

ساخت و ارزیابی نانولیپوزوم حاوی اپی گالوکاتچین گالات: مطالعه‌های آزمایشگاهی / محاسباتی

محمد توحیدلو[§]، صنم صادقی محمدی[§]، محمد قربانی، زهرا واعظی، علیرضا فراست، مجید تقدیر، حسین نادری منش*

- 1- کارشناسی ارشد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 - 2- دکتری، دپارتمان پژوهشی توسعه فناوری درمان‌های نوین، مرکز تحقیقات سرطان پستان، پژوهشکده سرطان معتمد، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
 - 3- دکتری، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 - 4- استادیار، گروه مواد زیست فعال، دانشکده علوم و فناوری‌های بین‌رشته‌ای، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 - 5- دکتری، پژوهشکده آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی، ابن سینا، تهران، ایران
 - 6- استادیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 - 7- استاد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی: 14115-154، تهران، ایران
- [§] محمد توحیدلو و صنم صادقی محمدی سهم یکسانی به‌عنوان نویسنده اول دارند

* نویسنده مسئول: naderman@modares.ac.ir

پذیرش: 1402/12/28

دریافت: 1402/3/21

چکیده

ماتریکس متالوپروتئینازها یک خانواده اندوپتیداز روی هستند که منجر به افزایش رفتار متاستازی تومورهای بدخیم انسانی می‌شوند. اپی گالوکاتچین گالات (EGCG) جزء اصلی پلی‌فنول‌های چای سبز و مهارکننده ماتریکس متالوپروتئینازها در درمان سرطان استفاده می‌شود. این مطالعه با هدف افزایش پایداری، بهینه‌سازی بارگذاری و رهایش EGCG در سیستم تحویل لیپوزومی به‌صورت آزمایشگاهی و محاسباتی انجام شد. در این مطالعه نانولیپوزوم‌ها با روش بارگذاری غیرفعال و آب‌پوشانی لایه نازک تهیه و سپس اندازه، پتانسیل زتا، پایداری، میزان بارگذاری و منحنی رهایش دارو از نانولیپوزوم‌ها بررسی شد. سمیت سلولی نانولیپوزوم‌ها بر سه رده سلولی سرطان پستان با استفاده از آزمون زنده‌مانی بررسی شد. مطالعه‌های محاسباتی با هدف بررسی فعل و انفعالات EGCG- نانولیپوزوم و همچنین اثر آن بر ساختار نانولیپوزوم از راه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی دانه‌درشت ارزیابی شد. میانگین قطر نانولیپوزوم‌ها $73/6 \pm 6/9$ نانومتر، بار سطحی آنها $-14/6$ میلی‌ولت و میزان بارگذاری دارو $78/5 \pm 7/3$ درصد به دست آمد. بارگذاری EGCG درون نانولیپوزوم باعث رهایش پیوسته و کامل دارو پس از 72 ساعت شد و همچنین منجر به افزایش قدرت اثر و فعالیت دارو شد. نتایج مطالعه‌های محاسباتی نشان از قرارگیری دارو در نزدیک سطح لیپوزوم است. نتایج انرژی و تابع توزیع شعاعی نشان از پایداری لیپوزوم حاوی دارو است. همچنین اکثریت دارو در فاز لیپیدی به‌وسیله

نانولیپوزوم احاطه شده که خود گویای درصد بالایی بارگذاری دارو در نانولیپوزوم و تأیید کارایی روش سنتز توسعه یافته است. براساس یافته های حاضر استفاده از حامل لیپوزومی برای حمل و رهایش EGCG راهکار مناسب برای افزایش کارایی دارو است.

واژه های کلیدی: اپی گالوکاتچین گالات، لیپوزوم، سرطان پستان، شبیه سازی دینامیک مولکولی، میدان نیرو دانه درشت مارتینی.

1- مقدمه

سرطان پستان عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در بین زنان است و به گفته سازمان بهداشت جهانی، سرطان پستان در سال 2021 شایع ترین سرطان در سطح جهان است و 12 درصد از کل موارد جدید سالیانه سرطان در سراسر جهان را تشکیل می دهد. سرطان پستان می تواند به صورت غیرتهاجمی یا تهاجمی باشد. سرطان های غیرتهاجمی قابل درمان هستند ولی 80 درصد از کل سرطان های پستان تهاجمی هستند که این یک نگرانی بزرگ و مسئله مهم در حوزه سلامت است [1-4].

بسیاری از مطالعه های انجام شده در طول سال ها ثابت کرده اند که ماتریکس متالوپروتئینازها¹، خانواده ای از اندوپپتیدازهای وابسته به فلز روی بوده و مؤثر در گسترش سرطان ها از راه تجزیه ماتریکس خارج سلولی در طی بازسازی بافت می باشند که در بین آنها MMP-2 و MMP-9 در بافت های سرطانی بیان بالایی دارند و این مسئله دلیلی بر نقش آنها در بروز حالت تهاجمی و متاستازی است. این یافته ها ماتریکس متالوپروتئینازها را به عنوان یک هدف مناسب برای درمان سرطان معرفی کرده و مهار فعالیت آنها می تواند از رشد و انتشار تومور جلوگیری کند [5؛ 6].

اپی گالوکاتچین گالات² یک ترکیب گیاهی پلی فنولی با ویژگی های ضدسرطانی است که به واسطه منشأ زیستی

آن بسیار به آن توجه است. این دارو به دلیل توانایی القای آپوپتوز و مهار تومورزایی از مسیرهای مختلف سلولی نظیر Wnt- β -catenin، مهار متیلاسیون و مهار ماتریکس متالوپروتئینازها به ویژه MMP-2 و MMP-9 آثار ضدسرطانی خود را اعمال می کند [7]. همچنین اپی گالوکاتچین گالات ویژگی های ضدگرزایی با مهار فاکتورهای رشد اندوتلیایی در سرطان پستان دارد [8؛ 9]. مولکول EGCG سه حلقه آروماتیک دارد که از راه حلقه پیرنی به یکدیگر متصل شده اند و ویژگی های زیستی این ترکیب ارتباط ویژه ای با ساختار شیمیایی آن دارد، برای مثال ویژگی های آنتی اکسیدان آن به انتقال هیدروژن و الکترون بین گروه های هیدروکسیل حلقه های B و D ارتباط دارد. حلقه های موجود در این دارو در نقش های زیستی این دارو نظیر مهار پروتوزوم، پروتئین های شوک حرارتی و ویژگی های ضدباکتری آن مؤثر است (شکل 1) [10؛ 11]. ازجمله محدودیت های استفاده از EGCG می توان به نیمه عمر کوتاه، حساسیت بالا به نور، گرما و pH محیط، نفوذپذیری کم غشایی و جذب سلولی اندک اشاره داشت که سبب ناکارآمدی این دارو می شود. علاوه بر این در زمان تجویز خوراکی این دارو حضور چندین گروه فنولی باعث می شود که مولکول در معرض واکنش های متابولیکی مختلفی ازجمله سولفونیداسیون³، گلوکوروئیداسیون⁴ و

3 Sulfonation
4 Glucuronidation

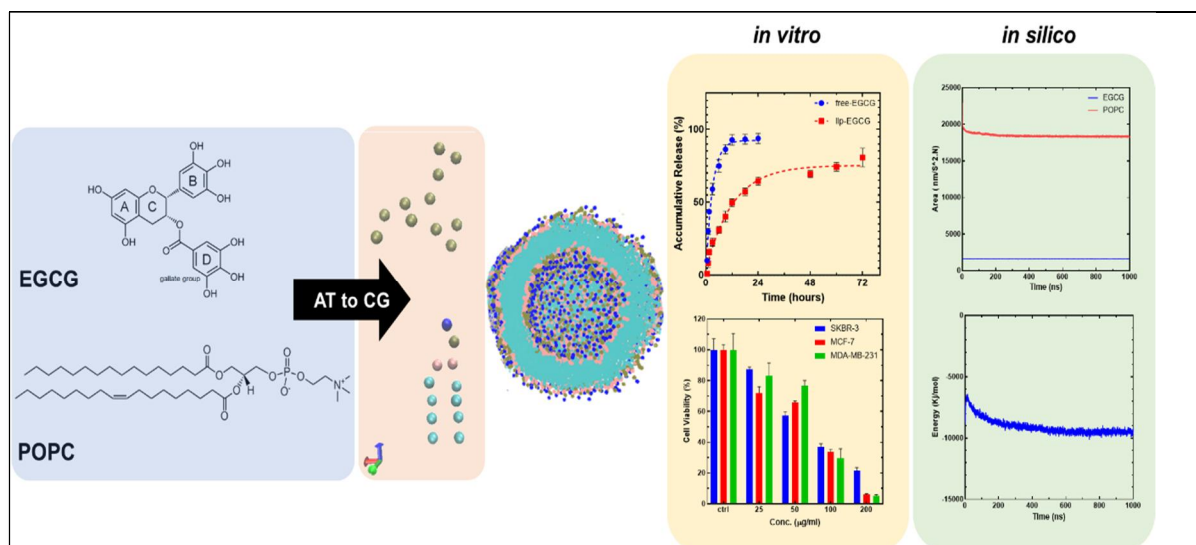
1 Matrix Metalloproteinases (MMPs)
2 Epigallocatechin Gallate (EGCG)

متیلاسیون¹ قرار بگیرد و پروفایل فارماکوکینتیک ناکافی داشته باشد [12]. از این رو، پژوهشگران در تلاشند تا روش‌های جدیدی را برای افزایش پایداری و زیست‌فراهمی EGCG ارائه کنند [13].

یکی از مسائل مهم در حوزه درمان طراحی سیستم انتقال دارویی مناسب و ساده است. داروها به واسطه ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی متنوع روش‌های انتقال دارویی متفاوتی را می‌طلبند. نانولیپوزوم‌ها ساختارهای خود تشکیل‌شونده‌ای هستند که در آنها مولکول‌های فسفولیپید در محیط آبی به گونه‌ای در کنار هم قرار می‌گیرند که یک غشای کروی دولایه را تشکیل می‌دهند. این نحوه جهت‌گیری، امکان بارگیری داروهای آب‌دوست در هسته و داروهای آب‌گریز در پوسته نانولیپوزوم‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد. در شرایط فیزیولوژیکی، EGCG آب‌گریز و ناپایدار بوده و نیازمند نانوحامل برای بهبود حلالیت و افزایش پایداری است. لیپوزوم‌ها به واسطه وجود بخش‌های آب‌گریز توانایی فرمولاسیون داروهای آب‌گریز را داشته و رهایش مناسب دارو در فضای مناسب و انتقال به داخل سلول را فراهم می‌کند. در حوزه پزشکی، لیپوزوم‌ها به واسطه سیتوتیک دارویی و توزیع دارویی مناسب و کاهش سمیت دارو با هدفمند کردن رهایش دارو در بافت هدف بسیار مورد توجه است [14؛ 15]. بارگذاری EGCG در نانولیپوزوم‌ها می‌تواند این مولکول را از تخریب حفظ کند. به این ترتیب غلظت و جذب آن در محل مورد نظر افزایش پیدا می‌کند. بهینه‌سازی بارگذاری EGCG در نانولیپوزوم و افزایش درصد بارگذاری به منظور بهینه‌سازی تحویل دارو یک اصل بسیار مهم است.

در این مطالعه به بررسی اثر فرمولاسیون دارو اپی‌گالوکاتچین‌گالات از راه سیستم حامل لیپوزومی در

درمان سرطان پستان پرداخته می‌شود. علاوه بر این سازوکار فرمولاسیون دارو اپی‌گالوکاتچین‌گالات با استفاده از نانولیپوزوم در سطح مولکولی با بهره‌گیری از روش‌های محاسباتی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مطالعه می‌شود. بنابراین در شیوه‌نامه محاسباتی و تجربی به مطالعه توانایی نانولیپوزوم برای به دام انداختن EGCG پرداخته شد. هدف نهایی ما در این مطالعه یافتن شرایط بهینه برای به دست آوردن حداکثر درصد بارگذاری و بهترین شرایط حامل لیپوزومی برای EGCG است (شکل 1).



شکل 1 خلاصه گرافیکی و تصویر ترسیمی مطالعه‌های محاسباتی و آزمایشگاهی

که هرکدام از این گروه‌ها اعضایی دارند که معادل مدل‌های اتمی خاص هستند [16].

در این مطالعه برای انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی از برنامه گرومکس مدل 2019 و ثابت نیروی مارتینی استفاده شد [18:17]. نخست جعبه‌ای مکعبی شکل به ابعاد $90 \times 90 \times 90$ نانومتر ساخته شد. فسفولیپید و دارو با نسبت 1:10 به تعداد نهایی 3000 مولکول فسفولیپید POPC و 300 مولکول EGCG در داخل جعبه به صورت تصادفی قرار داده شد. در ادامه نیز به مقدار کافی مولکول‌های آب به سیستم اضافه شد. در مرحله بهینه‌سازی شبیه‌سازی از روش الگوریتم تندترین کاهش² استفاده شد [18]. برای تعادل‌سازی دما و فشار به ترتیب از روش ترموستات و بارس‌تات برندنسن برای تعادل‌سازی سیستم در دما و فشار 300 درجه کلوین و فشار 1 اتمسفر استفاده شد [21-19].

2- مواد و روش‌ها

1-2 دریافت داده‌های ساختاری و شبیه‌سازی دینامیک

مولکولی و تجزیه و تحلیل آن

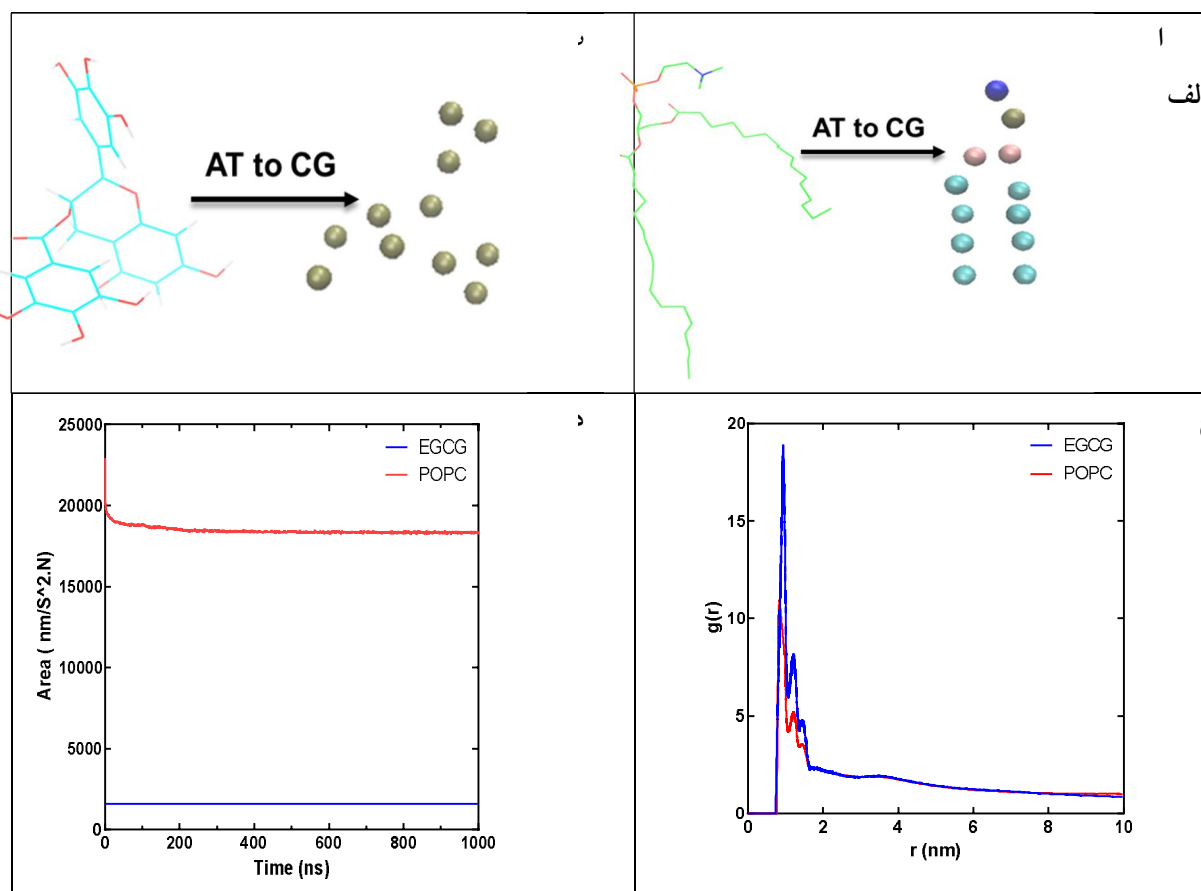
برای مطالعه سیستم‌های بیولوژی پیچیده با تعداد مولکول‌های بالا روش‌های نوین نظیر شبیه‌سازی دانه درشت استفاده می‌شود. از راه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی دانه درشت، داروی اپی‌گالوکاتچین گالات (EGCG) و فسفولیپید فسفاتیدیل کولین¹ (POPC) نحوه فرمولاسیون دارو و موقعیت قرارگیری دارو در لیپوزوم‌های شکل گرفته بررسی شد. ساختار اولیه دانه درشت (شکل‌های 2 الف و ب)، پارامترها و ثابت‌های نیرو مربوط به POPC و EGCG از تارنمای مارتینی به دست آمد. در سیستم ثابت نیرو مارتینی به ازای هر چهار اتم یک دانه در نظر گرفته می‌شود و به طور کلی چهار نوع دانه قطبی، ناقطبی، غیرقطبی و باردار تعریف شده است.

2 Steepest Descent

1 Palmitoyl-2-Oleoyl-Glycero-3-Phosphocholine (POPC)

در این سیستم از شرایط مرزی در تمامی جهت‌ها استفاده شد. از روش ¹PME¹ برای محاسبه اندرکنش‌ها بلند استفاده شد [21]. اندرکنش‌های واندروالسی و الکتروستاتیک در محدوده $1/2$ نانومتر محاسبه شد. فاصله زمانی برای هر گام 30 فمتوثانیه و ساختارها هر 300 پیکوثانیه ذخیره شد. شبیه‌سازی‌ها در مرحله تعادل‌سازی به مدت 50 نانوثانیه انجام شد. تمامی شبیه‌سازی‌ها به مدت 1 میکروثانیه انجام شد. تجزیه و تحلیل شبیه‌سازی با استفاده از ابزارهای تحلیل گرومکس و نرم‌افزار ²VMD² انجام شد و تمامی تصاویر به وسیله برنامه پایمول³ تهیه شد [22].

1 Particle- Mesh Ewald (PME)
2 Visual Molecular Dynamics (VMD)
3 PyMol



شکل 2 ساختار دانه درشت

الف - لیپید فسفاتیدیل کولین (POPC)؛ ب - اپی گالوکاتجین گالات (EGCG)؛ ج) نمودار تابع توزیع شعاعی POPC و EGCG؛ د) سطح در دسترس POPC و EGCG در طی شبیه سازی دینامیک مولکولی

2-2 مواد و روش های تجربی

2-2-1 مواد

فسفولیپید POPC از شرکت آوانتی پلارلیپید¹، EGCG (خلوص 95 درصد) و نمک MTT از شرکت سیگما، محیط کشت DMEM² از شرکت گیکو³، متانول و کلروفرم از شرکت مرک و سلول های رده MCF-7 SKBR-3 و MDA-MB-231 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

2-2-2 تهیه نانولیپوزوم ها

نسبت وزنی EGCG 10:1 به فسفولیپید POPC در 1 میلی لیتر محلول کلروفرم: متانول (نسبت 1:1) حل شد و حلال های آلی با استفاده از دستگاه تبخیر خلأ (هیدلف آلمان) و در دمایی بالاتر از دمای گذار لیپیدها به مدت 1 ساعت حذف شد. پس از تشکیل لایه نازک لیپیدی حاوی EGCG با استفاده از محلول بافر فسفات (PBS) آب پوشانی شد. نانولیپوزوم های چند لایه ایجاد شده با استفاده از روش ذوب و انجماد مکرر به نانولیپوزوم های تک لایه تبدیل شد و در نهایت برای سنتز لیپوزوم های با

1 Avanti Polar Lipids

2 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

3 Gibco

2-2-5 بررسی رهایش دارو از نانولیپوزوم‌ها

به منظور بررسی الگوی رهایش EGCG از نانولیپوزوم، 1 میلی‌لیتر نانولیپوزوم‌های سنتزی بعد از جداسازی داروهای آزاد در کیسه دیالیز 6-8 کیلو دالتونی ریخته و در 100 میلی‌لیتر بافر فسفات در دمای 37 درجه سانتی‌گراد بر هم‌زن مغناطیسی 150 دور در دقیقه غوطه‌ور شد. سپس میزان داروی ره‌اشده و درصد رهایش دارو در بازه‌های زمانی مشخص به روش طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش و در طول موج بیشینه جذب EGCG با استفاده از معادله‌های 2 و 3 تعیین و منحنی رهایش با استفاده از نرم‌فزار گراف‌پد پرسم² رسم شد.

قطر اندازه موردنظر از روش اکستروود با غشاهای پلی‌کربناتی 100 نانومتری بهره گرفته شد.

2-2-3 مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی و ریخت‌شناسی

نانولیپوزوم‌ها

توزیع اندازه (میانگین قطر و شاخص پراکندگی) و پتانسیل زتا به وسیله پراکندگی نور پویا با استفاده از دستگاه زتاسایزر¹ اندازه‌گیری شد. سوسپانسیون لیپوزومی به نسبت 1:10 با بافر فسفات 0/1 میلی‌مولار رقیق شد. اندازه‌گیری‌ها در 25 درجه سانتی‌گراد با زاویه ثابت 173 درجه انجام شد. اندازه‌گیری اندازه متوسط قطر نانولیپوزوم‌ها مبتنی بر شدت بوده و شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا به طور مستقیم به وسیله نرم‌افزار دستگاه محاسبه شد.

2-2-4 بررسی کارایی بارگذاری دارو در نانولیپوزوم‌ها

به منظور تعیین کارایی بارگذاری، منحنی استاندارد برای EGCG (بیشینه جذب 276 نانومتر در محلول آبی متانول با نسبت مساوی 1:1 متانول و آب) در غلظت‌های مشخص 3، 6، 12/5، 25، 50 و 100 میکروگرم/میلی‌لیتر با طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش ترسیم شد و سپس EGCG محصورنشده و آزاد با استفاده از کیسه دیالیز 6-8 کیلودالتونی بر محلول بافر فسفات (PBS, pH=7.4) به مدت 12 ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد جداسازی شد. حجم مشخصی از لیپوزوم حاوی دارو در حلال آلی متانول حل و به مدت 15-10 ثانیه ورتکس شد و سپس غلظت EGCG به وسیله طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش برای محاسبه بازده بارگذاری لیپوزوم‌های EGCG تعیین شد. بازده بارگذاری براساس با معادله 1 محاسبه شد.

معادله 1:

$$\text{مقدار داروی محصورشده} \times 100 = \frac{\text{مقدار داروی محصورشده}}{\text{مقدار کل داروی استفاده شده}} \times 100$$

معادله 2:

$$\text{غلظت داروی رهاشده (میلی گرم / میلی لیتر)} \times \text{فاکتور رقت} \times \text{حجم محلول (میلی لیتر)} = \text{مقدار داروی رهاشده (میلی گرم)}$$

معادله 3:

$$\text{مقدار داروی رها شده} \times 100 = \frac{\text{مقدار داروی رها شده}}{\text{مقدار داروی بارگذاری شده}} \times 100$$

میکرولیتر محیط کامل DMEM کشت داده شدند. پس از 24 ساعت محیط رویی سلول‌ها برداشته و غلظت‌های مختلف از فرمولاسیون نانولیپوزوم و داروی آزاد جایگزین شد. سپس به مدت 72 ساعت تیمار و انکوبه شدند. برای بررسی اثر سمیت سلولی داروی آزاد نخست محلول دارویی EGCG با استفاده از حلال آلی DMSO تهیه شد. سپس رقت‌های دارویی تهیه و محلول استوک دارویی در محیط کشت سلولی رقیق شد تا غلظت نهایی موردنظر برای سنجش به دست آید. حفظ غلظت نهایی حلال (DMSO) در سطحی که سلول‌ها را تحت تأثیر قرار ندهد (کمتر از 0/1 درصد) مهم است و در انجام آزمون MTT کنترل برای حلال آلی انتخاب شد. بعد از سپری شدن مدت زمان موردنظر محلول رویی با 100 میکرولیتر محلول نمک تترازولیوم 0/5 میلی گرم / میلی لیتر جایگزین و پس از چهار ساعت انکوباسیون کریستال‌های ارغوانی رنگ فورمازان تشکیل شده در سلول‌های زنده در 100 میکرولیتر DMSO حل و جذب در طول موج 570 نانومتر اندازه‌گیری شد و میزان نیمه حداکثر غلظت

2-2-6- بررسی برون‌تنی پایداری نانولیپوزوم‌ها

پایداری نانولیپوزوم‌های سنتزی در بافر فسفات در pH=7.4 و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت چهار هفته بررسی شد. به این منظور بعد از سپری شدن بازه زمانی موردنظر اندازه نانولیپوزوم‌ها با استفاده از دستگاه زتاسایزر ارزیابی شد.

2-2-7- بررسی سمیت سلولی نانولیپوزوم‌ها

رده‌های سلولی MDA-MB-231، SKBR-3، MCF-7 و از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط DMEM با 10 درصد سرم جنین گاوی FBS¹، 1 درصد پنی‌سیلین - استرپتومایسین در انکوباتور سلولی با شرایط 5 درصد گاز دی‌اکسیدکربن و دمای 37 درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. زمانی که تراکم سلول‌ها به 80 تا 90 درصد رسید، با استفاده از آنزیم تریپسین / EDTA² از سطح جداسازی و بازکشت داده شدند. سلول‌ها با تراکم 5000 سلول در هر چاهک پلیت 96 خانه در 100

1 Fetal Bovine Serum (FBS)

2 Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)

بازدارندگی دارو یا IC_{50}^1 با استفاده از نرم افزار گراف پد پریسم محاسبه شد. تمامی آزمایش های زنده ماننی با سه تکرار برای هر رده سلولی انجام شد.

2-2-8 بررسی های آماری

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار گراف پد پریسم انجام شد. برای تعیین معنادار بودن یا نبودن تفاوت میان گروه های مختلف از روش (آزمون تی - استیودنت و آنالیز واریانس²) استفاده شد. میزان معناداری با مقدار احتمال (p-Value) کمتر از 0/05 در نظر گرفته شد. میزان $p < 0.05$ با یک ستاره یا مربع، $0.01 < p < 0.05$ با دو ستاره یا مربع و $p < 0.01$ با سه ستاره یا مربع مشخص شده است. برای آزمون سمیت (MTT) رگرسیون غیرخطی برای نتایج حاصل از تیمارهای دارویی با استفاده از نرم افزار گراف پد پریسم ترسیم شد.

3- نتایج و بحث

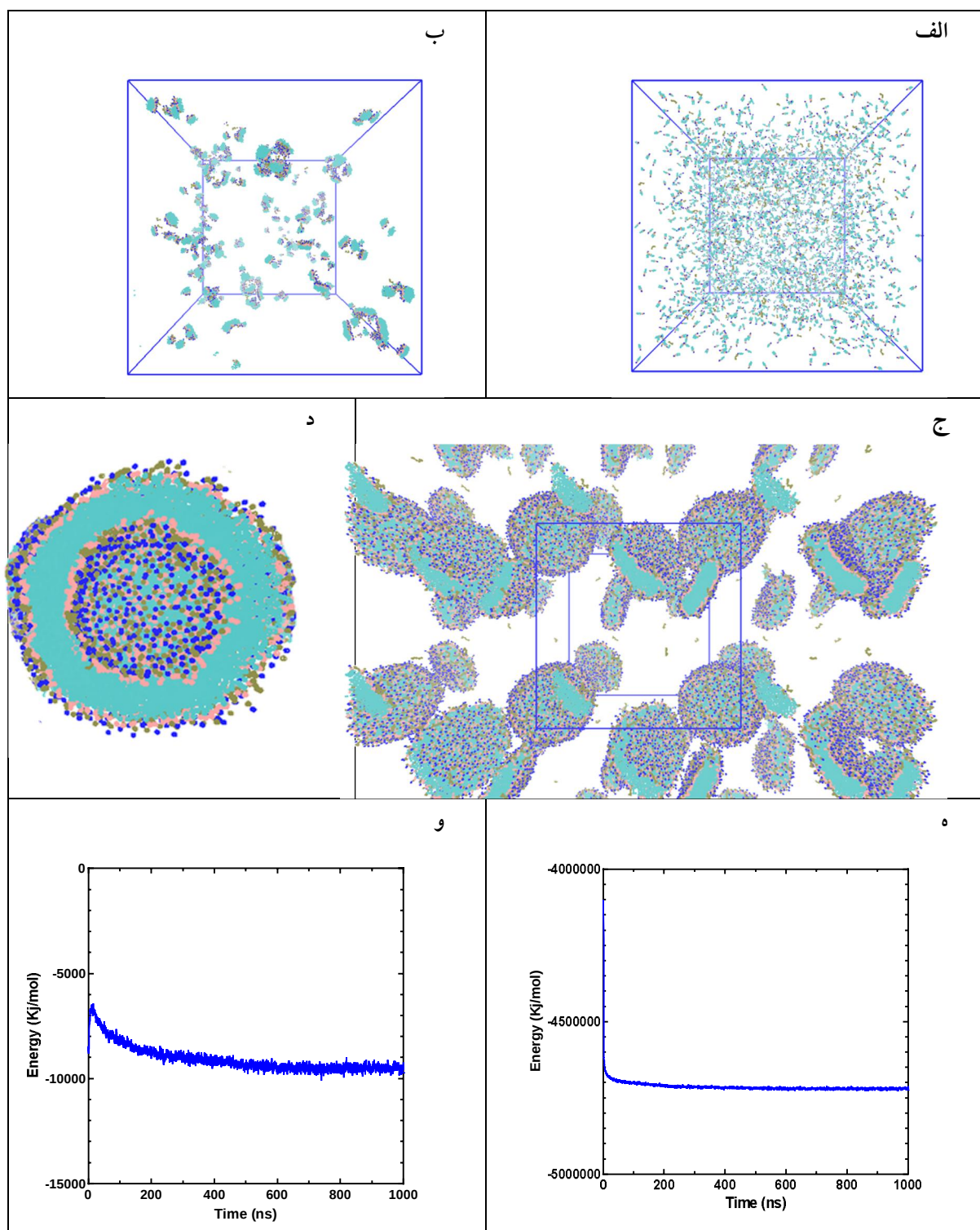
3-1 نتایج بخش محاسباتی

برای بررسی نحوه توزیع دارو در زمان شکل گیری لیپوزوم تابع توزیع شعاعی برای دارو و لیپید محاسبه شد. الگوی هر دو تابع توزیع شعاعی لیپید و دارو مشابه است با این تفاوت که دارو در بخش های مرزی توزیع فراوان تری دارد و پیک بلندتری برای دارو در بخش ابتدایی نمودار مشاهده شد (شکل 2 ج). مراحل شکل گیری لیپوزوم و قرارگیری دارو داخل لیپوزوم در شکل 3 الف د نشان داده شده است. در مراحل آغازین شبیه سازی یک مجموعه تجمعات از بخش های هیدروفوب لیپیدها به همراه تعدادی از مولکول های EGCG قابل مشاهده است. درواقع EGCG به واسطه

ویژگی های هیدروفوبی در این تجمعات قرار می گیرد. در مراحل انتهایی شبیه سازی که ساختارهای لیپوزومی شکل گرفته است، تعداد اندکی مولکول EGCG در فضای آبی مشاهده می شود و بیشتر در درون لیپوزوم قرار گرفته است. شکل 3 د تصویری از مقطع عرضی لیپوزوم به همراه EGCG (رنگ نارنجی) موجود در بخش های هیدروفوب لیپوزوم را نشان می دهد. همان طور که مشاهده می کنید دارو EGCG در قسمت های نزدیک به سرفسفولیپیدی قرار گرفته است و البته برخی از قسمت های مولکول مشابه کلسترول در دسترس حلال است [23-24].

1 Half-maximal inhibitory concentration (IC50)

2 ANOVA



شکل 3 مراحل شکل گیری نانولیپوزوم و قرارگیری اپی گالوکاتجین گالات در داخل لیپوزوم

الف - توزیع لیپید و دارو در آغاز شبیه سازی؛ ب - 300 نانوثانیه بعد از شبیه سازی دینامیک مولکولی؛ ج - لیپوزوم های شکل گرفته در انتهای شبیه سازی؛ د - مقطع عرضی لیپوزوم دارو (نارنجی رنگ) روی بخش سطحی لیپیدی به صورت عمود بر لایه لیپید قرار گرفته است؛ ه - انرژی میان کش های واندروالس مربوط به لیپوزوم در طی شبیه سازی؛ و - نمودار مربوط به انرژی میان کش های الکتروستاتیک در زمان شبیه سازی

نانولیپوزوم‌ها است، انتخاب سیستم‌های دارورسانی و نانوحامل‌های با میانگین اندازه 100 نانومتری یک انتخاب مؤثر برای فرار از سیستم رتیکولاندوتلیال¹ (RES) ماست [26]. همچنین به‌طور کامل منطقی است که با افزودن دارو به ساختار نانولیپوزوم اندازه و به‌دنبال آن فضای موجود برای بارگیری دارو افزایش پیدا کند [27]. کارایی بارگذاری براساس نسبت غلظت EGCG بارگذاری‌شده در لیپوزوم به غلظت اولیه دارو اندازه‌گیری شد. غلظت EGCG بارگذاری‌شده با استفاده از منحنی استاندارد (شکل‌های 4 الف و ب) تهیه‌شده برای محلول‌های دارویی با گرادیان غلظت به دست آمد.

در فرآیند شکل‌گیری نانولیپوزوم‌ها و ساختارهای غشایی، تجمع بخش‌های هیدروفوب منجر به کاهش سطح در دسترس حلال می‌شود، که این موضوع به کاهش پارامتر سطح در دسترس منجر می‌گردد. کاهش سطح در دسترس برای لیپوزوم در شکل 2 د مشاهده شد، اما در مورد EGCG تغییرات زیادی در سطح در دسترس وجود نداشت. کاهش سطح در دسترس لیپید زمان شکل‌گیری لیپوزوم در واقع معرفی از شکل‌گیری لیپوزوم در طی شبیه‌سازی است. از سوی دیگر عدم کاهش سطح در دسترس EGCG نشان از قرارگیری خاص دارو در غشای لیپیدی است. در واقع این دارو به‌صورت موازی با سطح غشای لیپیدی در لیپوزوم قرارگرفته است که در تصویر مقطع عرض لیپوزوم شکل گرفته نیز دیده می‌شود. بسیاری از داروهای هیدروفوب مانند کورکومین نیز همانند EGCG چنین جهت‌گیری در غشا دارند [25]. به‌منظور بررسی پایداری لیپوزوم شکل گرفته، انرژی و اندروالس و الکتروستاتیک محاسبه شد. نتایج نشان‌دهنده نقش بیشتر انرژی و اندروالس در شکل‌گیری لیپوزوم نسبت به انرژی الکتروستاتیک است. همچنین پایداری آنها در انتهای شبیه‌سازی گواهی از پایداری لیپوزوم شکل گرفته است (شکل‌های 3 ج و د).

2-3 بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانولیپوزوم حامل دارو EGCG

توزیع اندازه و پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌های بارگذاری‌شده با EGCG با استفاده از روش DLS در جدول 1 نشان داده شده است. اندازه نانولیپوزوم‌های بارگذاری‌شده زیر 100 نانومتر و با شاخص پراکندگی نزدیک 0/1 بیانگر اندازه توزیع بسیار باریک و قابل اعتماد نانولیپوزوم‌ها است. اندازه و پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌های بارگذاری‌شده با دارو دو ویژگی مهم برای بررسی توزیع زیستی

1 Reticuloendothelial System (RES)

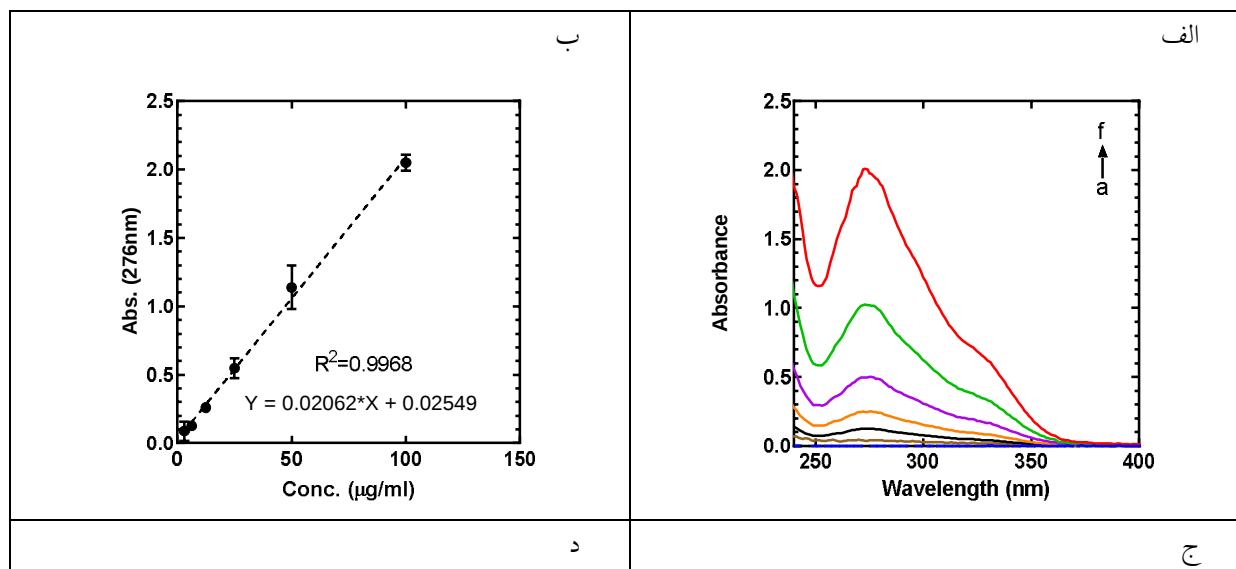
جدول 1 نتایج حاصل از دستگاه DLS

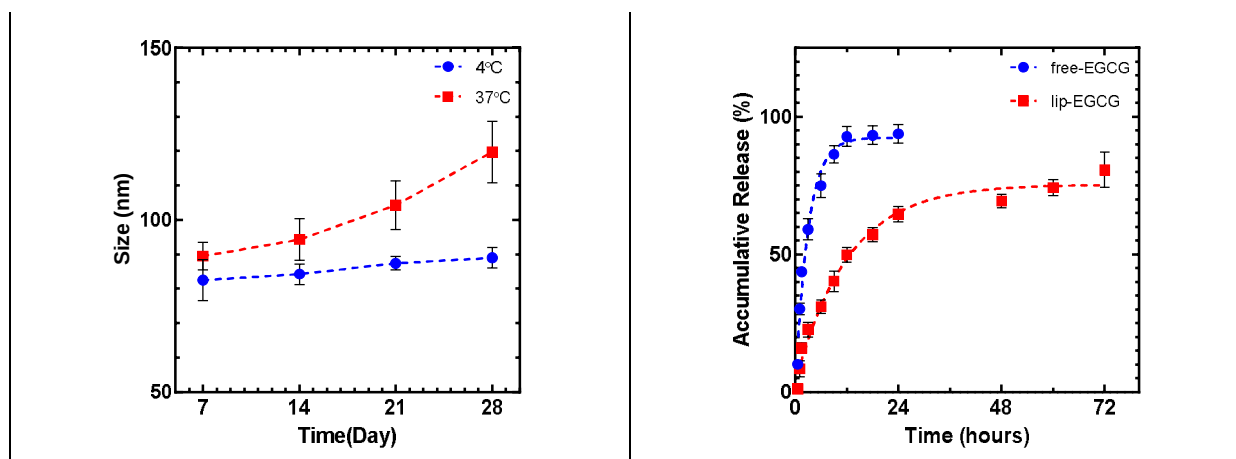
دارو	POPC: دارو (mg: mg)	میانگین اندازه (nm)	پتانسیل زتا (mV)	شاخص پراکندگی	کارایی بارگذاری (درصد)
بدون دارو	0:10	66/5±9/3	-7/7	0/142	-
EGCG	1:10	73/6±6/9	-14/6	0/119	78/5±7/3

3-3 بررسی رهائش دارو و پایداری نانولیپوزوم

روش دینامیک دیالیز یکی از رایج ترین روش ها برای تعیین سینتیک رهاسازی دارو از سیستم های دارورسانی مانند نانولیپوزوم ها در شرایط آزمایشگاهی است. رهائش تجمعی EGCG آزاد و EGCG بارگذاری شده در نانولیپوزوم به مدت 72 ساعت بررسی و منحنی رهائش در شکل 4 ج نمایش داده شد. رهائش EGCG آزاد با هدف مقایسه سینتیک رهائش دارو از نانولیپوزوم حاوی دارو و همچنین ارزیابی پتانسیل نانولیپوزوم برای تحویل دارو بررسی شد. سرعت انتشار EGCG بارگذاری شده در نانولیپوزوم به صورت معناداری کندتر از EGCG آزاد

شرایط مشابه (دمای 37°C و pH=7.4) است. به دلیل انسجام غشای نانولیپوزوم ها رهائش انفجاری داروی EGCG در ساعت های اولیه مشاهده نشد. انسجام نانولیپوزوم ها به درجه اشباع بودن فسفولیپید استفاده شده در ساختار آن بستگی دارد. در این مطالعه فراوان ترین فسفولیپید زیست سازگار POPC استفاده شد که به عنوان مدل فسفاتیدیل کولین طبیعی در یوکاریوت ها استفاده می شود. زنجیره اسیدهای چرب POPC حاوی یک پیوند دوگانه سیس منجر به سیال بودن غشا و سایر خواص فیزیکی لایه لیپیدی می شود.





شکل 4 الف - شدت جذب غلظت‌های مختلف EGCG (غلظت‌های استفاده شده a تا f: 3، 6، 12/5، 25، 50 و 100 میکروگرم/میلی‌لیتر)؛ ب - منحنی استاندارد EGCG؛ ج - منحنی ره‌ایش EGCG به صورت آزاد و نانولیپوزوم؛ د - پایداری نانولیپوزوم EGCG در دمای 4 و 37 درجه سانتی‌گراد

4-3- بررسی سمیت سلولی حامل لیپوزومی حاوی

دارو EGCG بر رده‌های سلولی سرطان پستان میزان سمیت نانولیپوزوم بدون دارو، EGCG آزاد و نانولیپوزوم حاوی دارو در غلظت‌های مختلف (25 تا 200 میکروگرم در میلی‌لیتر) براساس آزمون سمیت سلولی MTT بر سه رده سلولی سرطان پستان بررسی شد (شکل‌های 5 الف و ج) و مقادیر غلظت IC_{50} برای EGCG بارگذاری شده در نانولیپوزوم و EGCG آزاد با استفاده از برنامه گراف‌پد پریسم محاسبه شد (جدول 2). در این مطالعه، منظور از غلظت نانولیپوزوم حاوی دارو (25 تا 200 میکروگرم در میلی‌لیتر) غلظت EGCG بارگذاری شده در نانولیپوزوم است و وزن اجزای لیپیدی در تعیین غلظت، نقشی ندارد.

زمانی که از نانولیپوزوم‌ها به عنوان حامل دارو استفاده می‌شود، پایداری آنها در زمان بارگذاری دارو یا در شرایط درون‌تنی دو مورد مهم در طراحی و کاربرد لیپوزوم است. برای این منظور اندازه نانولیپوزوم‌های سنتزی در بازه‌های زمانی 7، 14، 21 و 28 روزه در دمای 4 و 37 درجه سانتی‌گراد در بافر فسفات $pH=7.4$ بررسی شدند. شکل 4 د نشانگر تغییرات اندازه نانولیپوزوم‌های سنتزی است. نانولیپوزوم‌های سنتزی ماندگاری بالایی در دمای 4 درجه سانتی‌گراد دارد ولی بعد از سپری شدن 28 روز اندازه نانولیپوزوم‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد افزایش نشان می‌دهد [28].

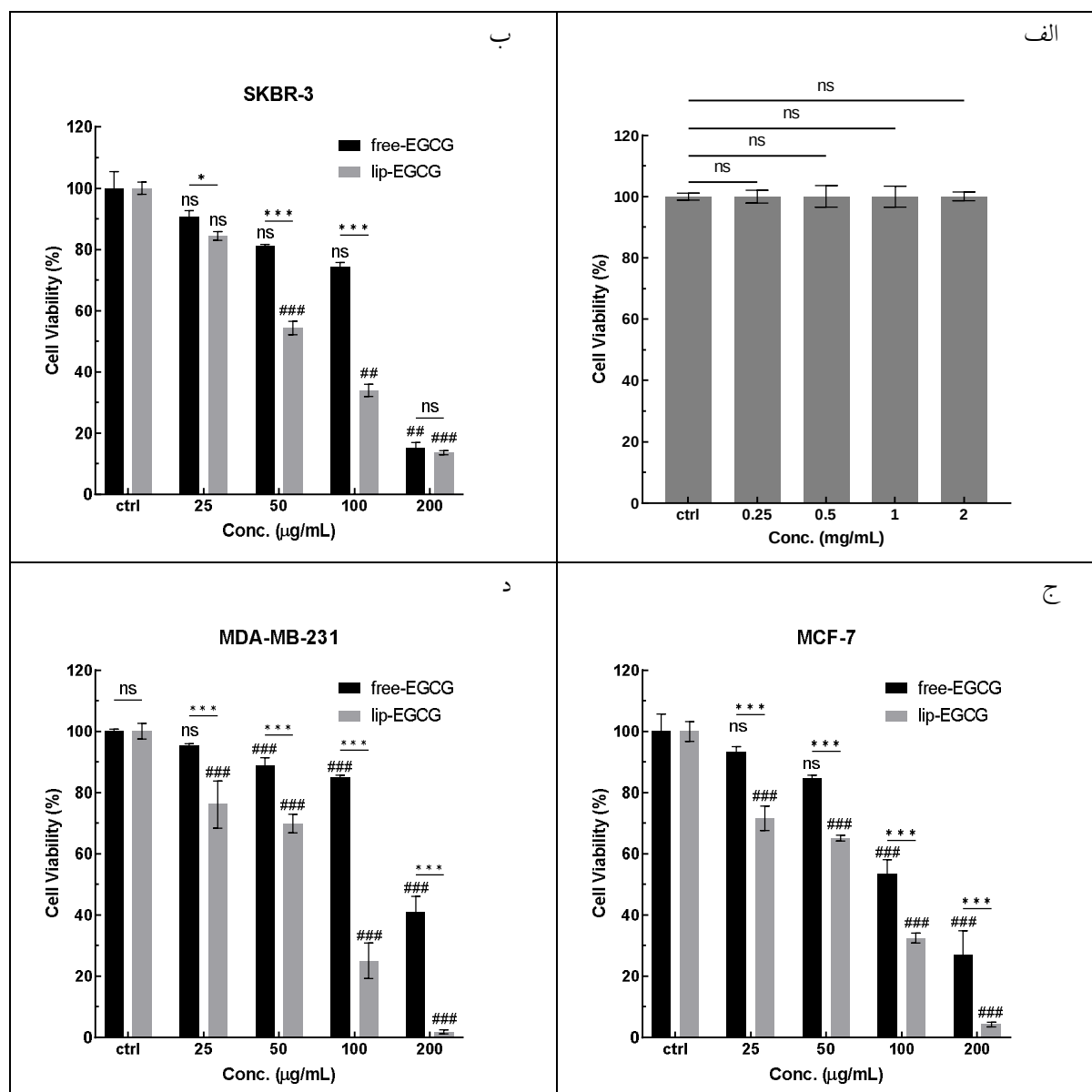
جدول 2 میزان سمیت EGCG آزاد و بارگذاری شده در نانولیپوزوم بر رده‌های سلولی مختلف

IC ₅₀ (µg/mL)			
MDA-MB-231	SKBR-3	MCF-7	EGCG آزاد
226/9	141/3	152	
67/8	54/8	57/8	EGCG نانولیپوزومه

پستان MDA-MB-231 و SKBR-3، MCF-7 کمتر می‌باشد (جدول 2). در نتیجه غلظت کمتری از EGCG نانولیپوزومه برای مهار 50 درصد رشد سلول‌های سرطان پستان مورد نیاز است و این نشان‌دهنده قدرت بالاتر EGCG نانولیپوزومه در مهار رشد سلول‌ها است.

بررسی غیرسمی بودن نانولیپوزوم بدون دارو در مقایسه با نانولیپوزوم حاوی دارو برای درک ایمنی سیستم تحویل دارو و برای اطمینان از ایمنی و اثربخشی حامل درمانی ضروری است [29]. در این مطالعه سمیت نانولیپوزوم‌های بدون دارو به عنوان معیاری از سمیت بالقوه خود حامل مستقل از دارویی که دارد در غلظت‌های (2-0/25 میلی گرم بر میلی لیتر) با استفاده از آزمون (MTT) بررسی شد و نمودار زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 بعد از تیمار 72 ساعت نشان داد (شکل 5 الف) که نانولیپوزوم خالی بدون عوارض جانبی بوده و به خودی خود غیرسمی است و زنده‌مانی مشاهده شده در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانولیپوزوم‌ها از نظر آماری (آنالیز واریانس¹) فاقد اختلاف معناداری با سلول‌های کنترل و بدون تیمار است. در ادامه برای بررسی مهار فعالیت متابولیک سه رده سلولی سرطان پستان MCF-7، SKBR-3 و MDA-MB-231 در اثر تیمار با غلظت‌های مختلف (25 تا 200 میکروگرم در میلی لیتر) EGCG آزاد و نانولیپوزوم حاوی دارو آزمون (MTT) انجام شد. نتایج بیانگر مهار رشد وابسته به غلظت داروی آزاد و نانولیپوزوم حاوی دارو پس از گذشت زمان 72 ساعت است (شکل‌های 5 ب و د). نیمه حداکثر غلظت بازدارندگی (IC₅₀) برای EGCG نانولیپوزومه در مقایسه با EGCG آزاد در هر سه رده سلولی سرطان

1 ANOVA



شکل 5 نمودار زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانولیپوزوم بدون دارو (0/25 تا 2 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بعد از 72 ساعت (الف)، نمودار زنده‌مانی سلول‌های SKBR-3 (ب)، MCF-7 (ج) و MDA-MB-231 (د) تیمار شده با نانولیپوزوم حاوی EGCG (Lip-EGCG) و EGCG آزاد (free-EGCG) (25 تا 200 میکروگرم در میلی‌لیتر). میزان $p > 0.05$ غیرمعنادار (ns)، $p < 0.05$ با یک ستاره یا مربع، $0.01 < p < 0.05$ با دو ستاره یا مربع و $p < 0.01$ با سه ستاره یا مربع مشخص شده است (ستاره برای مقایسه بین گروه‌های آزمایشی و مربع برای مقایسه با گروه کنترل در نظر گرفته شده است).

بارگذاری آن در دو لایه لیپیدی نانولیپوزوم می‌باشد. همچنین بارگذاری داروها در نانولیپوزوم‌ها سبب افزایش

علت افزایش قدرت تأثیری EGCG نانولیپوزومه در مهار رشد سلول‌ها افزایش پایداری EGCG به دلیل

را در مورد دلایل تغییرات مشاهده شده در نتایج بقا پس از درمان EGCG ارائه می دهد که از جمله محدودیت های این مطالعه به شمار می رود.

4- نتیجه گیری

یکی از راهکارهای مناسب برای انتقال هدفمند دارو به بافت توموری، کاهش دوز مصرفی، کاهش عوارض جانبی، جلوگیری از تجزیه شدن داروها در بدن، افزایش حلالیت داروهای کم یا نامحلول و غیره است که با استفاده از نانوحامل ها امکان پذیر می باشد. نانوحامل های مختلفی را می توان در دارورسانی استفاده کرد. یکی از این نانوحامل ها که رشد چشمگیری در عرصه مطالعات رهایش دارو دارد، نانولیپوزوم است که با ویژگی های منحصر به فرد مانند زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، اندازه مطلوب، توانایی بارگذاری انواع ترکیب های آبدوست و آبگریز گزینه ای مطلوبی می باشد. یکی از مراحل مهم در این حوزه بهینه سازی سنتز لیپوزوم برای انتقال داروها یکی از پارامترهای مهم در امر دارورسانی به شمار می آید. هر دارو به واسطه شرایط فیزیکی شیمیایی خاص نیازمند شرایط فرمولاسیون متفاوتی است. روش های تئوری نظیر شبیه سازی دینامیک مولکولی در کنار روش های آزمایشگاهی تجربی در دستیابی به شرایط بهینه فرمولاسیون دارو و همچنین کاهش هزینه های این فرایند بسیار راهگشا است. در این مطالعه به بررسی بهبود آثار ضدسرطانی دارو EGCG از راه فرمولاسیون لیپوزومی پرداخته شد. یکی از مسائل مهم در این بررسی نحوه اندرکنش و قرارگیری دارو EGCG در غشای لیپوزومی است. نتایج شبیه سازی دینامیک مولکولی نشان از قرارگیری دارو در بخش سر آبدوست و نزدیک سطح لیپوزوم و در نزدیکی سطح غشا در بخش دنباله های اسید چرب فسفولیپیدی می باشد. این رفتار را در داروهای

جذب درون سلولی دارو در سلول های سرطانی می شود و زنده ماندن سلول ها را نسبت به داروی آزاد به میزان حدود دو برابر کاهش می دهد [30]. بنابراین به نظر می رسد استفاده از حامل های لیپوزومی منجر به افزایش اثرگذاری دارو EGCG بر سلول های سرطانی پستان می شود.

در بین سه رده سلولی بررسی شده کمترین (IC₅₀) برای مهار رشد سلول ها مربوط به رده سلولی SKBR-3 (54/8 میکروگرم در میلی لیتر) است (جدول 2). سلول های سرطان پستان اغلب براساس وضعیت گیرنده خود، از جمله گیرنده استروژن (ER)، گیرنده پروژسترون (PR) و گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسانی 2 (HER2) طبقه بندی می شوند. سلول های (MCF-7) ER مثبت، SKBR-3 نیز HER2 مثبت می باشند درحالی که سلول های رده MDA-MB-231 سه گانه منفی هستند (بدون بیان قابل توجه ER، PR و HER2). تفاوت در وضعیت این گیرنده ها می تواند بر نحوه پاسخ سلول ها به EGCG تأثیر بگذارد، زیرا این گیرنده ها در مسیرهای سیگنال دهی سلولی نقش دارند. EGCG می تواند مسیرهای سیگنال دهی سلولی مختلف را تعدیل کند، از جمله مسیرهایی که در بقای سلولی، تکثیر و آپوپتوز نقش دارند. مسیرهای خاص فعال یا مهارشده به وسیله EGCG ممکن است در میان انواع مختلف سرطان پستان متفاوت باشد، برای مثال سلول های HER2 مثبت (SKBR-3) ممکن است در مقایسه با سلول های ER- مثبت (MCF-7) یا سه منفی (MDA-MB-231) واکنش متفاوتی نشان دهند [31]. همچنین EGCG بیان گیرنده های فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR یا ErbB) مانند ErbB1 و ErbB2 را که در سرطان پستان به ویژه در کارسینوم اپیدرموئید (A-431) و SKBR-3 بیش از حد بیان می شوند، مهار می کند [7؛ 32]. درک ویژگی های مولکولی و ژنتیکی خاص سلول های MCF-7، SKBR-3 و MDA-MB-231 همراه با شرایط تجربی، بینش بیشتری

منابع

- [1] DeSantis, C., et al., *Breast cancer statistics, 2013*. CA: a cancer journal for clinicians, 2014. **64**(1): p. 52-62.
 - [2] Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*. CA: a cancer journal for clinicians, 2013. **63**(1): p. 11-30.
 - [3] Austin, L.T., et al., *Breast and cervical cancer screening in Hispanic women: a literature review using the health belief model*. Women's Health Issues, 2002. **12**(3): p. 122-128.
 - [4] Siegel, R.L., et al., *Cancer statistics, 2023*. Ca Cancer J Clin, 2023. **73**(1): p. 17-48.
 - [5] Rundhaug, J.E., *Matrix metalloproteinases and angiogenesis*. Journal of cellular and molecular medicine, 2005. **9**(2): p. 267-285.
 - [6] Ramadass, S.K., et al., *Paclitaxel/epigallocatechin gallate coloaded liposome: a synergistic delivery to control the invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells*. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 2015. **125**: p. 65-72.
 - [7] Marín, V., et al., *The potential role of Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) in breast cancer treatment*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**(13): p. 10737.
 - [8] Khan, N. and H. Mukhtar, *Cancer and metastasis: prevention and treatment by green tea*. Cancer and Metastasis Reviews, 2010. **29**(3): p. 435-445.
 - [9] Vaishnavi Jahagirdar, S.M., et al., *An Overview Of EGCG And Its Potential Effects On Breast Cancer Cells*. Journal of Pharmaceutical Negative Results, 2023: p. 800-806.
 - [10] Cooper, R., D.J. Morré, and D.M. Morré, *Medicinal benefits of green tea: part II. Review of anticancer properties*. Journal of Alternative & Complementary Medicine, 2005. **11**(4): p. 639-652.
 - [11] Min, K.-j. and T.K. Kwon, *Anticancer effects and molecular mechanisms of epigallocatechin-3-gallate*. Integrative medicine research, 2014. **3**(1): p. 16-24.
 - [12] Sang, S., et al., *The chemistry and biotransformation of tea constituents*. Pharmacological research, 2011. **64**(2): p. 87-99.
 - [13] Shtay, R., et al., *Encapsulation of (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in solid lipid*
- هیدروفوب مشابه دیگر نظیر کورکومین نیز مشاهده شده است. نتایج انرژی و تابع توزیع شعاعی نشان از پایداری لیپوزوم حاوی دارو است. همچنین براساس نتایج شبیه سازی بیشترین میزان دارو در بخش غشای دولایه لیپیدی توسط لیپوزوم احاطه شده است که خود گویای درصد بالایی بارگذاری دارو EGCG در لیپوزوم است. نتایج تجربی همبستگی بالایی با نتایج شبیه سازی دینامیک مولکولی را نشان می دهد که به توسعه استفاده ترکیبی از روش محاسباتی در کنار روش تجربی برای بهبود خواص نانولیپوزوم ها بسیار تأکید می شود. به طور کلی نتایج تجربی این پژوهش نشان داد که بارگذاری EGCG در لیپوزوم باعث افزایش مرگ سلولی و اثربخشی آن در رده های مختلف سلول سرطان پستان می شود. این داده ها ضمن تأیید پژوهش های پیشین، اثربخشی این دارو را به عنوان یک رژیم شیمی درمانی جدید پیشنهاد کرده است. ترکیب این فرمولاسیون لیپوزومی به دلیل کارایی بارگذاری بالا، پایداری در شرایط کپسول شدن دارو و درون تنی، افزایش نیمه عمر دارو و جذب سلولی بالا مناسب برای کاربردهای تحویل دارو است. از این رو نیاز به مطالعه های بیشتر در جهت بررسی استفاده از این لیپوزوم حاوی EGCG در الگوی حیوانی ضروری است.

فقدانی و تشکر

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از ریاست محترم دانشکده، استادان گروه بیوفیزیک و مسئولان پژوهشی دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، به عمل آورند.

- [24] Genheden, S. and L.A. Eriksson, *Estimation of liposome penetration barriers of drug molecules with all-atom and coarse-grained models*. Journal of chemical theory and computation, 2016. **12**(9): p. 4651-4661.
- [25] Lyu, Y., et al., *Characterization of interactions between curcumin and different types of lipid bilayers by molecular dynamics simulation*. The Journal of Physical Chemistry B, 2018. **122**(8): p. 2341-2354.
- [26] Mishra, K. and A.K. Jain, *Liposomes: An Emerging Approach for the Treatment of Cancer*. Current Pharmaceutical Design, 2021.
- [27] Sharma, A. and U.S. Sharma, *Liposomes in drug delivery: progress and limitations*. International journal of pharmaceutics, 1997. **154**(2): p. 123-140.
- [28] Winterhalter, M. and D.D. Lasic, *Liposome stability and formation: experimental parameters and theories on the size distribution*. Chemistry and physics of lipids, 1993. **64**(1-3): p. 35-43.
- [29] Inglut, C.T., et al., *Immunological and toxicological considerations for the design of liposomes*. Nanomaterials, 2020. **10**(2): p. 190.
- [30] De Pace, R.C.C., et al., *Anticancer activities of (-)-epigallocatechin-3-gallate encapsulated nanoliposomes in MCF7 breast cancer cells*. Journal of liposome research, 2013. **23**(3): p. 187-196.
- [31] Filippi, A., et al., *Epigallocatechin-3-O-gallate alleviates the malignant phenotype in A-431 epidermoid and SK-BR-3 breast cancer cell lines*. International journal of food sciences and nutrition, 2018. **69**(5): p. 584-597.
- [32] Pan, X., et al., *Estrogen receptor- α 36 is involved in epigallocatechin-3-gallate induced growth inhibition of ER-negative breast cancer stem/progenitor cells*. Journal of Pharmacological Sciences, 2016. **130**(2): p. 85-93.
- nanoparticles for food applications*. Journal of food engineering, 2019. **244**: p. 91-100.
- [14] Fang, J.-Y., et al., *Effect of liposome encapsulation of tea catechins on their accumulation in basal cell carcinomas*. Journal of dermatological science, 2006. **42**(2): p. 101-109.
- [15] Zucker, D., et al., *Liposome drugs' loading efficiency: a working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties*. Journal of controlled release, 2009. **139**(1): p. 73-80.
- [16] Monticelli, L., et al., *The MARTINI coarse-grained force field: extension to proteins*. Journal of chemical theory and computation, 2008. **4**(5): p. 819-834.
- [17] Van Der Spoel, D., et al., *GROMACS: fast, flexible, and free*. Journal of computational chemistry, 2005. **26**(16): p. 1701-1718.
- [18] Potter, T.D., et al., *Partitioning into phosphatidylcholine-cholesterol membranes: liposome measurements, coarse-grained simulations, and implications for bioaccumulation*. Environmental Science: Processes & Impacts, 2023.
- [19] Andersen, H.C., *Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature*. The Journal of chemical physics, 1980. **72**(4): p. 2384-2393.
- [20] Hoover, W.G., *Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions*. Physical review A, 1985. **31**(3): p. 1695.
- [21] Essmann, U., et al., *A smooth particle mesh Ewald method*. The Journal of chemical physics, 1995. **103**(19): p. 8577-8593.
- [22] DeLano, W.L., PyMOL. 2002.
- [23] Zhu, W., et al., *Molecular insight into affinities of gallated and nongallated proanthocyanidins dimers to lipid bilayers*. Scientific reports, 2016. **6**: p. 37680.

Synthesis and evaluation of nanoliposomes containing epigallocatechin gallate: Experimental/ Computational Studies

Mohammad Tohidlou[§], Sanam Sadeghi-Mohammadi[§], Mohammad Gorbani, Zahra Vaezi, Alireza Farasat⁵, Majid Taghdir⁶, Hossein Naderi-Manesh^{7*}

1-MSc, Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2-PhD, ATMP Department, Breast Cancer Research Center, Motamed Cancer Institute, ACECR, Tehran, Iran

3-PhD, Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4-Assistant Professor, Bioactive compounds Department, Interdisciplinary Science and Technologies Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

5-PhD, Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran

6-Assistant Professor, Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

7-Professor, Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Postal codes, 14115-154 Tehran, Iran}

[§] Mohammad Tohidlou and Sanam Sadeghi-Mohammadi are equally as the first author.

*Corresponding author: naderman@modares.ac.ir

Received:2024/3/18

Accepted: 2024/12/28

Abstract:

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a zinc endopeptidase family that increases the metastatic behavior of human malignant tumors. Epigallocatechin gallate (EGCG) is a major component of green tea polyphenols and is used as an MMP inhibitor in cancer treatment. This study aims to develop and optimize the loading of EGCG in the liposomal delivery system in an experimental/ computational way. In this study, nanoliposomes were prepared by passive loading and thin-film hydration method. Size, zeta potential, stability, encapsulation efficiency, and nanoliposome drug release profile were investigated. Cytotoxicity of nanoliposomes was evaluated on three breast cancer cell lines using an MTT viability assay. To investigate the EGCG-Liposome interaction, coarse-grained Molecular Dynamic simulations were carried out. The mean diameter of liposome was 73.6 ± 6.9 nm, the surface charge was -14.6 mV and the encapsulation efficiency was $78.5 \pm 7.3\%$. The encapsulation of EGCG into the liposome caused a continuous release of the drug after 72 h, which also increased the potency of the drug. Due to the EGCG hydrophobic properties, the major distribution is located at the hydrophobic part of the membrane. The energy and radial distribution function results indicate the stability of liposomes. Simulation results demonstrate that the majority of the drug is surrounded by liposomes, which indicates high encapsulation efficiency and confirms the developed synthesis method. Due to the low solubility of the drug, it seems that the use

of liposomal carriers to deliver and release EGCG is a suitable solution to increase the efficiency of the drug.

Keywords: Epigallocatechin Gallate, Liposome, Breast Cancer, Molecular Dynamics Simulation, Martini Force Field