتین 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 سمیت 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 سیس پلاتین 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 رتیکیولوندوتلیال 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

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

References

1. 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.
2. Cox TR. The matrix in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2021;21(4):217-38.
3. Vargason AM, Anselmo AC, Mitragotri S. The evolution of commercial drug delivery technologies. *Nat Biomed Eng*. 2021;5(9):951-67.
4. 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.
5. Fathallah AH, Akbar HS, Al-Deen FMN. Preparation and Characterization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (Fe₃O₄) for Biological Applications. *Tikrit J Pure Sci*. 2021;26(1):76-84.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Birnbaum DT, Brannon-Peppas L. Microparticle drug delivery systems. *Drug delivery systems in cancer therapy*: Springer; 2004. p. 117-35.
10. 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.
11. Thi Hong Anh Nguyen¹ and Van Cuong Nguyen² Formation of nanoparticles in aqueous solution from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -

استفاده‌ی مجدد از سیس پلاتین وجود دارد، که در سطح بالینی در هر مرحله عوارض جانبی زیادی از خود برجای می‌گذارند و این مطلوب نیست. با توجه به مقادیر P-value بدست آمده کمتر از ۰/۰۵ برای IC50 ها در دو حالت داروی سیس پلاتین آزاد و داروی نانوکپسوله شده در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت می‌توان نتیجه گرفت میزان کشندگی دارو در دو گروه اختلاف معنی داری دارند. همچنین از آنجائیکه داروی سیس پلاتین جهت تاثیر سایتوتوکسیک نیاز به عبور از غشای 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 ساختار هسته پوسته (Core Shell) دارند و PCL 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 سیس پلاتین 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 سیس پلاتین در حالت نانوکپسول می‌تواند باشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه نانو کپولیمیر PCL-PEG-PCL با ترکیب ساختمانی جدید و با بهره‌انکپسولاسیون مطلوب داروی سیس پلاتین تهیه گردید که به جهت حضور Fe₂O₃ خاصیت مغناطیسی پذیری از خود نشان می‌دهد. مطالعات in-vitro اثر کشندگی مطلوب و بلند مدت را برای داروی انکپسوله در مقایسه با داروی آزاد سیس پلاتین 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 نرمال 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, Hodiola-Dilke K. Nanoparticle-mediated gene delivery to tumour neovasculature. *Trends Mol Med.* 2003;9(1):2-4.