

سنتز نانوذرات پلیمرزوم به عنوان حامل ترکیب زیست فعال پودوفیلوتوکسین با کاربرد پیشنهادی علیه سرطان کبد

پروانه پیوند^۱، زهرا واعظی^۲، حسین نادری منش^{۱*}

۱-گروه نانویوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲-گروه مواد زیست فعال، دانشکده علوم و فناوری های بین رشته ای، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۵۴-۱۴۱۱۵، تهران، ایران

Naderman@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۱۸

دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۴

چکیده

هپاتوسلولار کارسینوما، رایج ترین نوع سرطان کبد و علت اصلی مرگ در بیماران مبتلا به سیروز کبدی است. پودوفیلوتوکسین به عنوان یک ترکیب ضدسرطان طبیعی، خواص ضدتوموری ایده آلی برای درمان سرطان دارد، اما استفاده از آن به دلیل حلالیت و فراهمی زیستی ضعیف محدود شده است. بنابراین، یافتن یک سیستم تحویل داروی مناسب، از اهمیت زیادی در بهبود فراهمی زیستی پودوفیلوتوکسین برخوردار است. در مطالعه حاضر، از نانوذرات mPEG-PCL برای دارورسانی پودوفیلوتوکسین به سلول های سرطان کبد استفاده شده است. کوپلیمرهای mPEG-PCL سنتز شدند و توسط روش های آنالیز DLS، FTIR و NMR تعیین ساختار شدند. غلظت بحرانی میسل شدن 0.055 میکروگرم بر میلی لیتر، متوسط سایز نانوذرات 186 ± 12 نانومتر و پتانسل زتا -5.13 میلی ولت به دست آمد. سپس، دارو به روش نانورسوب دهی در نسبت های مختلف وزنی/وزنی کوپلیمر: دارو، در میسل ها بارگذاری شد. سایز نانوذرات حاوی دارو 214 ± 20 نانومتر و نسبت وزنی $1:1$ با میزان بارگذاری $1.23 \pm 77/36$ به عنوان نسبت بهینه انتخاب شد. نتایج رهایش دارو تفاوت معنی داری بین آزادسازی سریع پودوفیلوتوکسین آزاد و انتشار پایدارتر داروی بارگذاری شده نشان داد. در دمای 37 درجه سانتی گراد رهایش دارو بیشتر بود که به تخریب ساختار پلیمرزوم در این دما نسبت داده شد. با توجه به نتایج تست سمیت سلولی، مقدار IC_{50} برای نانودارو، $8/64$ میکروگرم بر میلی لیتر و پایین تر از مقدار IC_{50} برای داروی آزاد ($12/79$ میکروگرم بر میلی لیتر) بود که تأثیر سمیت سلولی بهبود یافته نانودارو در مقایسه با داروی آزاد را نشان داد. بر اساس نتایج به دست آمده، نانوذرات پلیمرزوم می تواند حامل های بالقوه ای برای تحویل، رهایش قابل کنترل و بهبود اثر سمیت پودوفیلوتوکسین در شیمی درمانی سرطان باشند.

کلید واژگان: سرطان کبد، پودوفیلوتوکسین، کوپلیمر mPEG-PCL، پلیمرزوم، دارورسانی

۱- مقدمه

رایج‌ترین نوع سرطان کبد اولیه، هپاتوسلولار کارسینوما^۱ یا به اختصار HCC می‌باشد [۱]، که ۷۰-۸۵ درصد از انواع سرطان کبد را به خود اختصاص داده است [۲، ۳]. تقریباً ۸۰ درصد از موارد ابتلا به هپاتوسلولار کارسینوما، ناشی از عفونت‌های ویروس هپاتیت B (HBV) و هپاتیت C (HCV) است که هر ساله منجر به حدود ۲۵۰ هزار مورد جدید HCC می‌شود [۴]. شیمی‌درمانی روش اصلی درمان در سرطان کبد پیشرفته می‌باشد. بزرگترین منبع مواد اولیه داروهای ضدسرطان، ترکیبات طبیعی هستند و توجه بیشتری به شناسایی ترکیبات ضدسرطانی از متابولیت‌های گیاهی متمرکز شده است [۵]. در میان آثار و منابع پزشکی فعالیت‌های ضدتوموری، ضد التهابی، سرکوب سیستم ایمنی، قلبی-عروقی، پاداکسایشی و ضد ویروسی آلکالوئیدهای گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. مواد زیست‌فعال کم حجم و پرتوان منابع مهمی برای داروهای ضدسرطان بالقوه با پتانسیل بالینی برای پیشگیری و درمان بیماری سرطان هستند [۶، ۷].

پودوفیلوتوکسین^۲ (PPT) یکی از اعضای خانواده لیگنان‌ها است و عمدتاً از گونه‌های Podophyllum جداسازی می‌شود [۸]. این ترکیب اخیراً به دلیل فعالیت ضدتوموری خود، در درمان انواع مختلف سرطان‌ها، از جمله سرطان پروستات [۹]، سرطان دهانه رحم [۱۰]، سرطان کبد [۱۱]، سرطان سینه [۱۲] و ... بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۱۳]. فعالیت ضدتوموری پودوفیلوتوکسین و مشتقات آن در برابر تومورهای کبدی نیز در مطالعات مختلف بررسی و مشخص شده است [۱۴]. پودوفیلوتوکسین فعالیت‌های بیولوژیکی، به‌ویژه اثرات ضدسرطانی خود را از طریق مهار پلیمریزه شدن توبولین^۳ انجام می‌دهد [۱۵، ۱۶]. با این حال، کاربرد بالینی پودوفیلوتوکسین، به‌عنوان یک ماده

ضد تومور، به دلیل حلالیت ضعیف و عوارض جانبی آن محدود شده است [۹، ۱۷].

کپسوله کردن داروها در داخل نانوذرات زیست‌سازگار برای رهاسازی کنترل شده و پایدار یکی از راهبردهای درمان سرطان است [۱۸-۲۰]. سیستم‌های مختلف انتقال دارو برای افزایش اثر ضدتوموری داروها و کاهش عوارض جانبی نامطلوب آنها مورد بهره‌برداری قرار گرفته است [۲۱، ۲۲]. برای مثال Wu و همکاران از نانوذرات لیپوزوم حاوی پودوفیلوتوکسین برای درمان سرطان پروستات استفاده کردند [۹]. در حالی که، نانوذرات پلی-L،D-لاکتید برای تحویل پودوفیلوتوکسین به سلول‌های سرطانی ریه مطالعه شدند [۲۳]. در مطالعه‌ای توسط Zhu و همکاران، مشخص شد که پودوفیلوتوکسین بارگذاری شده در نانوذرات اکسید گرافن پگیله شده اثر ضدتوموری PPT را افزایش می‌دهد [۱۱]. بر اساس مطالعات تحقیقاتی دیگر، نانوذرات ترانسفرزوم [۲۴] و نانوذرات مغناطیسی [۲۵] می‌توانند برای تحویل پودوفیلوتوکسین با هدف درمان سرطان سینه و دهانه رحم استفاده شوند.

با این حال، راندمان ضعیف بارگذاری دارو، سمیت بالا، تجزیه ناپذیری زیستی و پایداری کم، مشکلات اصلی این نانوحامل‌ها هستند. پلیمرزوم‌ها، میسل‌های پلیمری هستند که توسط کوپلیمرهای قطعه‌ای دوگانه دوست تشکیل می‌شوند و به دلیل ساختار منحصر به فرد خود، به‌عنوان سیستم‌های دارورسانی توجه زیادی را در بین محققان به خود جلب کرده‌اند [۲۶، ۲۷]. لایه سطحی آبدوست پلیمرزوم‌ها از پلیمرهای زیست‌سازگار مانند زنجیره‌های پلی اتیلن گلیکول تشکیل شده است. این پلیمرها نقش مهمی در جلوگیری از چسبندگی بیش از حد پروتئین‌های پلاسما بر روی سطح نانوذرات و همچنین تشکیل تاج‌های پروتئینی دارند [۲۸، ۲۹].

¹ Hepatocellular carcinoma (HCC)

² podophyllotoxin

³ Tubulin polymerization

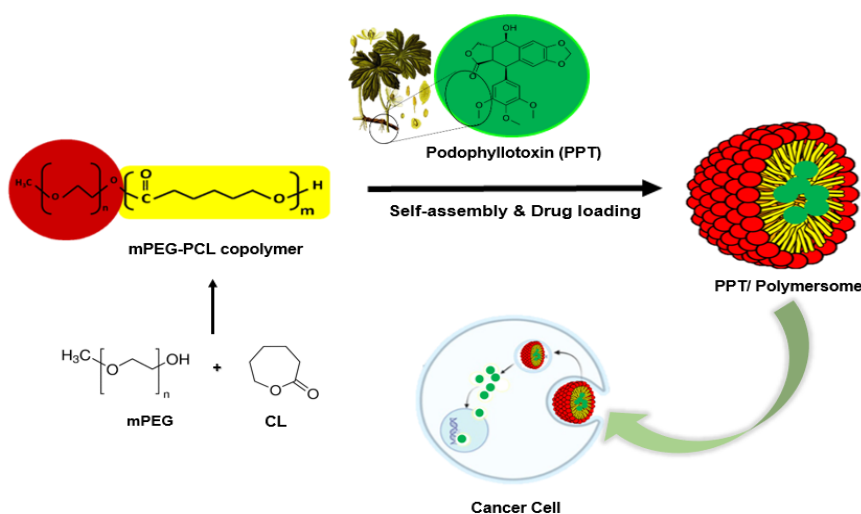
مشخصه‌یابی و پایداری نانوحامل، میزان بارگذاری، رهایش دارو از نانوحامل در دما و pHهای مختلف و سمیت سامانه بر روی سلول‌های سرطانی کبد مطالعه شد. (شکل ۱ نمای شماتیک تشکیل کوپلیمر، پلیمرزوم سنتزی و بارگذاری دارو را نشان می‌دهد).

۲- مواد و روش‌ها

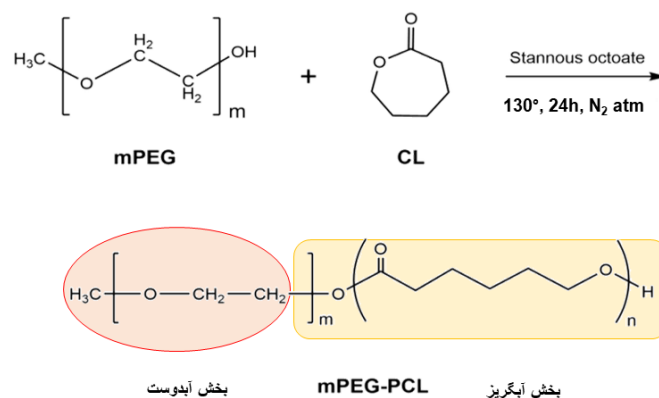
۲-۱ مواد

متوکسی پلی‌اتیلن گلیکول ($M_n=5000$ Da) از شرکت سیگما، ϵ -کاپرولاکتو (ϵ -CL)، قلع (II)-۲-اتیل هگزانات $Sn(Oct)_2$ ، تولوئن، دی‌کلرومتان، دی‌اتیل اتر، متانول و دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) از شرکت مرک، پودوفیلوتوکسین (استخراج شده از ریشه گیاه *linum album*، اهدایی از آزمایشگاه دکتر شریفی گروه زیست‌شناسی گیاهی دانشگاه تربیت مدرس)، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، تریپسین، سرم جنین گاوی (FBS) و محیط‌کشت F12/DMEM از شرکت BIO-IDEA، نمک MTT از شرکت سیگما و سلول HepG2 از انستیتو پاستور ایران. بافر فسفات (PBS) حاوی نمک‌های یک و دو ظرفیت سدیمی فسفاتی، کلرید سدیم و پتاسیم می‌باشد.

میسل‌های پلیمری مزایای بسیاری نسبت به لیپوزوم‌ها دارند. این مزایا شامل پایداری بیشتر، ماندگاری مناسب دارو در جریان خون، توانایی بارگذاری مقدار بیشتری از داروهای آگریز به دلیل غشاهای ضخیم‌تر، امکان حمل هم‌زمان چند دارو و همچنین قابلیت طراحی دقیق ساختار پلیمری، متناسب با رهایش مطلوب و دقیق دارو می‌باشد [۳۰]. با انتخاب کوپلیمرهای قطعه‌ای مناسب، این سامانه‌ها قادرند با پاسخگویی به محرک‌های محیطی مانند دما، pH و عوامل اکسایش-کاهش، داروهای آبدوست و هم‌چنین آگریز را به‌طور کنترل شده در محل مشخص شده آزاد کنند [۳۱]. یکی از سیستم‌های دارورسانی مناسب برای داروهای آگریز، پلیمرزوم‌ها هستند که از کوپلیمرهای متوکسی پلی (اتیلن گلیکول) - پلی (ϵ -کاپرولاکتون) (mPEG-PCL) تشکیل شده‌اند [۳۲، ۳۳]. هدف از این مطالعه سنتز نانوذرات پلیمرزوم متشکل از کوپلیمرهای mPEG-PCL، بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی نانوذرات سنتز شده و همچنین بررسی اثرات ضدسرطانی آنها بر روی سلول‌های سرطانی کبد می‌باشد. پودوفیلوتوکسین استخراج شده از ریشه پودوفیلوم را در نانوحامل پلیمرزوم بارگذاری کرده و سپس تست‌های



شکل ۱ شماتیک سنتز کوپلیمر، پلیمرزوم و بارگذاری دارو



شکل ۲ تصویر شماتیک سنتز کوپلیمر mPEG-PCL و بخش‌های آبدوست و آبگریز آن

می‌شود. بعد از ۵ دقیقه می‌توان محلول میسل را تا دمای اتاق خنک کرد و برای کاربردهای دیگر استفاده کرد.

۲-۴ مشخصه‌یابی کوپلیمرهای سنتز شده و نانوحامل پلیمرزوم

برای بررسی اندازه، میزان شاخص پراکندگی و پتانسیل زتای نمونه‌های سنتز شده از روش پراش دینامیکی نور^۴ (DLS) استفاده شد. به این منظور نمونه‌های سنتز شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با دستگاه Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) بررسی شدند. آزمون طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) برای تعیین برهمکنش‌های احتمالی بین مواد درگیر در یک واکنش استفاده می‌شود. نمونه کوپلیمر لیوفلیزه شده، برای تهیه دیسک‌های استاندارد با KBr فشرده شدند و طیف FTIR دیسک‌های آماده شده با استفاده از دستگاه Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR: 6300, JASCO, Japan) در محدوده ۴۰۰۰-۴۰۰ cm⁻¹ انجام شد. بررسی تشکیل کوپلیمر mPEG-PCL با استفاده از روش تجزیه و تحلیل رزونانس مغناطیسی هسته پروتون (H NMR) با دستگاه طیف‌سنجی Bruker Spectrospin 400 انجام شد. برای آماده‌سازی نمونه، ۱۰ میلی‌گرم از کوپلیمر سنتز شده در حلال کلروفرم (CDCl₃) حل و طیف‌گیری انجام شد.

۲-۲ سنتز کوپلیمر متوکسی پلی (اتیلن گلیکول)- پلی (کاپرولاکتون) (mPEG-PCL)

کوپلیمر mPEG-PCL با استفاده از روش پلیمریزاسیون حلقه‌گشا سنتز شد که روش سنتز در شکل ۲ نمایش داده شده است. به این صورت که ۵۰ میلی‌گرم از mPEG (M_n=5000 Da) در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد تا آب جذب شده به پلیمر خارج شود. سپس، ۵۰۰ میلی‌گرم از ε-کاپرولاکتون و ۰/۵ درصد (وزنی/وزنی) Sn(Oct)₂ (به عنوان کاتالیزور) به ظرف واکنش افزوده و دما به ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. مخلوط واکنش در اتمسفر نیتروژن به مدت ۲۴ ساعت تحت همزن مغناطیسی قرار گرفت و سپس محصول به دست آمده در دی کلرومتان حل و در دی اتیل اتر سرد رسوب داده شد. در نهایت کوپلیمر حاصل به مدت ۲۴ ساعت تحت خلاء در دمای اتاق خشک شد [۳۲].

۲-۳ تشکیل پلیمرزوم متشکل از کوپلیمرهای mPEG-PCL

میسل‌های mPEG-PCL به روش خودتجمعی تهیه شدند [۳۴]. برای این کار، کوپلیمر mPEG-PCL مستقیماً به آب اضافه شد و سپس، دما تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. با توجه به ویژگی‌های آمفی‌فیلیک، کوپلیمر mPEG-PCL با افزایش دما در میسل‌ها خودآرایی

⁴ Dynamic Light Scattering (DLS)

۲-۵ بررسی پایداری پلیمرزوم

پایداری فیزیکی میسل‌ها با نظارت بر توزیع اندازه ذرات میسل‌ها در محلول بافر فسفات (PBS pH=7.4) ارزیابی شد. پس از آماده سازی میسل‌های پراکنده در بافر، میسل‌ها به مدت ۲۸ روز در دمای اتاق نگهداری شدند و توزیع اندازه میسل‌ها در زمان‌های از پیش تعیین شده (۱، ۷، ۱۴ و ۲۸ روز) با استفاده از تکنیک DLS ثبت شد [۳۵]. نتایج به صورت سه بار تکرار گزارش شده است.

۲-۶ تعیین غلظت بحرانی میسل شدن^۵

غلظت بحرانی میسل‌های mPEG-PCL با استفاده از پیرن^۶ به عنوان یک پروب فلورسنت هیدروفوب تعیین شد [۳۶]. مجموعه‌ای از محلول‌های آبی با غلظت‌های مختلف کوپلیمر ۱۰/۱-۱×۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد. مقدار مشخصی از پیرن به هر یک از این سری‌ها اضافه شد، به طوری که غلظت نهایی ۰/۶ میکرو مولار پیرن در هر محلول به دست آید. این محلول‌ها به مدت یک شب در دمای ۳۶ درجه سانتی گراد در تاریکی و تحت هم زدن ملایم نگهداری شدند. سپس، نمونه‌ها در طول موج ۳۱۹ نانومتر در دستگاه طیف سنج Jasco FP-750 (کیوتو، ژاپن) مجهز به لامپ زنون ۱۵۰ وات برانگیخته شدند و طیف نشری آنها در بازه ۴۶۰-۳۴۰ نانومتر ثبت شد. عرض شکاف برای تحریک و نشر ۵ نانومتر بود. تمام اندازه‌گیری‌ها در دمای اتاق انجام شد. نسبت شدت پیک اول و سوم در برابر غلظت کوپلیمر برای ارزیابی CMC رسم شد.

۲-۷ بارگذاری داروی پودوفیلوتوکسین در نانوحامل (PPT/mPEG-PCL)

میسل‌های بارگذاری شده با پودوفیلوتوکسین به روش نانورسوبدهی^۷ با استفاده از متانول به عنوان حلال تهیه شدند [۳۳]. بارگذاری در چند نسبت مختلف وزنی/وزنی

از کوپلیمر:دارو (۱:۰/۵، ۱:۱، ۱:۲ و ۱:۵) انجام شد. ابتدا مقدار مشخصی از کوپلیمر mPEG-PCL در محلول متانول حل شد. سپس، داروی پودوفیلوتوکسین در حلال متانول به آرامی به نانوحامل پلیمری (در نسبت‌های وزنی/وزنی ذکر شده) افزوده شد و با استفاده از مگنت استیرر شد. در این روش، کوپلیمرهای mPEG-PCL به صورت خودبه خودی به صورت میسل شکل گرفته و پودوفیلوتوکسین درون هسته میسل قرار می گیرد. سپس، محلول تهیه شده به صورت قطره قطره به ظرف حاوی بافر فسفات اضافه و بعد از مدت دو ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، متانول با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخان^۸ از محلول جدا می شود. در ادامه با استفاده از کیسه دیالیز ۱۲ کیلو دالتونی داروهای آزاد جداسازی و در نهایت برای حذف تمام حلال‌های باقی مانده و تولید فرم خشک نهایی، به صورت انجمادی خشک شده^۹ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۲-۸ تعیین میزان بارگذاری و بارگیری دارو در نانوحامل

ابتدا برای رسم منحنی استاندارد دارو، برای تعیین غلظت های نامعین دارو، محلول استوکی از دارو با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر در حلال متانول تهیه و سپس به روش رقیق سازی غلظت‌هایی از دارو در دامنه غلظت ۱-۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد و سپس با استفاده از دستگاه طیفسنجی مرئی-فرابنفش جذب دارو اندازه گیری شد. سپس، معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی R² تعیین شد.

پلیمرزوم حاوی پودوفیلوتوکسین در نسبت‌های مختلف کوپلیمر:دارو (۱:۰/۵، ۱:۱، ۱:۲ و ۱:۵)، سنتز و پودوفیلوتوکسین آزاد و محبوس نشده با استفاده از کیسه دیالیز (۱۲ KD) به مدت ۱۲ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد جداسازی شد. سپس، برای لیز شدن میسل،

^۸ Rotary evaporator

^۹ Freeze-dry

^۵ Critical Micelle Concentration (CMC)

^۶ Pyrene

^۷ Nanoprecipitation

حجم مشخصی از نانوحامل حاوی دارو با متانول ترکیب شده و غلظت داروهای موجود با احتساب ضریب رقت به کار رفته و با استفاده از نمودار استاندارد مشخص شد. مقدار داروی موجود در محلول با استفاده از جذب نوری پودوفیلوتوکسین در طول موج ۲۹۱ نانومتر اندازه گیری شده و راندمان بارگذاری^{۱۰} (EE) و راندمان بارگیری^{۱۱} (LE) بر اساس معادله ۱ و ۲ محاسبه شد. در نهایت نسبت وزنی با بیشترین درصد بارگذاری و بارگیری دارو به عنوان نسبت بهینه انتخاب شد. آزمایش به صورت سه بار تکرار انجام شده است.

معادله ۱

$$= \text{راندمان بارگذاری دارو} \\ \frac{\text{میزان داروی بارگذاری شده}}{\text{میزان داروی اولیه}} \times 100$$

معادله ۲

$$= \text{راندمان بارگیری دارو} \\ \frac{\text{میزان داروی بارگذاری شده}}{\text{میزان نانوحامل آزاد} + \text{میزان داروی بارگذاری شده}} \times 100$$

۹-۲ رهایش دارو

رهایش داروی پودوفیلوتوکسین به روش انتشار مستقیم^{۱۲} و با استفاده از کیسه دیالیز بررسی شد. آزمایش به مدت ۹۶ ساعت در بافر فسفات با pH=۵/۵ و pH=۷/۴ و در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد. نانوسامانه با نسبت وزنی بهینه، در بافر فسفات به میزان ۱ میلی گرم بر میلی لیتر حل شد. سپس، در کیسه دیالیز ۱۲ کیلو دالتونی قرار داده و در بافر فسفات تحت حرکت ملایم (۱۲۰

دور در دقیقه) معلق شد. از آنجا که پودوفیلوتوکسین یک ماده نامحلول در آب است، بنابراین در بافر فسفات ۲۰ درصد اتانول افزوده شد. برای اندازه گیری میزان جذب داروی پودوفیلوتوکسین آزاد شده، ۱ میلی لیتر از محلول بافر در فواصل زمانی مشخص خارج شد و با بافر فسفات تازه جایگزین شد. مقدار داروی آزاد شده در هر بازه زمانی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-Vis) در طول موج ۲۹۱ نانومتر ارزیابی شد. آزمایش به صورت سه بار تکرار انجام شد [۳۸، ۳۷].

۱۰-۲ کشت سلول

ارزیابی سمیت سلولی پلیمرزوم های PPT/mPEG-PCL، میسل های خالی mPEG-PCL و PPT آزاد از طریق سنجش MTT انجام شد. رده سلولی سرطان کبد انسان (HepG2) به عنوان رده سلولی مدل از انستیتو پاستور تهیه شد. سلول ها در محیط F12/DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد پنی سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محیطی با ۵ درصد CO₂ و رطوبت ۹۵ درصد نگهداری شدند.

۱۱-۲ سنجش سمیت سلولی

رده سلولی HepG2 با تراکم $10^3 \times 5$ سلول در هر چاهک در صفحات ۹۶ چاهک قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت نگهداری شد. پس از دوره انکوباسیون، سلول ها در معرض محیط تازه (۱۰۰ میکرولیتر) حاوی نمونه هایی با غلظت های مختلف پلیمرزوم های بارگذاری شده با PPT، پلیمرزوم های خالی و داروی آزاد، به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتند. هر تیمار پنج بار تکرار شد. سپس، سلول ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با نمک MTT (۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر) در محیط تازه تیمار شدند. محیط سلولی حذف و DMSO (۱۰۰ میکرولیتر) برای حل کردن بلورهای فورمازان اضافه شد. در انتها، پس از ۱۵ دقیقه

¹⁰ Encapsulation Efficiency

¹¹ Loading Efficiency

¹² Direct dispersion

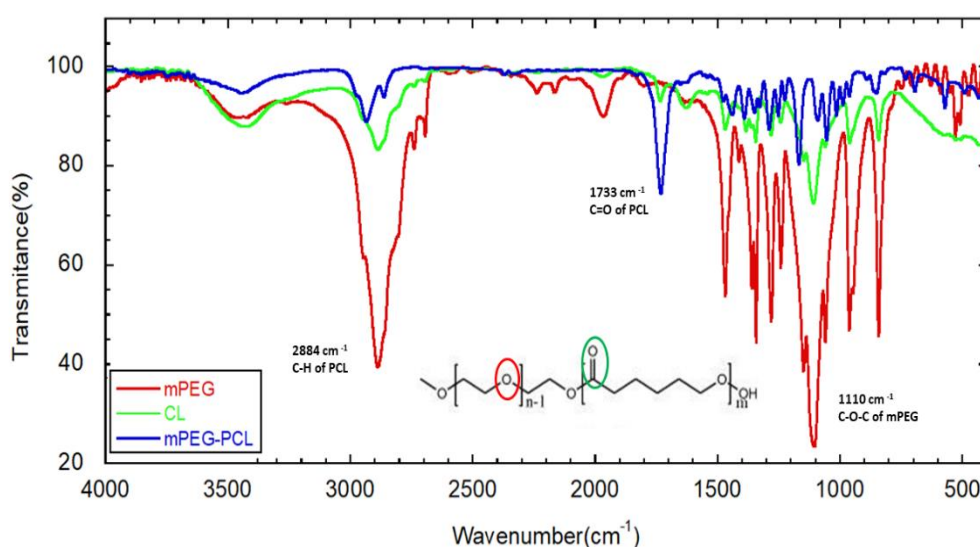
تکان دادن، جذب در ۵۷۰ نانومتر با دستگاه میکروپلیت خوان (MQuant Biotech U.S) خوانده شد [۲۱].

۳- نتایج و بحث

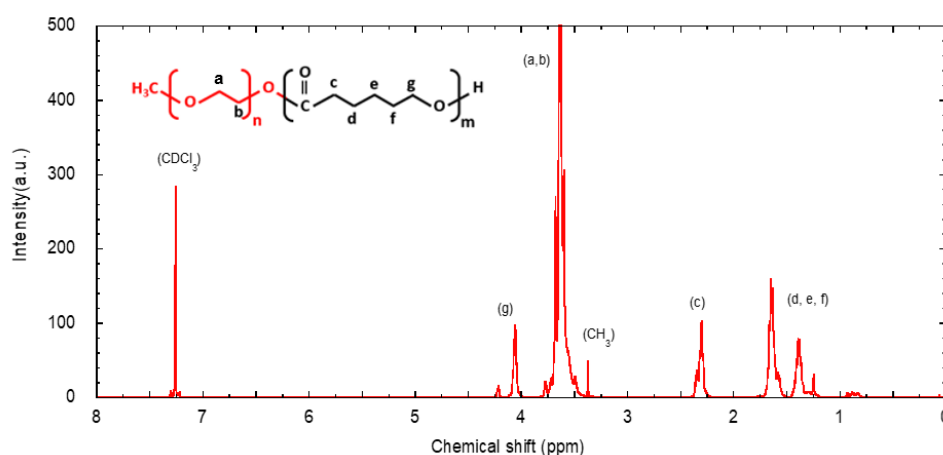
۱-۳ تشکیل کوپلیمر mPEG-PCL

کوپلیمر سنتز شده در این مطالعه از ترکیب پلیمر mPEG با وزن مولکولی ۵۰۰۰ دالتون و مونومر ϵ -کاپرولاکتون (ϵ -CL) تشکیل شده است. کوپلیمر با استفاده از روش

پلیمریزاسیون حلقه گشاستز شد که در آن گروه هیدروکسیل انتهایی mPEG باعث باز شدن حلقه کاپرولاکتون در حضور کاتالیزور می‌شود. ساختار شیمیایی کوپلیمر سنتز شده توسط روش طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری (FTIR) و طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته پروتون (HNMR) بررسی شد.



شکل ۳ آنالیز اسپکتروسکوپی FTIR کوپلیمر mPEG-PCL



شکل ۴ آنالیز اسپکتروسکوپی HNMR مربوط به کوپلیمر mPEG-PCL در حلال CDCl3

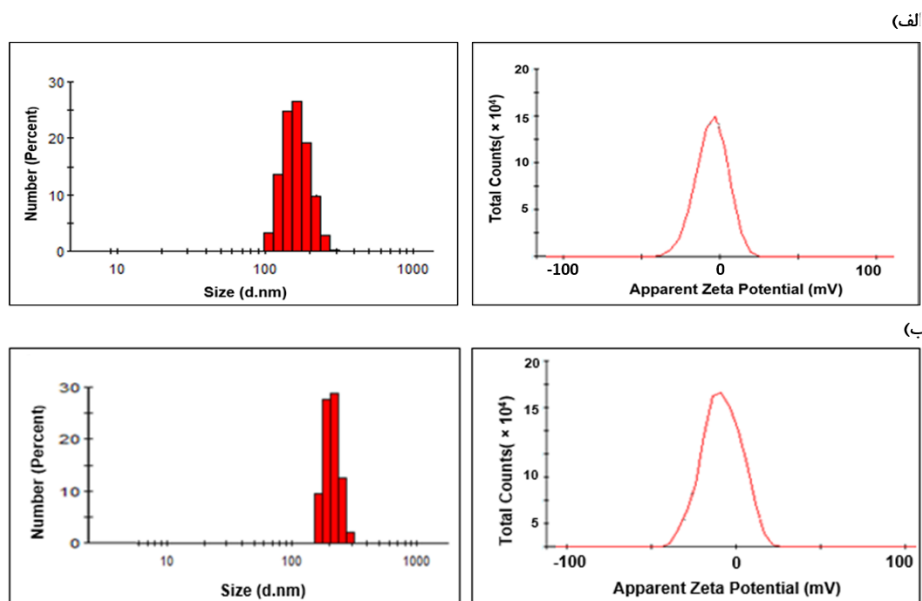
تمامی پروتون‌های PCL و mPEG را نشان داد که تاییدی بر تشکیل کوپلیمر mPEG-PCL می‌باشد.

۲-۳ بررسی ویژگی‌های نانوحامل پلیمرزوم

کوپلیمر mPEG-PCL، یک قطعه پلیمر آبدوست mPEG و یک قطعه پلیمر آبگریز PCL دارد که وجود خاصیت دوگانه دوست (آمفی‌فیلیک) به کوپلیمر این امکان را می‌دهد تا در محیط آبی به صورت خودتجمعی، میسل تشکیل دهد. پودر لیوفلیزه کوپلیمر سنتز شده در آب دیونیزه حل شد و قطر هیدرودینامیکی و پتانسیل زتای آن با روش پراکندگی دینامیکی نور به دست آمد. همانطور که در شکل ۵-الف مشاهده می‌شود، قطر هیدرودینامیکی 186 ± 12 نانومتر و پتانسیل زتای 0.61 ± 0.13 میلی‌ولت با شاخص پراکندگی 0.01 ± 0.21 ، نشان‌دهنده تشکیل میسل در سائز استاندارد تست‌های سلولی می‌باشد. بار منفی کم نانوذرات ممکن است به وجود بلوک‌های PCL در سطح میسل نسبت داده شود [۴۲]. دانسیته بار سطحی منفی به دلیل نیروهای دافعه بیشتر، از تجمع میسل‌ها جلوگیری کرده و در نتیجه پایداری کلئیدی بیشتری خواهند داشت.

طیف FTIR کوپلیمر سنتز شده در شکل ۳ پیک‌های مشخصه mPEG و PCL را نشان داد. پیک 2884 cm^{-1} مربوط به کششی C-H، پیک 1733 cm^{-1} مربوط به گروه کربونیل C=O در PCL و پیک 1110 cm^{-1} مربوط به گروه اتری C-O-C در قطعه mPEG می‌باشد. پیک‌های قوی 1733 cm^{-1} و 1110 cm^{-1} مربوط به گروه کربونیل (C=O) و گروه اتری (C-O)، نشان‌دهنده تشکیل موفقیت‌آمیز کوپلیمر mPEG-PCL می‌باشد [۳۹، ۴۰].

همچنین، برای اثبات این ادعا، طیف‌سنجی HNMR در CDCl_3 برای ارزیابی ساختار و ترکیب کوپلیمر mPEG-PCL استفاده شد. همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، حضور پروتون‌های متیلن (CH_2) در PCL در میدان‌های 1.24 (2H,d)، 1.36 (2H,e)، 1.63 (2H,f)، 2.31 (2H,c) و 4.05 (2H,g) پی‌پی‌ام مشاهده شد. پروتون‌های متیلن (CH_2) و متوکسی (CH_3) در mPEG در نواحی 3.37 و 3.63 پی‌پی‌ام مشاهده شد. قابل ذکر است که پیک مشاهده شده در ناحیه 7.26 پی‌پی‌ام نیز مربوط به حلال CDCl_3 می‌باشد [۴۱]. طیف HNMR



شکل ۵ آنالیز DLS (الف) پلیمرزوم mPEG-PCL، (ب) پلیمرزوم PPT/mPEG-PCL

با ورود کوپلیمر و دارو به محیط آبی، دارو به دلیل خاصیت آبریز خود وارد محیط هیدروفوب داخلی میسل می شود [۳۵، ۴۲]. در شکل ۵-ب، می توان مشاهده کرد که اندازه میسل با بارگذاری PPT در ساختار میسل به 20 ± 214 نانومتر افزایش می یابد که این اندازه ذرات در محدوده قطر لازم برای هدف قرار دادن محل های التهابی تومور از طریق اثر افزایش نفوذپذیری و نگهداری (EPR) قرار دارد [۴۵]. همچنین، پتانسیل زتا به $0.35 \pm 8/15$ میلی ولت تغییر کرد. شاخص پراکندگی میسل های سنتز شده 0.3 ± 0.31 محاسبه شد.

۳-۳ بررسی پایداری پلیمرزوم

پایداری پلیمرزوم ها به عنوان یک سیستم انتقال دارو از اهمیت خاصی برخوردار است. حامل های دارویی با پایداری بالا علاوه بر اینکه از رهائش زود هنگام دارو جلوگیری می کنند، باعث افزایش اثر درمانی و کاهش عوارض جانبی دارو نیز می شوند. لایه سطحی آبدوست زیست سازگار (mPEG) در میسل پلیمری سنتز شده، از جذب بیش از حد پروتئین های پلاسما بر سطح نانوحامل و تشکیل تاج پروتئینی جلوگیری می کند [۲۸]. همچنین، بر اساس مطالعات انجام شده، پلیمرزوم ها به عنوان میسل های پلیمری، در مقایسه با میسل ها و وزیکول های لیپیدی مانند لیپوزوم ها از پایداری بیشتری برخوردار هستند [۳۰].

محلول حل شده از کوپلیمر mPEG-PCL با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر در بافر فسفات، در زمان های معین (۱، ۷، ۱۴ و ۲۸ روز) در دمای اتاق نگهداری شد و

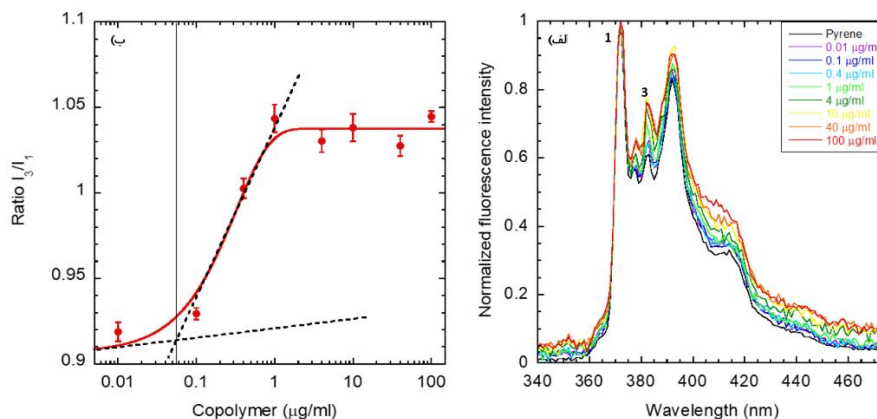
سپس با استفاده از تکنیک DLS اندازه، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی میسل ها مقایسه شد. قابل توجه است که اندازه میسل ها در طول دوره ۲۸ روزه تا حد زیادی بدون تغییر باقی مانده است و تغییر قابل توجهی در طول زمان نشان نداد [۴۲]. در جدول ۱، تغییرات اندازه، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی میسل ها در زمان های بررسی شده ارائه شده است. این نتایج نشان داد که میسل ها می توانند در طی زمان ساختار خود را حفظ کنند و این یک خاصیت مهم برای نانوحامل های دارویی در کاربردهای بالینی به حساب می آید.

۳-۴ تعیین غلظت بحرانی میسل شدن

غلظت بحرانی میسل شدن، CMC، یک پارامتر کلیدی است که خواص فیزیکی میسل ها را توصیف می کند و به پایداری ترمودینامیکی آنها مربوط می شود [۴۳]. تغییرات نثری فلورسانس پروپ پیرن یک روش شناخته شده برای تعیین مقدار CMC است. پروپ پیرن خاصیت آبریز داشته و تمایل به محیط غیرقطبی دارد و در صورت تشکیل میسل به قسمت آبریز آن نفوذ خواهد کرد که می توان غلظت بحرانی تشکیل میسل را ارزیابی کرد [۴۴]. I_1 و I_3 به ترتیب شدت نشر باندهای اول و سوم در طیف فلورسانس پیرن هستند. نسبت شدت I_3/I_1 به قطبیت محیط اطراف مولکول های پیرن بسیار حساس است (علامت ۱ و ۳ در قسمت داخلی شکل ۶-الف). هرچه این نسبت کوچک تر باشد، قطبیت محیط اطراف پیرن بیشتر است و افزایش این نسبت نشان دهنده این است که پیرن وارد محیط غیرقطبی میسل شده است.

جدول ۱ بررسی پایداری نانوحامل پلیمرزوم بر اساس سایز، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی

ردیف	روز	سایز (nm)	پتانسیل زتا (mV)	PDI
۱	۱	186 ± 12	$-5/13 \pm 0/61$	$0/21 \pm 0/01$
۲	۷	$182/2 \pm 15/8$	$-5/54 \pm 0/33$	$0/24 \pm 0/03$
۳	۱۴	$176/6 \pm 9/8$	$-6/21 \pm 0/7$	$0/33 \pm 0/02$
۴	۲۸	207 ± 10	$-9/89 \pm 0/45$	$0/39 \pm 0/04$



شکل ۶ تعیین میزان CMC کوپلیمر mPEG-PCL. (الف) طیف نشری پیرن برای غلظت‌های مختلف کوپلیمر. (ب) نسبت شدت I_3/I_1 در برابر لگاریتم غلظت‌های مختلف کوپلیمر

۳-۵ محاسبه میزان بارگذاری داروی پودوفیلوتوکسین

در نانوحامل پلیمرزوم

برای تعیین میزان بارگذاری و بارگیری دارو در نانوحامل، منحنی استاندارد دارو با تجزیه و تحلیل جذب غلظت‌های استاندارد پودوفیلوتوکسین (۱-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در ۲۹۱ نانومتر به روش اسپکتروسکوپی UV-Vis ترسیم شد. سپس، معادله رگرسیون $y = 0.0197 + 0.0142x$ و ضریب همبستگی ($r^2 = 0.98856$) پودوفیلوتوکسین تعیین مقدار شد. جدول ۲ نتایج به دست آمده از میزان بارگذاری و بارگیری دارو را با استفاده از معادلات ۱ و ۲ نشان می‌دهد. بر اساس این نتایج، نسبت ۱:۱ بالاترین میزان بارگذاری را نشان داد که برای آزمایش‌های بعدی از این نسبت استفاده شد.

در شکل (۶-الف) طیف نشری پیرن برای غلظت‌های مختلف کوپلیمر (۰.۰۱-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در شکل (۶-ب) نسبت I_3/I_1 در برابر غلظت‌های مختلف کوپلیمر نشان داده شده است. پیرن یک مولکول هیدروفوب است، در غلظت کم کوپلیمر، نسبت شدت I_3/I_1 تقریباً بدون تغییر باقی ماند که نشان‌دهنده حضور پیرن در محیط آبی است. با افزایش غلظت کوپلیمر، نسبت شدت I_3/I_1 به طور چشمگیری شروع به افزایش می‌کند و به سطح مشخصه پیرن در محیط کاملاً آبریز در غلظت خاصی از کوپلیمر می‌رسد. از منحنی سیگموئیدی رسم شده، CMC میسل‌های mPEG-PCL به دست می‌آید. برای میسل‌های mPEG-PCL، غلظت بحرانی میسل شدن ۰/۰۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد که پایداری و ظرفیت قوی آنها را برای حفظ ساختارشان حتی در صورت رقیق شدن نشان می‌دهد.

جدول ۲ درصد بارگذاری و بارگیری پودوفیلوتوکسین در پلیمرزوم در نسبت‌های مختلف دارو:کوپلیمر

دارو:کوپلیمر (W:W)	۱:۰/۵	۱:۱	۱:۲	۱:۵
بازده بارگذاری (%)	$71/58 \pm 3/61$	$77/36 \pm 1/23$	$69/23 \pm 2/44$	$59/26 \pm 6/60$
بازده بارگیری (%)	$6/61 \pm 0/60$	$9/1 \pm 2/1$	$12/40 \pm 0/41$	$18/72 \pm 0/44$

۳-۶ سیتیک رهاسازی داروی پودوفیلوتوکسین از

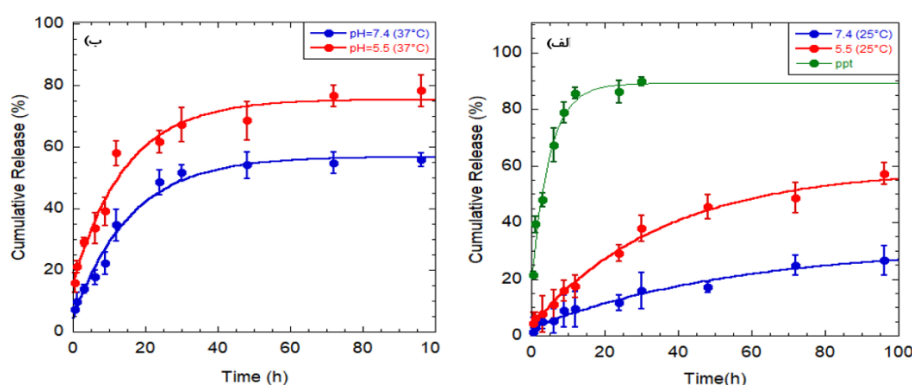
نانوحامل پلیمرزوم

برای بررسی تأثیر عوامل بیوشیمیایی بر آزادسازی PPT از پلیمرزوم‌ها، پروفایل رهایش پودوفیلوتوکسین از نانوحامل تهیه شده در فواصل زمانی مشخص و به مدت ۹۶ ساعت در بافر فسفات با $\text{pH}=5/5$ (برای شبیه‌سازی ریزمحیط تومور) و $\text{pH}=7/4$ (برای شبیه‌سازی شرایط فیزیولوژیکی) و در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. درصد تجمع آب‌دوستی پودوفیلوتوکسین رها شده مطابق شکل ۷ تعیین شد.

در بررسی پروفایل رهاسازی دارو، برای تأیید اینکه انتشار مولکول‌های دارو در سراسر غشای دیالیز یک مرحله محدودکننده سرعت در طول فرایند آزادسازی نیست، انتشار داروی آزاد به عنوان کنترل مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج رهاسازی نشان داد که داروی آزاد به سرعت رها شده و در ۱۲ ساعت اول به اوج خود یعنی $85/71 \pm 2/0$ درصد کل رسیده است (شکل ۷-الف) انتشار کنترل شده و پایدار PPT در هر دو شرایط pH رخ داد. قابل ذکر است، هیچ انتشار اولیه انفجاری در هیچ یک از شرایط pH مشاهده نشد، که نشان می‌دهد PPT به‌طور موثر در هسته میسل‌ها محصور شده است. با کاهش مقدار pH از ۷/۴ به ۵/۵ درصد داروی آزاد شده از پلیمرزوم‌ها افزایش

یافت [۴۵، ۴۶]. به دلیل حضور قطعه PCL در کوپلیمر، که یک پلیمر حساس به pH است، در محیط اسیدی ماتریس پلیمر به دلیل پروتونه شدن پلیمر متورم و ساختار پلیمرزوم سریع‌تر تجزیه شده و باعث رهاسازی بیشتر دارو می‌شود [۴۷]. این رفتار یک ویژگی بسیار مطلوب در تحویل داروی ضدسرطان است که در آن ریزمحیط‌های فضا‌های خارج سلولی تومورها، لیزوزوم‌های داخل سلولی و اندوزوم‌ها اسیدی هستند و به‌طور بالقوه می‌توانند آزادسازی دارو از پلیمرزوم‌ها را تسهیل کند.

پروفایل انتشار روندهای مختلفی را نیز در شرایط دمایی متفاوت نشان دادند. در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، دارو رفتار رهش پایداری را در هر دو pH در مقایسه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نشان داد که نشان‌دهنده پایداری دارو در دمای محیط است. نتایج نشان داد که حداکثر رهش دارو برای $\text{pH}=5/5$ و $\text{pH}=7/4$ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به ترتیب $75/25 \pm 3/80$ و $26/49 \pm 5/23$ درصد و برای دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به ترتیب $58/13$ و $78/33 \pm 2/23$ درصد پس از یک دوره ۹۶ ساعته بود. در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رهایش دارو بیشتر بود که به تخریب ساختار پلیمرزوم در این دما نسبت داده شد (شکل ۷-ب).



شکل ۷ پروفایل رهایش دارو در $\text{pH}=5/5$ و $\text{pH}=7/4$ (الف) دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و (ب) دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

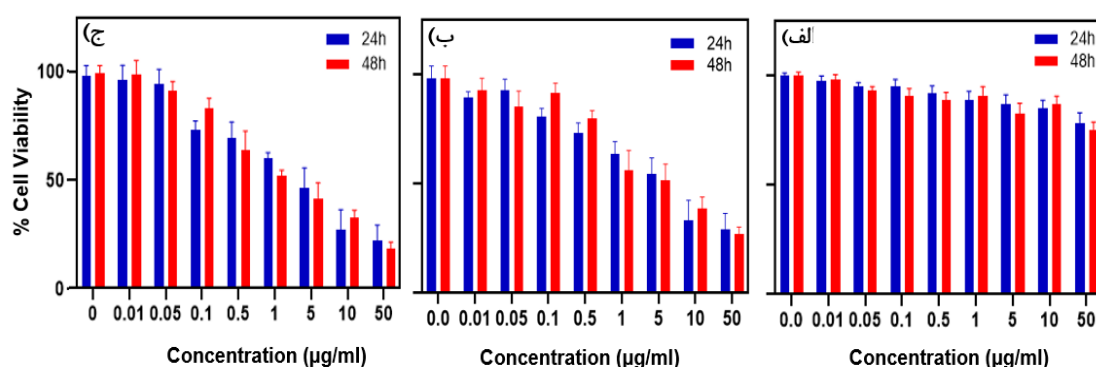
۷-۳ سنجش سمیت سلولی

مطابق شکل ۸، سازگاری سلولی نانوذرات PPT/mPEG-PCL، PCL، آزاد و mPEG-PCL خالی بر روی سلول‌های سرطانی کبد HepG2 بررسی شد. نانوذرات پلیمری خالی پس از زمان‌های انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت، سمیت قابل توجهی در محدوده غلظت آزمایش شده نشان ندادند (شکل ۸-الف). همانطور که در شکل ۸ (ب و ج) نشان داده شده است، هر دو داروی آزاد و نانوذرات PPT/mPEG-PCL به روشی که به غلظت و مدت زمان در معرض قرار گرفتن بستگی دارد، تکثیر سلولی را مهار کردند.

در تمام غلظت‌ها، نانوسامانه در مقایسه با PPT آزاد در همان غلظت، سمیت سلولی بیشتری از خود نشان داد که آن را به گزینه مناسب‌تری برای هدف قرار دادن سلول سرطانی تبدیل کرد. مقدار IC50 که نشان دهنده غلظتی از دارو است که سبب مهار ۵۰ درصدی تکثیر (و یا کاهش ۵۰ درصدی زنده مانی در مقایسه با گروه کنترل) می‌شود، برای ارزیابی تأثیر داروی آزاد و نانوسامانه تعیین شد. مقدار IC50 برای میسل‌های PPT/mPEG-PCL، ۸/۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد که پایین‌تر از

مقدار IC50 برای داروی آزاد (۱۲/۷۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در ۴۸ ساعت بود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که پلیمرزوم‌های mPEG-PCL بارگذاری شده با PPT، تأثیر مهاری PPT را در رده‌های سلولی HepG2 افزایش می‌دهند [۴۷]. غلظت مهاری ترکیبات توسط نرم‌افزار Graphpad prism 10.2.1 تعیین شد.

بارگذاری داروی پودوفیلوتوکسین به‌عنوان یک ترکیب زیست‌فعال، در پلیمرزوم ساخته شده از کوپلیمرهای زیست تخریب پذیر mPEG-PCL در این مطالعه بررسی شد. نانوذرات PPT/mPEG-PCL پایداری و حلالیت دارو را بهبود بخشید. با توجه به مطالعات سمیت سلولی آزمایشگاهی پلیمرزوم‌های mPEG-PCL ایمن و دارای سمیت پایین هستند. همچنین، نانوداروی استفاده شده با مقدار IC50 برابر با ۸/۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به داروی آزاد با IC50 برابر با ۱۲/۷۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر، اثر ضدتوموری PPT را افزایش داد. با توجه به نتایج به دست آمده، نانوذرات mPEG-PCL می‌توانند کاندید خوبی برای توسعه نانوداروها باشند و به‌عنوان نانوحامل برای کاربردهای بالینی و تحویل داروهای ضدسرطان استفاده شوند.



شکل ۸ بررسی سمیت سلولی با استفاده از آزمون MTT برای رده سلولی HepG2. (الف) نانوذرات mPEG-PCL خالی. (ب) پودوفیلوتوکسین آزاد. (ج) نانوذرات PPT/mPEG-PCL (حاوی مقدار داروی مشابه با غلظت داروی آزاد) در زمان‌های تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت.

در مقایسه با مطالعات پیشین، در مطالعه حاضر به دلیل حساس بودن قطعه PCL به pH، ماتریس پلیمری در محیط اسیدی تومور متورم و تخریب شده که باعث رهایش بیشتر دارو در محل تومور می‌شود و این یک ویژگی بسیار مطلوب در تحویل داروی ضدسرطان است که رهاسازی دارو از پلیمرزوم را تسهیل می‌کند. رهایش بیشتر دارو از پلیمرزوم حساس به pH در محل تومور، باعث شده است که پلیمرزوم سنتز شده در مقایسه با نانوذرات لیپوزوم [۹] در غلظت پایین‌تری ۵۰ درصد سلول‌ها را مهار کند.

در مطالعه دیگری نیز که از نانوذرات لیپیدی جامد برای تحویل داروی پودوفیلوتوکسین به سلول‌های سرطانی استفاده شده است، نانوداروی استفاده شده در مقایسه با نانوداروی سنتز شده با پلیمرزوم از اثر ضدتوموری کمتری برخوردار است. این نانوذرات پایداری کمتری در مقایسه با نانوذرات پلیمرزوم دارند و بنابراین مقداری داروی کمتری را به سلول‌های سرطانی رسانده و با توجه به اینکه حساسیت به pH ندارند، داروی کمتری را در محل اسیدی تومور آزاد می‌کنند که در نتیجه در مقایسه با پلیمرزوم اثر ضدتوموری کمتری نیز خواهند داشت [۱۰]. همچنین، در چندین مطالعه نشان داده شده است که میسل‌های پلیمری در مقایسه با میسل‌های لیپیدی و لیپوزوم‌ها پایداری بیشتر و امکان بیشتری برای بارگذاری دارو دارند که باعث می‌شود داروی بیشتری به سلول سرطانی تحویل دهند [۳۰].

میزان بازده بارگذاری و بارگیری پودوفیلوتوکسین در پلیمرزوم mPEG-PCL به ترتیب ۷۷/۳۶ و ۹/۱ درصد بود، در حالی که این مقادیر برای نانوذرات PLA [۹]، به ترتیب برابر ۱۷ و ۲/۰۱ درصد بود. همچنین، پلیمرزوم سنتز شده در محیط فیزیولوژیک (pH=۷/۴) کمتر از ۲۰ درصد پودوفیلوتوکسین را در مدت زمان ۲۴ ساعت آزاد کرده، ولی نانوذرات PLA در این مدت زمان و در محیط

فیزیولوژیک حدود ۵۳ درصد از داروی خود را آزاد می‌کنند. در مطالعه‌ای که از نانوذرات لیپیدی جامد استفاده شده است، حدود ۸۰ درصد دارو در مدت زمان ۱۲ ساعت آزاد شده است [۱۰] و این یعنی مقدار زیادی از دارو به صورت انفجاری آزاد شده و به صورت پایدار به سلول توموری نمی‌رسد. بنابراین، با استفاده از نانوذرات پلیمرزوم زیست تخریب‌پذیر بارگذاری کارآمد، رهایش پایدار و افزایش اثربخشی ضدتوموری داروی پودوفیلوتوکسین به دست آمد.

۴- نتیجه‌گیری

نانوذرات mPEG-PCL بارگذاری شده با PPT برای اثربخشی آنها در درمان سرطان کبد سنتز و ارزیابی شد. کوپلیمر mPEG-PCL با موفقیت سنتز و صحت تشکیل آن توسط روش‌های مشخصه‌یابی FTIR و NMR ارزیابی شد. سپس، این کوپلیمرها در محیط آبی به صورت خودتجمعی میسل با ساختار پوسته-هسته تشکیل دادند. پلیمرزوم‌های تهیه شده از نظر غلظت بحرانی میسل شدن، اندازه و پتانسیل زتا بررسی شدند. پودوفیلوتوکسین به روش نانورسوبدهی درون هسته پلیمرزوم بارگذاری شد. اندازه ذرات میسل‌های PPT/mPEG-PCL 214 ± 20 نانومتر به دست آمد و این نانوحامل‌ها را قادر می‌سازد تا تومور را از طریق اثر EPR هدف قرار دهند. ظرفیت بارگذاری PPT در نانوذرات mPEG-PCL به حداکثر $1/23 \pm 77/36$ درصد رسید. پلیمرزوم‌های بارگذاری شده با دارو در مقایسه با داروی آزاد، پروفایل آزادسازی پایدار و طولانی مدت را نشان دادند. الگوی رهاسازی دارو از نانوذرات، رفتار پاسخگو به pH را نشان می‌دهد که منجر به انتشار سریع در محیط‌های اسیدی می‌شود. این ویژگی بهبود آزادسازی و تجمع PPT را در محل‌های تومور ارائه می‌دهد. آزمایش‌های زنده‌مانی سلولی اثر سمیت قابل توجهی را برای نانوذرات سنتز شده نشان ندادند، که نشان می‌دهد سامانه طراحی شده زیست‌سازگار هستند. علاوه

chemotherapy. *Natural Product Reports*, 2021. 38(3): p. 470-488.

[9]. Wu, Z., et al., Optimization on conditions of podophyllotoxin-loaded liposomes using response surface methodology and its activity on PC3 cells. *Journal of liposome research*, 2019. 29(2): p. 133-141.

[10]. Zhu, R., et al., Preparation, characterization, and anti-tumor property of podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles. *Nanotechnology*, 2009. 20(5): p. 055702.

[11]. Zhu, S., et al., PEGylated graphene oxide as a nanocarrier for podophyllotoxin. *Journal of nanoparticle research*, 2014. 16: p. 1-11.

[12]. Zhang, W., et al., Target analysis and mechanism of podophyllotoxin in the treatment of triple-negative breast cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 2020. 11: p. 1211.

[13]. Zhang, X., et al., Podophyllotoxin derivatives as an excellent anticancer aspirant for future chemotherapy: a key current imminent needs. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2018. 26(2): p. 340-355.

[14]. Motyka, S., et al., Podophyllotoxin and its derivatives: Potential anticancer agents of natural origin in cancer chemotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023. 158: p. 114145.

[15]. Wen, J., et al., GSH-responsive anti-mitotic cell penetrating peptide-linked podophyllotoxin conjugate for improving water solubility and targeted synergistic drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2019. 29(8): p. 1019-1022.

[16]. Jordan, M.A. and L. Wilson, Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature reviews cancer*, 2004. 4(4): p. 253-265.

[17]. Desbene, S. and S. Giorgi-Renault, Drugs that inhibit tubulin polymerization: the particular case of podophyllotoxin and analogues. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 2002. 2(1): p. 71-90.

[18]. Peyvand, P., et al., Imidazolium-based ionic liquid functionalized mesoporous silica nanoparticles as a promising nano-carrier: response surface strategy to investigate and optimize loading and release process for Lapatinib delivery. *Pharmaceutical development and technology*, 2020. 25(9): p. 1150-1161.

بر این، سنجش سمیت سلولی در شرایط آزمایشگاهی افزایش اثر سمیت نانوسامانه را در مقایسه با داروی آزاد نشان داد. نتایج ارائه شده از سنتز پلیمرزوم حاوی کوپلیمر mPEG-PCL با خاصیت زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری بالا، می تواند ادعای کاندید مناسبی برای تحویل داروی پودوفیلوتوکسین به سلول های سرطانی کبد باشد. با این حال، پیشنهاد می شود که مطالعات جذب سلولی در محیط آزمایشگاه نیز بررسی شود.

۵- منابع

[1] Mittal, S. and H.B. El-Serag, Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the population. *Journal of clinical gastroenterology*, 2013. 47: p. S2-S6.

[2] El-Serag, H.B., Hepatocellular carcinoma: an epidemiologic view. *Journal of clinical gastroenterology*, 2002. 35(5): p. S72-S78.

[3] Perz, J.F., et al., The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *Journal of hepatology*, 2006. 45(4): p. 529-538.

[4] Arzumanyan, A., H.M. Reis, and M.A. Feitelson, Pathogenic mechanisms in HBV-and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Cancer*, 2013. 13(2): p. 123-135.

[5] Mahafel, N., et al., Synergistic antibacterial effect of the pistachio green hull extract-loaded porphyrin decorated with 4-nitroimidazole against bacteria. *Journal of Liposome Research*, 2024: p. 1-14.

[6] Tohidlou, M., et al., Synthesis of nanoliposomes containing green tea Catechin and doxorubicin to evaluate its toxicity on breast cancer cells. *Modares Journal of Biotechnology*, 2020. 11(4): p. 29-42.

[7] Mortazavi, S.M.R., Z. Vaezi, and H. Naderi-Manesh, Synthesis of Cerosome nanoparticles and investigation of the stability and the release of loaded-Gallic acid as bioactive compound. *Modares Journal of Biotechnology*, 2023: p. 0-0.

[8] Zhao, W., et al., Challenges and potential for improving the druggability of podophyllotoxin-derived drugs in cancer

- 125b/miR-182 in human breast cancer cells. *Journal of cellular physiology*, 2019. 234(12): p. 22285-22298.
- [30] Nishiyama, N. and K. Kataoka, Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacology & therapeutics*, 2006. 112(3): p. 630-648.
- [31] Lee, J.S. and J. Feijen, Polymersomes for drug delivery: design, formation and characterization. *Journal of controlled release*, 2012. 161(2): p. 473-483.
- [32] Hu, Y., et al., Tumor targeted curcumin delivery by folate-modified MPEG-PCL self-assembly micelles for colorectal cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 2020: p. 1239-1252.
- [33] Gou, M., et al., Curcumin-loaded biodegradable polymeric micelles for colon cancer therapy in vitro and in vivo. *Nanoscale*, 2011. 3(4): p. 1558-1567.
- [34] Gou, M., et al., Poly (ϵ -caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly (ϵ -caprolactone)(PCL-PEG-PCL) nanoparticles for honokiol delivery in vitro. *International journal of pharmaceutics*, 2009. 375(1-2): p. 170-176.
- [35] Rostamizadeh, K., et al., Methotrexate-conjugated mPEG-PCL copolymers: a novel approach for dual triggered drug delivery. *New Journal of Chemistry*, 2018. 42(8): p. 5937-5945.
- [36] Isik, G., et al., Lithocholic acid conjugated mPEG-b-PCL micelles for pH responsive delivery to breast cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 2022. 621: p. 121779.
- [37] Peng, W., et al., Oral delivery of capsaicin using MPEG-PCL nanoparticles. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2015. 36(1): p. 139-148.
- [38] Tajik, E., et al., Grafting of sinapic acid onto glucosamine nanoparticle as a potential therapeutic drug with enhanced anti-inflammatory activities in osteoarthritis treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023. 253: p. 127454.
- [39] Manjili, H.K., et al., In vitro and in vivo delivery of artemisinin loaded PCL-PEG-PCL micelles and its pharmacokinetic study. [19] Ross, J.S., et al., Targeted therapies for cancer 2004. *American journal of clinical pathology*, 2004. 122(4): p. 598-609.
- [20] Mortazavi, S.M.R., et al., A novel cerasomal gallic acid as a non-ulcerogenic agent with an improved anti-inflammatory potential. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2023. 86: p. 104610.
- [21] Vaezi, Z., et al., Hemoglobin bio-adhesive nanoparticles as a colon-specific delivery system for sustained release of 5-aminosalicylic acid in the effective treatment of inflammatory bowel disease. *International Journal of Pharmaceutics*, 2022. 616: p. 121531.
- [22] Vaezi, Z., et al., Oral formulation of 5-aminosalicylic acid-Hemoglobin bio-adhesive nanoparticles enhance therapeutic efficiency in Ulcerative Colitis mice: A preclinical evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2024.
- [23] Yadav, R., et al., Encapsulation of podophyllotoxin and etoposide in biodegradable poly-D, L-lactide nanoparticles improved their anticancer activity. *Journal of microencapsulation*, 2014. 31(3): p. 211-219.
- [24] Niu, J., et al., L-Cysteine-Modified Transfersomes for Enhanced Epidermal Delivery of Podophyllotoxin. *Molecules*, 2023. 28(15): p. 5712.
- [25] Mansourian, M., et al., Cytotoxic Effect of Podophyllotoxin-Loaded Magnetic Nanoparticles on Proliferation of Colorectal (HT-29) and Breast (MCF-7) Cancer Cell Lines. *Current Nanomaterials*, 2023. 8(1): p. 82-89.
- [26] Haghshenas, V., et al., Encapsulation of docetaxel into Diblock polymeric polymersome as a nanodrug. *ChemistrySelect*, 2020. 5(29): p. 8924-8928.
- [27] Gou, M., et al., Self-assembled hydrophobic honokiol loaded MPEG-PCL diblock copolymer micelles. *Pharmaceutical research*, 2009. 26: p. 2164-2173.
- [28] Zhang, X.-y. and P.-y. Zhang, Polymersomes in nanomedicine-A review. *Current Nanoscience*, 2017. 13(2): p. 124-129.
- [29] Hossainzadeh, S., et al., Silibinin encapsulation in polymersome: A promising anticancer nanoparticle for inducing apoptosis and decreasing the expression level of miR-

and antimicrobial peptides: The case of killerFLIP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2020. 1862(2): p. 183107.

[45] Ouyang, J., et al., Doxorubicin-loading core-shell pectin nanocell: A novel nanovehicle for anticancer agent delivery with multidrug resistance reversal. *Plos one*, 2020. 15(6): p. e0235090.

[46] Huang, X., et al., In vitro antitumour activity of stearic acid-g-chitosan oligosaccharide polymeric micelles loading podophyllotoxin. *Journal of microencapsulation*, 2012. 29(1): p. 1-8.

[47] Nosrati, H., et al., Synthesis, characterization, and kinetic release study of methotrexate loaded mPEG-PCL polymersomes for inhibition of MCF-7 breast cancer cell line. *Pharmaceutical development and technology*, 2019. 24(1): p. 89-98.

Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 2018. 46(5): p. 926-936.

[40] Danafar, H., H. Jaberizadeh, and S. Andalib, In vitro and in vivo delivery of gliclazide loaded mPEG-PCL micelles and its kinetic release and solubility study. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2018. 46(8): p. 1625-1636.

[41] Carrillo-Castillo, T.D., et al., pH-responsive polymer micelles for methotrexate delivery at tumor microenvironments. *e-Polymers*, 2020. 20(1): p. 624-635.

[42] Karami, Z., et al., Naproxen conjugated mPEG-PCL micelles for dual triggered drug delivery. *Materials science and engineering: C*, 2016. 61: p. 665-673.

[43] Liu, J., et al., Self-assembly of phospholipid-analogous hyperbranched polymers nanomicelles for drug delivery. *Biomaterials*, 2010. 31(6): p. 1334-1341.

[44] Vaezi, Z., et al., Aggregation determines the selectivity of membrane-active anticancer

Synthesis of polymersome nanoparticles as carriers of podophyllotoxin bioactive compound with a proposed application against liver cancer

Parvaneh Peyvand¹, Zahra Vaezi², Hossein Naderi Manesh^{1*}

1. Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Department of Bioactive compounds, Faculty of Interdisciplinary Science and Technologies, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

naderman@modares.ac.ir

Receipt: 2024/06/13

Accepted: 2024/09/08

Abstract:

Hepatocellular carcinoma, predominant form of liver cancer, is the main cause of death in patients with liver cirrhosis. Podophyllotoxin, a natural anticancer compound, has ideal anti-tumor properties. However, its use is limited due to poor solubility and bioavailability. Finding a suitable drug delivery system have great importance in improving the bioavailability of podophyllotoxin. In this study, mPEG-PCL nanoparticles have been used for delivery of podophyllotoxin to liver cancer cells. mPEG-PCL copolymers were synthesized and characterized by DLS, FTIR and NMR analyses methods. The critical micellization concentration was 0.055 µg/ml. The z-average and surface charge of micelle was 186 ± 12 nm and -5.13 mV, respectively. Podophyllotoxin was loaded in micelles in different w/w ratios of drug: copolymer. The size of the nanodrug was 214 ± 20 nm and the weight ratio of 1:1 with encapsulation efficiency of 77.36 ± 1.23 % was selected as the optimal ratio. The drug release results showed a significant difference between the rapid release of free podophyllotoxin and the more stable release of the loaded drug. At 37°C, drug release was higher, which was attributed to the destruction of polymersome structure at this temperature. According to the cytotoxicity study, the IC₅₀ value for nanodrug (8.64 µg/ml) was lower than the IC₅₀ value for the free drug (12.79 µg/ml), which showed the effect of improved cytotoxicity of nanodrug compared to the free drug. The results proved the polymersome can be potential carriers for delivery, controllable release and improve the toxicity effect of podophyllotoxin in cancer chemotherapy.

Keyword: Liver cancer, Podophyllotoxin, mPEG-PCL copolymer, Polymersome, drug delivery