

## Synthesis of Ultrasound-Responsive Microbubbles Based on Polyethylene Glycol-*block*-Polycaprolactone Copolymer for Targeted Delivery of Doxorubicin

Hamed Abdipour, Farhang Abbasi\*

Faculty of Polymer Engineering, Institute of Polymeric Materials, Sahand University of Technology, Postal Code 5331817634, Tabriz, Iran

Received: 24 October 2024, accepted: 12 January 2025

### ABSTRACT

#### Keywords:

microbubble,  
ultrasound,  
cancer,  
drug delivery,  
perfluorohexane

**Hypothesis:** The development of drug delivery systems with high-dose capability and remote control is of great importance in the field of medicine. These systems show significant potential in improving therapeutic efficacy by increasing drug half-life and stability, optimizing drug dosage, and reducing side effects. Microbubbles (MBs) have been introduced as novel imaging agents and ultrasound-responsive drug carriers. These structures, consisting of a gas core enclosed in a shell, have the ability to deliver drugs in a targeted manner to the desired tissue. These unique features have made microbubbles a promising option for theranostic applications.

**Methods:** In this research, an ultrasound-responsive drug carrier was developed through the synthesis of microbubbles with a polymeric shell made of block copolymer poly(ethylene glycol) and polycaprolactone (PEG-*b*-PCL) and a perfluorohexane (PFH) core, capable of releasing its contents in response to ultrasound and temperature stimuli. The diblock copolymer PEG-*b*-PCL is biodegradable, biocompatible, amphiphilic, and at the same time, its polymerization method is relatively simple.

**Findings:** Optical microscopy results showed that the synthesized nanodroplets (NDs) are spherical and respond well to ultrasound. The stability of the particles and their size distribution were examined by dynamic light scattering (DLS). Finally, doxorubicin hydrochloride (DOX), as a model drug, was successfully loaded onto the particles, achieving encapsulation efficiencies of 98.4% for the shell, where the drug was predominantly confined, and 95.84% for the particles, reflecting an overall high loading capacity throughout the structure. Additionally, drug release and its responsiveness to ultrasound were investigated. The results indicated that the particles were ultrasound-responsive, and drug release increased significantly during ultrasound exposure, making this drug carrier an ideal candidate for use as a theranostic agent in cancer treatment.

(\*)To whom correspondence should be addressed.

E-mail: f.abbasi@sut.ac.ir

#### Please cite this article using:

Abdipour H., Abbasi F., Synthesis of Ultrasound-Responsive Microbubbles Based on Polyethylene Glycol-*block*-Polycaprolactone Copolymer for Targeted Delivery of Doxorubicin, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **37**, 287-300, 2024.

# سنتز ریزحباب‌های پاسخگو به فراصوت بر پایه کوپلیمر دوقطعه‌ای پلی (اتیلن گلیکول) و پلی کاپرولاکتون برای دارورسانی هدفمند دوکسوروبیسین

حامد عبدی پور، فرهنگ عباسی\*

تبریز، دانشگاه صنعتی سهند، پژوهشکده مواد پلیمری، دانشکده مهندسی پلیمر، کد پستی ۵۳۳۱۸۱۷۶۳۴

دریافت: ۱۴۰۳/۸/۳، پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۳

## چکیده

**فرضیه:** توسعه سامانه‌های حامل دارو با قابلیت دارورسانی با دُز و کنترل از راه دور، اهمیت بسزایی در حوزه پزشکی دارد. این سامانه‌ها با افزایش نیمه عمر و پایداری دارو، بهینه‌سازی مقدار مصرف دارو و کاهش عوارض جانبی، ظرفیت شایان توجهی در بهبود اثربخشی درمانی نشان می‌دهند. ریزحباب‌ها به عنوان عوامل تصویربرداری نوین و حامل‌های دارویی پاسخگو به محرک فراصوت مطرح شده‌اند. این ساختارها، شامل یک هسته گازی محصور در یک پوسته، قابلیت انتقال هدفمند دارو به بافت مدنظر را دارند. این ویژگی‌های منحصربه‌فرد، ریزحباب‌ها را به گزینه امیدوارکننده‌ای در کاربردهای تشخیصی-درمانی (theranostic) تبدیل کرده است.

**روش‌ها:** در پژوهش حاضر، یک حامل داروی پاسخگو به فراصوت از سنتز ریزحباب‌های با پوسته پلیمری متشکل از کوپلیمر دوقطعه‌ای پلی (اتیلن گلیکول) و پلی کاپرولاکتون (PEG-*b*-PCL) و هسته پرفلوئورو هگزان (PFH) توسعه داده شد که قابلیت آزادسازی محتوای خود را با محرک فراصوت دارد. کوپلیمر دوقطعه‌ای PEG-*b*-PCL زیست‌تخریب‌پذیر، زیست‌سازگار و دوگانه‌دوست است که با روش پلیمرشدن نسبتاً ساده‌ای نیز به دست می‌آید.

**یافته‌ها:** نتایج میکروسکوپی نوری نشان داد، نانوقطره‌ها سنتز شده کروی هستند و نسبت به فراصوت به خوبی پاسخ می‌دهند. پایداری ذرات و توزیع اندازه ذرات با آزمون پراکندگی دینامیکی نور بررسی شد. در نهایت، داروی دوکسوروبیسین هیدروکلرید به عنوان داروی مدل، روی ذرات با موفقیت بارگذاری شد و بازدهی کپسول‌دار شدن ۹۸/۴٪ برای پوسته و ۹۵/۸۴٪ برای ذرات به دست آمد. همچنین، رهایش دارو و پاسخگویی رهایش دارو به فراصوت بررسی شد. نتایج نشان داد، ذرات پاسخگو به فراصوت هستند و رهایش دارو طی استفاده از فراصوت، افزایش چشمگیری دارد که این حامل دارو را گزینه ایده‌آلی به عنوان عامل تشخیصی-درمانی در بیماری سرطان مطرح می‌کند.

## واژه‌های کلیدی

ریزحباب،  
فراصوت،  
سرطان،  
دارورسانی،  
پرفلوئورو هگزان

\* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:

f.abbasi@sut.ac.ir

## مقدمه

سرطان یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر جهانی است. با پیشرفت دانش و فناوری، روش‌های درمانی متعددی مانند پرتودرمانی، جراحی و شیمی‌درمانی توسعه یافته‌اند [۱،۲]. با وجود پیشرفت‌ها در حوزه شیمی‌درمانی، سمیت سامانمند آن به دلیل عملکرد غیراختصاصی، چالش‌برانگیز است. بنابراین، توسعه سامانه‌های دارورسانی هدفمند برای غلبه بر این محدودیت در درمان سرطان اهمیت ویژه‌ای دارد [۳]. دوکسوروبیسین (doxorubicin, DOX) یکی از داروهای متداول ضدسرطان است که از راه مهار تشکیل نوکلئیک اسیدها عمل می‌کند. این دارو در درمان انواع مختلف سرطان استفاده می‌شود، اما سمیت آن برای بافت‌های سالم همچنان مشکل‌ساز است [۴].

نانوحامل‌ها یکی از سامانه‌هایی هستند که توانسته‌اند کیفیت دارورسانی را به‌طور چشمگیری بهبود بخشند. مزایای استفاده از این نانوحامل‌ها عبارت‌اند از: کاهش عوارض جانبی داروهای ضدسرطان، افزایش اثربخشی و شاخص درمانی و رهایش کنترل‌شده دارو در محل تومور. انواع نانوحامل‌ها شامل نانوذرات پلیمری [۵]، میکروژل‌ها [۶]، لیپوزوم‌ها [۷]، نانوامولسیون‌ها [۸] و ریزحباب‌ها [۹] هستند. برخی از این سامانه‌ها وارد بازار دارویی شده‌اند و بسیاری دیگر در مراحل پیش‌بالینی هستند. همچنین، نانوذرات جدید در حل مشکل مقاومت یاخته‌ای به دارو موفق بوده‌اند و افق‌های جدیدی را در درمان سرطان گشوده‌اند.

ریزحباب‌ها در ترکیب با امواج فراصوت، روشی نوآورانه برای دارورسانی هدفمند در درمان سرطان هستند. این ذرات میکروسکوپی با پوسته لیپیدی یا پلیمری و هسته گازی (معمولاً پرفلوئوروکربن یا گوگرد هگزافلوئورید)، افزون بر کاربرد در تصویربرداری، به عنوان حامل‌های دارویی هوشمند عمل می‌کنند [۱۰]. وقتی ریزحباب‌ها در معرض امواج فراصوت قرار می‌گیرند، شروع به نوسان، انبساط و انقباض می‌کنند که پدیده حفره‌زایی نامیده می‌شود. بسته به شدت امواج فراصوت، دو نوع حفره‌زایی لختی (inertial cavitation) و پایدار (stable cavitation) رخ می‌دهد که به رهایش کنترل‌شده دارو منجر می‌شود [۱۱]. ریزحباب‌ها قابلیت بارگذاری گسترده‌ای از عوامل درمانی را دارند، از جمله داروهای شیمی‌درمانی، نانوذرات، پپتیدها، پروتئین‌ها و مواد ژنتیکی. این تنوع امکان طراحی درمان‌های شخصی‌سازی شده برای انواع مختلف سرطان را فراهم می‌کند. پیشرفت‌های اخیر در مهندسی سطح ریزحباب‌ها، امکان اتصال لیگاندهای اختصاصی مانند پادتن‌ها یا پپتیدها را به سطح آن‌ها ایجاد کرده است. این فرایند هدف‌گیری فعال، تجمع ریزحباب‌ها در بافت تومور را افزایش می‌دهد و اثربخشی درمان را بهبود می‌بخشد [۱۲].

کویلیمرهای دوقطعه‌ای به دلیل ترکیب خواص مطلوب پلیمرهای مختلف، در ساخت ریزحباب‌ها توجه ویژه‌ای را جلب کرده‌اند. پلی(اتیلن گلیکول) (PEG) آب‌دوست، به کمک سامانه رتیکولوندوتلیال (reticuloendothelia) از بیگانه‌خواری (phagocytosis) جلوگیری می‌کند و زمان گردش در بدن را افزایش می‌دهد. کویلیمر دو محیط‌دوست PEG-*b*-PCL پلی‌کاپرولاکتون (PEG-*b*-PCL) در بارگذاری مؤثر داروها، افزایش ماندگاری در بدن و رهایش کنترل‌شده مناسب است. PEG-*b*-PCL غیرسمی است، در داخل بدن تجمع نمی‌یابد و نیز محصولات تجزیه می‌توانند وارد چرخه اسید تری‌کربوکسیلیک شده یا از راه کلیه‌ها دفع شوند [۱۳-۱۶].

Gramiak و Shah ریزحباب‌ها را اولین بار در ۱۹۶۸ میلادی توسعه دادند. مشکل اصلی ریزحباب‌ها، عمر کوتاه نگه‌داری، پایداری کم و سمیت زیاد است. برای بهبود پایداری و اندازه بهینه، پژوهشگران ریزحباب‌های با طول عمر بیشتر را به کمک هسته گازی با استفاده از موادی مانند عامل سطح فعال، گالاتوز، لیپید و با هسته گازی هوا، کربن دی‌اکسید و گازهایی با حل‌پذیری کمتر مانند SF<sub>6</sub> یا پرفلوئوروکربن تهیه کردند. افزایش پایداری مواد کپسول‌دار شده به عنوان برتری پرفلوئوروکربن‌ها نسبت به هوا و نیتروژن تلقی می‌شود [۱۷].

باغبانی و همکاران [۱۸]، نانوقطره‌های پرفلوئوروهگزان (PFH) پایدار شده با آلزینات دارای داروی DOX را با روش نانوامولسیون سنتز کردند. سپس، خواص پاسخگویی به امواج فراصوت، تصویربرداری و درمانی این نانوقطره‌ها را بررسی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد، در شرایطی که pH محلول در حالت خنثی (۷/۴) قرار داشت، رهایش دارو از نانوقطره‌ها بسیار کنترل‌شده و آهسته بود، به‌طوری‌که پس از زمان ۲۴ h، فقط حدود ۱۲/۶٪ از داروی بارگذاری شده آزاد شد. نکته شایان توجه این بود که با اعمال فراصوت (۲۸ kHz به مدت ۱۰ min)، رهایش دارو به‌طور چشمگیری افزایش یافت و به حدود ۸۵/۹۵٪ رسید. این نتیجه نشان می‌دهد، فراصوت می‌تواند به عنوان محرک خارجی در رهایش سریع و کنترل‌شده دارو در محل مدنظر عمل کند. منجیلی و همکاران [۱۹] دارورسانی و داروجنبش‌شناسی (pharmacokinetics) کورکومین را با استفاده از میسل‌های کویلیمر دوقطعه‌ای PEG-*b*-PCL بررسی کردند.

مطالعات پیشین در زمینه سامانه‌های دارورسانی، با وجود دستاوردهای شایان توجه، با محدودیت‌هایی مواجه بوده‌اند. نانوقطره‌های PFH پایدار شده با آلزینات، اگرچه زیست‌سازگاری مطلوبی دارند، اما در زمینه پایداری بلندمدت با چالش‌هایی روبه‌رو هستند. از سوی دیگر، میسل‌های PEG-*b*-PCL که در بارگذاری و رهایش دارو استفاده شده‌اند، فاقد سازوکار پاسخگویی به محرک‌های

در خلأ خالص‌سازی شد. تولوئن از شرکت ACROS تهیه شد. سپس، به‌منظور حذف رطوبت درون ظرفی به‌مدت ۲۴ h به همراه کلسیم هیدرید نگهداری شد. پس از آن، فرایند تقطیر در دمای  $^{\circ}\text{C}$  ۱۰۰ انجام شد تا حلال خشک حاصل شود. این روش آماده‌سازی برای اطمینان از خلوص زیاد تولوئن مصرفی در آزمایش‌های بعدی انجام شد. پرفلوئورو هگزان از شرکت Alfa Aesar، پلی‌سوربات ۸۰ (Tween 80) و قلع اکتانوات از شرکت Merck، دی‌کلرومتان، نرمال هگزان، پلی(وینیل الکل) و دی‌اتیل اتر از شرکت Merck خریداری شده و بدون خلوص‌سازی اضافی استفاده شدند. بافر نمکی فسفاتی (phosphate buffered saline, PBS) با  $\text{pH}=7.4$  از شرکت Sigma تهیه شد. DOX استفاده‌شده از شرکت Pfizer خریداری شد.

### دستگاه‌ها

در این پژوهش، از دستگاه پراکندگی نور دینامیکی (DLS) مدل Nano ZS ZEN 3600 ساخت شرکت Malvern انگلستان برای تعیین پتانسیل زتا، توزیع و اندازه ذرات بهره گرفته شد. در طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته ( $^1\text{H-NMR}$ ) از طیف‌سنج AVANCE III، ۳۰۰ MHz، شرکت Bruker آلمان استفاده شد. از کلروفرم دوتریم‌دار به‌عنوان حلال استفاده شد. در طیف‌سنجی زیرقرمز انتقال فوری (FTIR) از طیف‌سنج مدل Tensor27 ساخت شرکت Bruker آلمان در محدوده عدد موجی  $\text{cm}^{-1}$  ۴۰۰۰-۴۰۰ استفاده شد. طیف‌سنج مرئی و فابنش مدل C-7100S ساخت شرکت Peak نیز در محدوده طول موج nm ۱۹۰ تا nm ۱۱۰۰ به‌کار گرفته شد. برای تبدیل نانوذرات به ریزحباب‌ها، از دستگاه فراصوت با بسامد ۱/۷ MHz و توان تنظیم‌پذیر (حداکثر ۳۰ W) ساخته‌شده در دانشگاه صنعتی سهند و نیز دستگاه SONOSwiss SW 1H با بسامد ۶۰-۵۰ Hz و توان ۹۰ W ساخت شرکت Sonoswiss AG سوئیس استفاده شد. مشاهده و تصویربرداری از ذرات تشکیل‌شده در امولسیون و ریزحباب‌ها با میکروسکوپ نوری مدل FLUO-3 ساخت شرکت BEL ایتالیا انجام شد.

### روش‌ها

#### سنتز کوپلیمر دوقطعه‌ای PEG-b-PCL

سنتز کوپلیمر دوقطعه‌ای PEG-b-PCL با اصلاحاتی جزئی براساس شیوه گزارش‌شده در مرجع [۲۰] انجام شد. ابتدا، ۱/۵ g از mPEG با وزن مولکولی متوسط  $\text{g/mol}$  ۲۰۰۰ به درون بالنی دو دهانه منتقل شد. بالن در دمای  $^{\circ}\text{C}$  ۸۰ تحت همزدن ملایم قرار گرفت و به‌مدت ۳۰ min در خلأ قرار گرفت تا رطوبت احتمالی محتویات آن حذف

خارجی هستند که امکان کنترل دقیق رهایش دارو را محدود می‌سازد. پژوهش حاضر با هدف رفع این محدودیت‌ها، سامانه نوینی از ریزحباب‌های پاسخگو به فراصوت با پوسته PEG-b-PCL و هسته PFH را معرفی می‌کند. این سامانه با بهره‌گیری از کوپلیمر PEG-b-PCL، پایداری ریزحباب‌ها را به‌طور چشمگیری افزایش می‌دهد و امکان طراحی دقیق‌تر نمودار (profile) رهایش دارو را فراهم می‌آورد. افزون بر این، قابلیت پاسخگویی به محرک فراصوت، سازوکار کنترل دوگانه‌ای را برای رهایش دارو فراهم می‌آورد. ترکیب این ویژگی‌ها، امکان استفاده هم‌زمان از این سامانه را در تصویربرداری، هدف‌گیری بافتی و رهایش کنترل‌شده دارو میسر ساخته است و ضمن رفع محدودیت‌های موجود در سامانه‌های پیشین، قابلیت‌های زیادی را در ارتقای کارایی سامانه‌های تحویل دارو و تصویربرداری پزشکی ارائه می‌دهد.

انتخاب کوپلیمر PEG-b-PCL به‌دلیل خواص زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری و دوگانه‌دوستی آن است. افزون بر این، روش پلیمرشدن نسبتاً ساده این کوپلیمر، آن را به گزینه مناسبی برای این کاربرد تبدیل کرده است. استفاده از PFH به‌عنوان ماده هسته، به‌دلیل افزایش پایداری ریزحباب‌های تولیدشده و قابلیت تغییر فاز آن در پاسخ به محرک‌های خارجی مانند فراصوت و گرماست. هدف اصلی این پژوهش، توسعه و بهینه‌سازی یک سامانه دارورسانی هدفمند و پاسخگو به محرک فراصوت است. این سامانه بر پایه ریزحباب‌های پلیمری با ساختار هسته-پوسته طراحی شده است. پوسته از کوپلیمر دوقطعه‌ای PEG-b-PCL تشکیل شده، در حالی که هسته دارای PFH است. در این مطالعه، از داروی دوکسوروبیسین هیدروکلرید (DOX)، برای ارزیابی کارایی جامع سامانه در دارورسانی هدفمند استفاده شده است. این رویکرد نوآورانه می‌تواند قابلیت‌های زیادی در بهبود اثربخشی درمان‌های دارویی، به‌ویژه در زمینه درمان سرطان، داشته باشد. با کنترل دقیق رهایش دارو در پاسخ به محرک خارجی، این سامانه می‌تواند به کاهش عوارض جانبی و افزایش اثربخشی درمان کمک کند.

### تجربی

#### مواد

مونومر E-کاپرولاکتون از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد و پیش از استفاده به‌مدت ۴۸ h همراه کلسیم هیدرید ( $\text{CaH}_2$ ) تحت بازروانی قرار گرفت، سپس در خلأ تقطیر شد. پلی(اتیلن گلیکول) مونومتیل اتر (mPEG) به‌عنوان درشت‌آغازگر از شرکت Sigma خریداری شد و پیش از پلیمرشدن با تقطیر همجوش و خشک‌کردن

سوراخ‌دار پوشانده شد و همزدن به مدت ۳۰ min دیگر ادامه یافت تا فرایند تبخیر حلال و تشکیل نانوذرات کامل شود.

#### تبدیل نانوامولسیون به ریز حباب با تغییر فاز

برای تبدیل نانوامولسیون‌های دارای PFH به ریز حباب‌ها، ضروری است که هسته مایع PFH به فاز گازی تغییر حالت دهد. این تغییر فاز با فراصوت‌دهی بررسی شد. در روش فراصوت‌دهی، نمونه‌ها در معرض تابش امواج فراصوت با شدت  $3/22 \text{ W/cm}$  قرار گرفتند. مدت زمان تابش در چهار بازه زمانی ۲، ۴، ۱۰ و ۲۰ min تنظیم شد. تصویربرداری میکروسکوپی نوری در هر بازه زمانی انجام شد تا دینامیک تشکیل ریز حباب‌ها مطالعه شد. هم‌زمان، تغییرات دمایی محلول نیز به‌منظور بررسی آثار گرمایی ناشی از تابش فراصوت، ثبت و تحلیل شد.

#### بارگذاری داروی دوکسوروبیسین هیدروکلرید

برای بارگذاری دارو در نانوحامل‌های پلیمری، از روش نانورسوب‌دهی اصلاح‌شده استفاده شد. ابتدا، ۱۰۰ mg از  $\text{PEG-b-PCL}$  سنتز شده در ۴ mL دی‌کلرومتان حل شد. سپس، ۵ mL محلول آبی DOX با غلظت  $2 \text{ mg/mL}$  به فاز آلی اضافه شد. این سامانه دو فاز به مدت ۴۸ h در دمای محیط و در شرایط تاریکی تحت همزدن مداوم قرار گرفت تا امولسیون پایدار به‌دست آید. در مرحله بعد، برای حذف حلال‌های آلی و آبی و القای فرایند خودتجمعی، محلول حاصل به یک کیسه دیالیز از جنس سلولوز (برش ۳۵۰۰ Da) منتقل شد و به مدت ۴۸ h در مقابل آب یون‌زدوده که به‌طور مرتب تعویض می‌شد، دیالیز شد [۲۱]. پس از اتمام فرایند دیالیز، تعلیق حاصل تحت مرکزگریزی (با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۳ min) قرار گرفت تا نانوذرات پلیمری دارای دارو از محلول جدا شوند. فاز رویی حذف شد و رسوب حاصل که شامل نانوذرات  $\text{PEG-b-PCL}$  دارای DOX بود، به‌عنوان پیش‌ماده برای تولید ریز حباب‌های دارورسان استفاده شد. این روش براساس روش نانورسوب‌دهی و خودتجمعی کوپلیمرهای دوگانه‌دوست است. در این روش، حذف تدریجی حلال‌ها از راه دیالیز به تشکیل نانوذرات پلیمری منجر می‌شود که قابلیت حبس کردن داروی آب‌گریز را در هسته خود دارد. این نانوذرات بارگذاری‌شده با دارو می‌توانند به‌عنوان پایه‌ای در تولید سامانه‌های ریز حبابی دارورسان استفاده شوند.

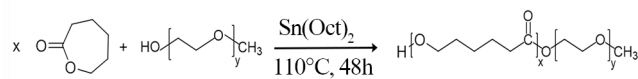
#### رسم منحنی کالیبره کردن

برای تعیین منحنی کالیبره کردن، محلول‌های استاندارد با غلظت‌های متفاوت از دارو تهیه می‌شوند. بدین منظور، ابتدا، محلول DOX با

شود. سپس، ۱/۵ g از مونومر E-کاپرولاکتون به مخلوط واکنش اضافه شد. محیط واکنش با تزریق گاز نیتروژن به مدت ۳۰ min اکسیژن‌زدایی شد. پس از درزبندی کامل، بالن درون حمام روغن  $110^\circ\text{C}$  قرار گرفت و تحت همزدن مغناطیسی نگه داشته شد تا به دمای مدنظر برسد. کاتالیزگر قلع اکتانوات (II) (۱٪ وزنی نسبت به مونومر E-کاپرولاکتون) در ۱ mL تولوئن خشک حل شد و به مخلوط واکنش تزریق شد. واکنش پلیمرشدن به مدت ۴۸ h در شرایط دما و سرعت همزدن ثابت ادامه یافت. پس از اتمام واکنش پلیمرشدن، نمونه از حمام روغن خارج شده و به دمای محیط رسانده شد. محلول لیمویی‌رنگ حاصل، با دی‌کلرومتان مخلوط شد. در این مرحله، مونومرهای کاپرولاکتون واکنش نداده به شکل فاز روغن‌مانند جداسازی می‌شوند. جداسازی و خالص‌سازی پلیمر با افزودن نرمال هگزان سرد شده با نیتروژن ادامه یافت که موجب ایجاد سامانه‌ای دوفازی برای حذف پلی(اتیلن گلیکول)‌های واکنش‌نداده شد. در مرحله بعدی، دی‌اتیل‌اتر سرد شده (با نیتروژن مایع) به محلول اضافه شد که طی آن کوپلیمر  $\text{PEG-b-PCL}$  به حالت رسوب سفیدرنگ ته‌نشین شد. سپس، رسوب جداسازی شده و درون گرم‌خانه خلأ با دمای  $60^\circ\text{C}$  به مدت ۱۸ h کاملاً خشک شد. در شکل ۱ سازوکار پلیمرشدن حلقه‌گشا در سنتز کوپلیمر دوقطعه‌ای  $\text{PEG-b-PCL}$  نشان داده شده است.

#### تهیه نانوامولسیون‌های پلیمری $\text{PEG-b-PCL}$ با هسته PFH

در این شیوه، نانوحامل‌های پلیمری دارای PFH با روش امولسیون دوگانه سنتز شدند. ابتدا، ۱۵۰ mg از کوپلیمرهای دوقطعه‌ای سنتز شده در ۱ mL دی‌کلرومتان حل شد. سپس، در شرایط همزدن مداوم، حدود ۴۰٪ از حلال تبخیر شد تا غلظت محلول پلیمری افزایش یابد. در مرحله بعد، یک قطره از ماده سطح‌فعال Tween 80 به محلول اضافه شد و در شرایط همزدن با سرعت زیاد به مدت ۵ min قرار گرفت. سپس، محلول درون حمام آب و یخ قرار داده شد و  $150 \mu\text{m}$  از PFH به آن افزوده شد. سامانه به مدت ۱ h تحت همزدن مداوم قرار گرفت تا PFH درون قطره‌های پلیمری محبوس شود. در مرحله نهایی، ۲ mL از محلول ۱٪ وزنی پلی(وینیل الکل) به‌عنوان پایدارکننده به سامانه اضافه شد. ظرف واکنش با فویل آلومینیومی



شکل ۱- پلیمرشدن کوپلیمر دوقطعه‌ای  $\text{PEG-b-PCL}$ .

Fig. 1. Polymerization of  $\text{PEG-b-PCL}$  diblock copolymer.



پس از هر مرحله نمونه‌برداری و اندازه‌گیری، نمونه‌ها دوباره در معرض تابش امواج فراصوت قرار گرفتند و به درون گرم‌خانه بازگردانده شدند تا چرخه رهایش دارو ادامه یابد. این شیوه امکان ارزیابی کمی نمودار رهایش دارو از نانوحامل‌های پلیمری را با فراصوت‌دهی فراهم می‌آورد. این روش می‌تواند به درک بهتر سازوکارهای رهایش کنترل‌شده دارو از سامانه‌های نوین دارورسانی پاسخگو به محرک کمک کند و در طراحی و بهینه‌سازی فرمول‌بندی‌های دارویی پیشرفته استفاده شود.

نمودار رهایش دارو برای دو نمونه با کدهای ۷/۴ US و ۷/۴ NUS که US و NUS به ترتیب نشان‌دهنده اعمال و عدم اعمال امواج فراصوت بوده و عدد ۷/۴ بیانگر pH نمونه‌هاست، در دمای ۳۷ °C و بازه‌های زمانی ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۷، ۲۴ و ۴۸ h بررسی شد. در هر نقطه زمانی، ۲ mL از محلول بافر دارای داروی آزادشده از میکرولوله‌ها برداشته شد و با همان حجم از محلول بافر تازه جایگزین شد. سپس، متناسب با نوع نمونه، امواج فراصوت با شدت کم اعمال شد. مقدار رهایش دارو با طیف‌نورسنجی UV-Vis در طول موج ۴۸۱ nm به کمک معادله (۳) تعیین شد [۲۴]:

$$\text{درصد تجمعی داروی رهاشده} = \frac{C_i V_t + \sum C_{i-1} - V_i}{t} \times 100 \quad (3)$$

در این معادله،  $V_t$ ، کل حجم محلول رهایش؛  $V_i$ ، حجم نمونه؛  $C_i$ ، غلظت دارو در محلول در زمان  $t$  و  $t_i$ ، جرم کل دارو است.

## نتایج و بحث

### بررسی سنتز کوپلیمر دوقطعه‌ای PEG-b-PCL

به منظور تأیید ساختار شیمیایی و درستی سنتز کوپلیمر دوقطعه‌ای PEG-b-PCL، آزمون FTIR انجام شد. طیف FTIR (شکل ۲) شامل نوارهای جذبی مشخصه‌ای است که ساختار مولکولی کوپلیمر را تأیید می‌کند. نوار جذبی قوی در ناحیه  $1725 \text{ cm}^{-1}$  به ارتعاش‌های کششی پیوند  $\text{C=O}$  گروه کربونیل استری مربوط است که وجود واحدهای کاپرولاکتون را در ساختار پلیمر تأیید می‌کند. افزون بر این، دو نوار جذبی مشخصه در نواحی  $1110$  و  $1244 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب ناشی از ارتعاش‌های کششی پیوندهای  $\text{C-O-C}$  و  $\text{-COO-}$  هستند که از ویژگی‌های ساختاری کوپلیمرهای PEG-b-PCL به شمار می‌آید. ارتعاش‌های کششی مربوط به پیوندهای  $\text{C-H}$  در محدوده  $2985-2995 \text{ cm}^{-1}$  متمرکز شده‌اند که با ساختار شیمیایی مورد انتظار

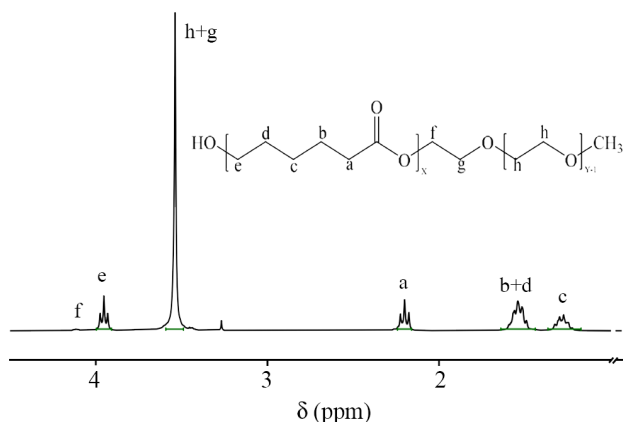
غلظت ۵۰ ppm درون بافر با  $\text{pH}=7/4$  آماده شد. سپس، با رقیق‌سازی این محلول با استفاده از معادله  $M_1 V_1 = M_2 V_2$ ، محلول‌های استاندارد ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ ppm آماده شدند. جذب نوری هر یک از استانداردها با طیف‌نورسنج UV-Vis در طول موج جذب حداکثر ( $\lambda_{\text{max}}=481 \text{ nm}$ ) اندازه‌گیری شد (آزمون جذب نوری هر یک از نمونه‌های استاندارد سه مرتبه تکرار شد). پس از جمع‌آوری داده‌های جذب نوری، نمودار کالیبره کردن به صورت تغییرات جذب نوری برحسب غلظت رسم شد. این نمودار امکان تعیین رابطه خطی بین غلظت و جذب نوری را فراهم می‌آورد و می‌تواند برای محاسبه غلظت‌های مجهول استفاده شود [۲۲]. پس از رسم منحنی کالیبره کردن DOX در بافر با  $\text{pH}=7/4$ ، پس از بارگذاری دارو روی میسل‌های پلیمری با استفاده از روش دیالیز و نیز پس از سنتز ریزحباب‌ها، تعلیق حاصل در فرایند مرکزگریز قرار گرفت تا داروی آزاد و بارگذاری‌نشده جداسازی شود. برای تعیین کمی بازده بارگذاری دارو در میسل‌ها، غلظت داروی بارگذاری‌نشده به کمک طیف‌نورسنجی UV-Vis در طول موج ۴۸۱ nm اندازه‌گیری شد (آزمون جذب نوری هر یک از نمونه‌های استاندارد سه مرتبه تکرار شد). مقادیر جذب به دست آمده در معادله خطی حاصل از منحنی کالیبره کردن قرار داده شد تا غلظت دارو محاسبه شود. بازده کپسول‌دار کردن دارو از معادله‌های زیر محاسبه شد [۲۳]:

$$(1) \quad 100 \times \text{کل دارو/مقدار داروی بارگذاری شده} = \text{بازده کپسول‌دار کردن}$$

$$(2) \quad \text{داروی بارگذاری نشده} - \text{کل دارو} = \text{مقدار داروی بارگذاری شده}$$

### رهایش دارو در محیط برونتنی

محلول ۲۵۰  $\mu\text{L}$  از نانوامولسیون کوپلیمر دوقطعه‌ای با هسته PHF در چهار میکرولوله مجزا توزیع و در فرایند مرکزگریز قرار گرفتند. محلول بالایی حاصل برای تعیین کمی بازده بارگذاری دارو جداسازی شد. رسوب باقی‌مانده در بافر با  $\text{pH}=7/4$  دوباره پراکنده شد. برای القای رهایش دارو، نمونه‌ها در فواصل زمانی مشخص در معرض تابش امواج فراصوت با شدت  $3/2 \text{ W/cm}^2$  قرار گرفتند. آزمایش رهایش دارو در شرایط فیزیولوژیکی شبیه‌سازی شده ( $37^\circ \text{C}$ ) درون گرم‌خانه (incubator) انجام شد. در فواصل زمانی از پیش تعیین‌شده، نمونه‌ها در فرایند مرکزگریز قرار گرفتند و بخش رویی برای آزمون طیف‌نورسنجی UV-Vis در طول موج جذب حداکثر دارو ( $\lambda_{\text{max}}=481 \text{ nm}$ ) جمع‌آوری شد. پس از هر نمونه‌برداری، حجم مساوی از بافر تازه جایگزین شد.



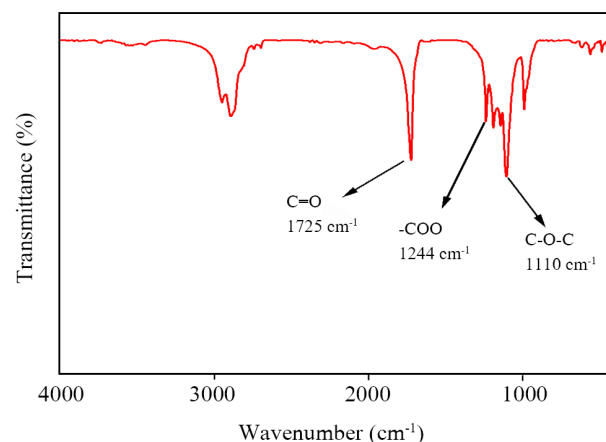
شکل ۳- طیف  $^1\text{H-NMR}$  مربوط به PEG-*b*-PCL سنتز شده.

Fig. 3.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the synthesized PEG-*b*-PCL.

تعداد پروتون‌های موجود در زنجیر PEG (با ضرب تعداد واحدهای تکرارشونده در تعداد هیدروژن‌های هر واحد)، ساختار مولکولی تعیین شد. در مرحله بعد، با استفاده از داده‌های طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته و مقایسه مساحت پیک‌های مربوط به پروتون‌های مختلف، تعداد واحدهای پلی‌کاپرولاکتون متصل به زنجیر PEG محاسبه شد. در نهایت، با ضرب تعداد واحدهای کاپرولاکتون در وزن مولکولی هر واحد، وزن مولکولی کل کوپلیمر محاسبه شد. وزن مولکولی کوپلیمر سنتزی محاسبه شده با آزمون  $^1\text{H-NMR}$ ، ۳۸۸۰ g/mol به دست آمد.

### شکل‌شناسی نانوذرات سنتز شده

شکل‌شناسی و خواص فیزیکی ذرات سنتزی به کمک میکروسکوپی نوری ارزیابی شد. تصاویر میکروسکوپی نوری (شکل ۴) نشان داد، ذرات سنتزی شکل‌شناسی کروی داشته و توزیع اندازه نسبتاً باریکی در محدوده ۵  $\mu\text{m}$  تا ۴۰  $\mu\text{m}$  دارند. گفتنی است، به دلیل محدودیت‌های ذاتی میکروسکوپی نوری در تفکیک ذرات نانومتری، آزمون DLS به عنوان روشی مکمل برای ارزیابی دقیق‌تر توزیع اندازه ذرات ضروری است. برای مشاهده تشکیل ریزحباب‌ها، نمونه تحت میکروسکوپ نوری گرما داده شد تا تغییر فاز PFH از مایع به گاز در هسته ذرات رخ دهد. تصاویر میکروسکوپی حاصل نشان داد، ریزحباب‌های تشکیل شده نیز شکل‌شناسی کروی داشته، اما ابعاد آن‌ها به طور شایان توجهی بزرگ‌تر از ذرات اولیه است، در حالی که توزیع اندازه آن‌ها همچنان باریک باقی مانده است. مشاهدات دینامیکی نشان داد، با افزایش تدریجی دما، ابتدا اندازه ذرات افزایش می‌یابد و تعداد محدودی از آن‌ها به ریزحباب تبدیل می‌شوند. شایان ذکر است، میکروسکوپ الکترونی پویشی گسیل میدانی (FE-SEM)



شکل ۲- طیف FTIR مربوط به PEG-*b*-PCL سنتز شده.

Fig. 2. FTIR spectrum of the synthesized PEG-*b*-PCL.

مطابقت دارد [۲۵،۲۶]. مجموعه یافته‌های طیف‌سنجی FTIR، سنتز موفقیت‌آمیز کوپلیمر دوقطعه‌ای PEG-*b*-PCL را تأیید می‌کند و صحت فرایند پلیمرشدن را نشان می‌دهد. این آزمون ساختاری، اطلاعات ارزشمندی را درباره ترکیب شیمیایی و پیوندهای مولکولی کوپلیمر سنتز شده ارائه می‌دهد.

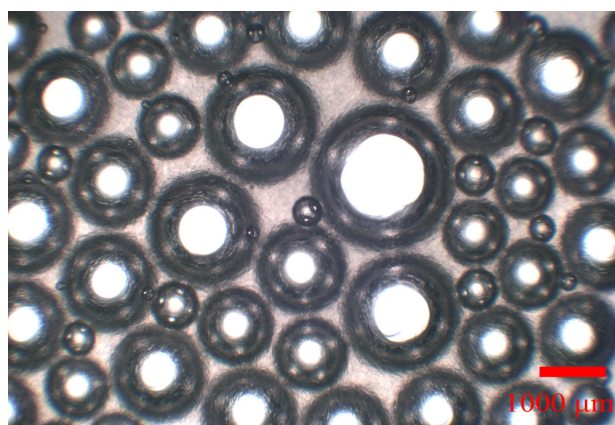
### طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته

طیف رزونانس مغناطیسی هسته مربوط به کوپلیمر دوقطعه‌ای PEG-*b*-PCL در شکل ۳ نشان داده شده است. این طیف دارای پیک‌های مشخصه‌ای است که ساختار شیمیایی و ترکیب کوپلیمر را تأیید می‌کند. پیک قوی در ۳/۵۹ ppm به پروتون‌های متیلنی (-CH-CH-O-) زنجیر پلی (اتیلن گلیکول) نسبت داده می‌شود. پیک‌های مشخصه بخش پلی‌کاپرولاکتون شامل پیک‌های ظاهر شده در نواحی (-CH-)، ۱/۲۳-۱/۳۴، ۱/۴۹-۱/۶۰ و (-COCH-)، ۳/۹۳-۳/۹۹ ppm هستند. افزون بر این، وجود پیک در ناحیه ۲/۱۸-۲/۲۴ ppm که به پروتون‌های گروه -CHOOC- نسبت داده می‌شود، تأییدکننده اتصال موفقیت‌آمیز مونومرهای کاپرولاکتون به درشت‌آغازگر پلی (اتیلن گلیکول) است. این داده‌ها، ساختار شیمیایی مورد انتظار کوپلیمر دوقطعه‌ای PEG-*b*-PCL را تأیید می‌کند و اطلاعات کمی ارزشمندی درباره ترکیب و نسبت مونومرها در ساختار نهایی ارائه می‌دهد. داده‌های این آزمون، مکمل نتایج طیف‌سنجی FTIR است و درستی سنتز کوپلیمر را با دقت بیشتری نشان می‌دهد [۲۷].

برای محاسبه وزن مولکولی کوپلیمرهای سنتز شده، ابتدا تعداد واحدهای تکرارشونده PEG، با تقسیم وزن مولکولی کل PEG بر وزن مولکولی یک واحد تکرارشونده، محاسبه شد. سپس، با محاسبه



(a)



(b)

شکل ۴- تصاویر میکروسکوپ نوری از (a) ذرات سنتز شده و (b) ریزحباب‌ها.

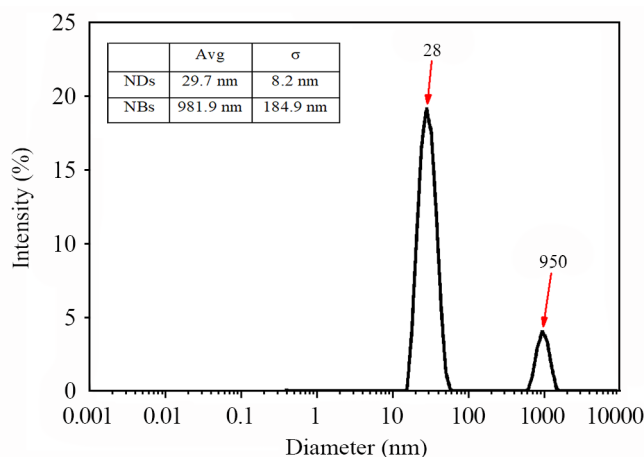
Fig. 4. Optical microscope images of (a) the synthesized particles and (b) microbubbles.

در مطالعات امولسیون‌ها، اندازه‌گیری بار سطحی ذرات نقش مهمی در درک اهمیت نیروهای الکتروستاتیک در پایداری سامانه ایفا می‌کند. برای دستیابی به پایداری امولسیون فقط از راه دافعه الکتروستاتیک، پتانسیل زتا باید به حدی زیاد باشد که بتواند بر نیروهای جاذبه واندروالسی غلبه کند. با وجود این، تعیین حد آستانه دقیق پتانسیل زتا برای تضمین پایداری الکتروستاتیک امولسیون‌ها موضوعی پیچیده و مورد بحث است، زیرا این مقدار بسته به خواص سامانه متغیر است [۲۹]. همچنین برای بارگذاری دارو روی حامل دارو با روش الکتروستاتیک و انتخاب نوع داروی بارگذاری شده، اندازه‌گیری پتانسیل زتا نمونه سنتز شده اهمیت بسیاری دارد. پتانسیل زتای نانوامولسیون سنتز شده (شکل ۶) نشان می‌دهد، ذرات سنتز شده دارای بار سطحی مثبت بوده و مقدار آن  $1/77 \text{ mV}$  و بسیار نزدیک به صفر است که نشان‌دهنده بار سطحی کم

نیز برای آزمون نمونه‌ها استفاده شد. با وجود این نتایج نشان داد، ریزحباب‌ها به دلیل ساختار ذاتی خود حین آزمون تخریب می‌شوند. این موضوع ممکن است به خلأ زیاد یا تنش‌های وارد شده به ذرات طی فرایند پوشش‌دهی طلا و آزمون میکروسکوپی مربوط باشد که به تغییر فاز سریع هسته، تبدیل سریع آن به بخار و در نهایت تخریب ذرات منجر می‌شود.

### بار سطحی و توزیع اندازه ذرات سنتز شده

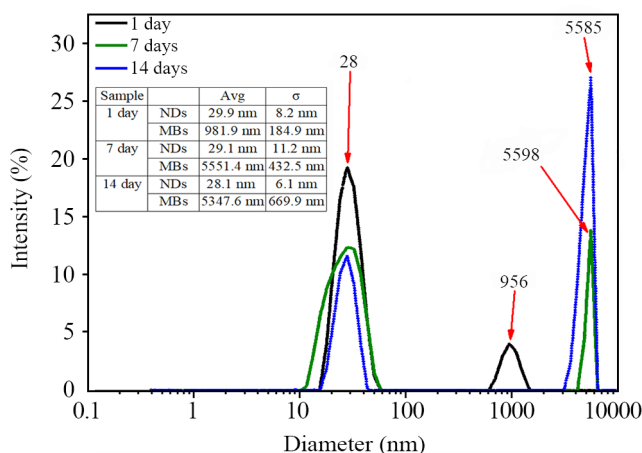
برای ارزیابی توزیع اندازه ذرات  $\text{PEG-}b\text{-PCL}$  با هسته PFH سنتز شده به روش امولسیون، آزمون DLS انجام شد (شکل ۵). اندازه نانوکپسول‌ها عامل مهمی در تعیین کیفیت و پایداری سامانه است، به طوری که ذرات کوچک‌تر به طور کلی پایداری بیشتری نشان می‌دهند. میانگین اندازه ذرات و توزیع آن‌ها می‌تواند اطلاعاتی درباره سازوکارهای احتمالی ناپایداری امولسیون ارائه دهد. قطره‌های بزرگ‌تر مستعد جدایی فاز با شناورسازی یا رسوب‌دهی هستند، در حالی که قطره‌های بسیار کوچک و یکنواخت، مقاومت بیشتری در برابر سازوکارهای ناپایدارکننده مانند Ostwald ripening و شناورسازی نشان می‌دهند. نتایج آزمون DLS برای نمونه ریزحباب سنتز شده در دمای  $25^\circ\text{C}$  (شکل ۵) توزیع دوقله‌ای را نشان می‌دهد. قله اول در محدوده  $28 \text{ nm}$  و قله دوم در حدود  $950 \text{ nm}$  مشاهده می‌شود. براساس مطالعات پیشین [۲۸]، قله اول احتمالاً به وجود میسل‌ها در نمونه مربوط است، در حالی که قله دوم نشان‌دهنده وجود نانوقطره‌هاست. همچنین، میانگین اندازه (Avg) و انحراف معیار ( $\sigma$ ) مربوط به نانوذرات و ریزحباب‌ها در جدولی کنار نمودار DLS گزارش شده و اعداد روی قله‌ها بیانگر اندازه نوک آن قله است.



شکل ۵- توزیع اندازه ذرات سنتز شده.

Fig. 5. Size distribution of the synthesized particles.





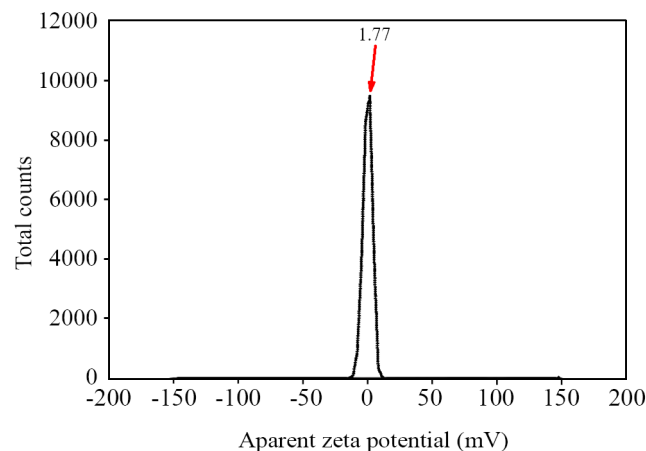
شکل ۸- توزیع اندازه نانوقطره‌ها-میکروحباب‌های سنتز شده طی هفته‌های مختلف اندازه‌گیری شده با آزمون DLS.

Fig. 8. Size distribution over weeks of nanodroplets/microbubbles measured by DLS.

اندازه نشان داده و در محدوده ۲۸ nm ثابت مانده است. در مقابل، پیک دوم که مربوط به میکرو/نانوقطره‌هاست، تغییرات چشمگیری را نمایان ساخته است. طی هفته اول این پیک افزایش شایان توجهی در اندازه نشان داده و پس از آن، روند رشد آن کند شده و به حالت نسبتاً پایدار رسیده است. یافته تأمل برانگیز، کاهش تدریجی در تعداد میسل‌ها همراه با افزایش تعداد نانو/میکروذرات با گذشت زمان است. این پدیده را می‌توان به نفوذ تدریجی PFH موجود در محلول به درون میسل‌ها نسبت داد. این فرایند به افزایش موضعی نسبت PFH به پلیمر منجر شده و در نتیجه، تبدیل میسل‌ها به میکرو/نانوقطره‌ها را آسان می‌کند. افزون بر این، افزایش اندازه نانو/میکروذرات، نیاز به سطح بیشتری از پوشش پایدارکننده را ایجاد می‌کند. این موضوع موجب جذب میسل‌های بیشتری به سطح ذرات بزرگ‌تر می‌شود، که به نوبه خود موجب کاهش تعداد کل میسل‌های آزاد و افزایش هم‌زمان در تعداد و اندازه نانو/میکروذرات می‌شود. این سازوکار توضیحی را برای تغییرات مشاهده شده در توزیع اندازه ذرات با گذشت زمان ارائه می‌دهد.

### پاسخگویی نانوامولسیون‌ها به فراصوت و تبدیل آن به ریزحباب

شیوه آزمایش شامل قراردادن نمونه‌های سنتز شده در معرض تابش فراصوت با توان  $3/2 \text{ W/cm}^2$  به مدت زمان‌های متفاوت (۲۰ min تا ۲ min) بود. این توان به‌طور شایان توجهی کمتر از مقادیر معمول در دستگاه‌های فراصوت بالینی است. نتایج نشان داد، حتی پس از ۲۰ min تابش، افزایش دما تنها  $2^\circ \text{C}$  بود که از نظر ایمنی بافتی بسیار مطلوب است.



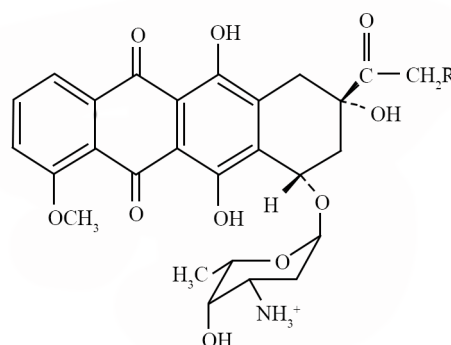
شکل ۶- پتانسیل زتای نانوامولسیون سنتز شده.

Fig. 6. Apparent zeta potential of the synthesized nanoemulsion.

یا تقریباً خنثی است. در این شرایط، بارگذاری داروی دارای بار مانند DOX (با بار مثبت در pH فیزیولوژیکی) به روش الکتروستاتیکی چندان مؤثر نخواهد بود. در حالت فعلی، بارگذاری DOX در PEG-*b*-PCL بیشتر به‌واسطه برهم‌کنش‌های آب‌گریز و تا حدی وان‌دروالسی انجام می‌شود، نه به‌دلیل برهم‌کنش‌های الکتروستاتیکی. DOX دارای ساختار آروماتیک بزرگ و گروه‌های عاملی قطبی است (شکل ۷). گروه‌های آروماتیک می‌توانند با هسته آب‌گریز PCL یا بخش‌های سطحی پلیمر برهم‌کنش وان‌دروالسی داشته باشند.

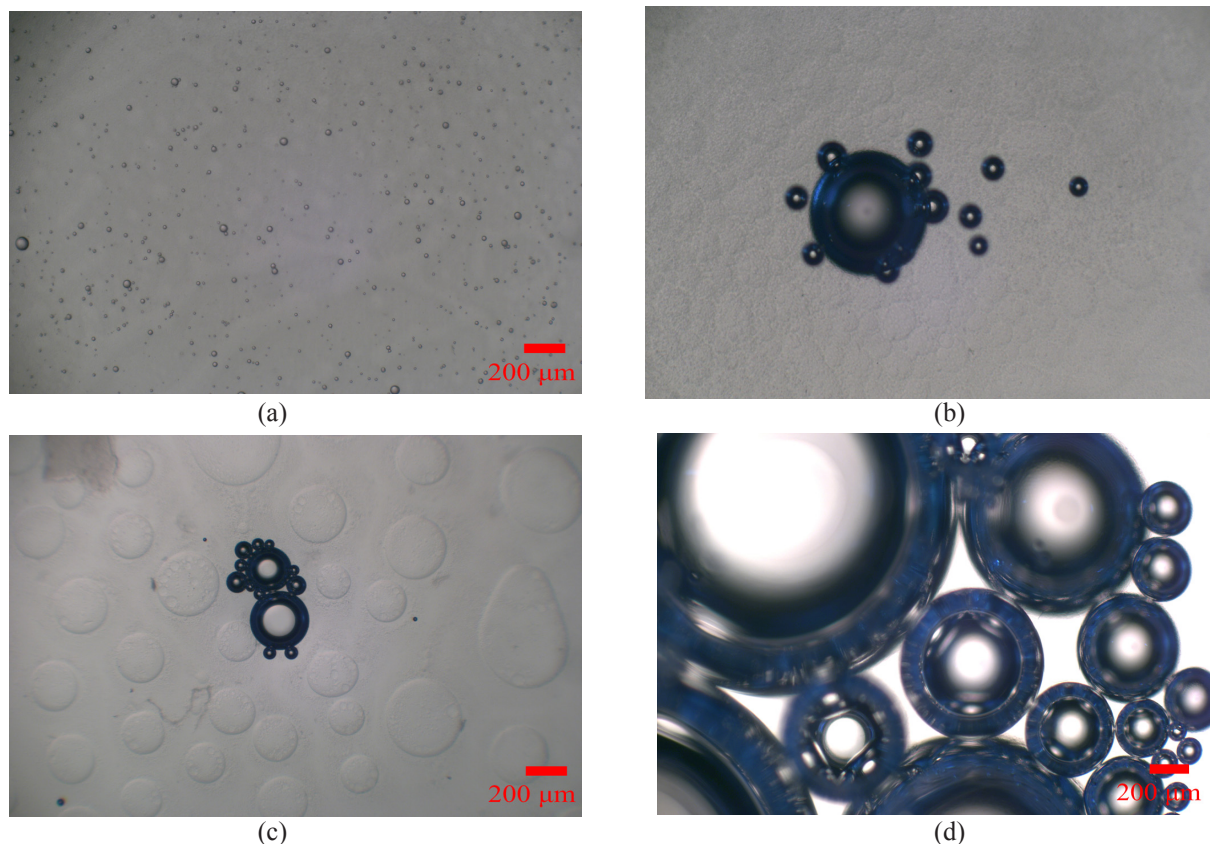
### پایداری ذرات سنتز شده

نتایج آزمون DLS برای ریزحباب سنتز شده طی دوره‌های زمانی مختلف (نگه‌داری شده در دمای  $4^\circ \text{C}$ ) (شکل ۸) اطلاعات ارزشمندی درباره تکامل ساختاری سامانه ارائه می‌دهد. مشاهدات نشان می‌دهد، پیک اول که نماینده میسل‌هاست، پایداری شایان توجهی را از نظر



شکل ۷- ساختار دوکسوروبیسین هیدروکلرید [30]. [R=OH]

Fig. 7. Structure of doxorubicin hydrochloride [30].



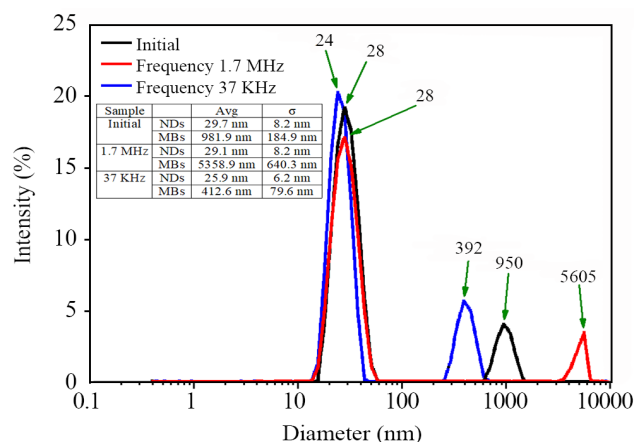
شکل ۹- تصاویر میکروسکوپ نوری از پاسخگویی نانوامولسیون‌ها به فراصوت و تبدیل آن به ریزحباب: (a) بدون فراصوت (دما  $26.5^{\circ}\text{C}$ ) و فراصوت دهی به مدت (b) ۲ min (دما  $27^{\circ}\text{C}$ )، (c) ۴ min (دما  $27^{\circ}\text{C}$ ) و (d) ۱۰ min (دما  $28^{\circ}\text{C}$ ).

Fig. 9. Optical microscope images of nanoemulsions responding to ultrasound and converting it into microbubbles (a) no ultrasound ( $26.5^{\circ}\text{C}$ ), (b) ultrasound for 2 min ( $27^{\circ}\text{C}$ ), (c) ultrasound for 4 min ( $27^{\circ}\text{C}$ ) and (d) ultrasound for 10 min ( $28^{\circ}\text{C}$ ).

افزون بر این، دستگاه DLS از نمایش ذراتی با فراوانی کمتر از ۱٪ در نمونه صرف نظر می‌کند. همان‌طور که در شکل ۱۰ دیده می‌شود، پیک اول که مربوط به میسل‌هاست، اثر شایان توجهی از امواج فراصوت با شدت‌های متفاوت نگرفته است. در مقابل، رفتار پیک دوم که مرتبط با قطره‌هاست، تغییرات محسوسی را نشان می‌دهد. در شرایط اعمال امواج فراصوت با شدت کم، افزایش اندازه ذرات مشاهده شده است که می‌تواند به تغییر فاز ذرات و تبدیل آن‌ها به ریزحباب‌ها نسبت داده شود. در مقابل، اعمال امواج فراصوت با شدت زیاد، به دلیل تنش مکانیکی شدید، به شکست ذرات منجر شده است. در نتیجه، از راه ترک‌های ایجادشده در ذرات، خارج شده و ذرات دچار فروپاشی ساختاری شده‌اند. نکته شایان توجه دیگر، تغییر در مقدار میسل‌ها تحت تأثیر امواج فراصوت است. در شرایط تابش امواج با شدت کم که به انبساط پوسته منجر می‌شود، به دلیل افزایش مساحت سطح، احتمالاً نیاز بیشتری به میسل برای حفظ پایداری سامانه وجود

تصاویر میکروسکوپ نوری (شکل ۹) حاکی از تشکیل قابل توجه ریزحباب‌ها در دماهای بسیار کمتر از روش‌های گرمایی متداول بود. یافته‌ها تأییدکننده کارآمدی استفاده از فراصوت برای تبدیل نانوذرات به ریزحباب‌هاست. نتایج مطالعه نشان می‌دهد، استفاده از فراصوت با توان بهینه می‌تواند روشی مؤثر و کم‌خطر در تولید ریزحباب‌ها باشد. در مرحله بعدی، به منظور بررسی اثر امواج فراصوت بر ابعاد و توزیع اندازه ذرات در مقیاس نانومتری که از راه میکروسکوپ نوری قابل مشاهده نبود، آزمون DLS روی نمونه‌ها انجام شد. نتایج حاصل در قالب نمودارهای مقایسه‌ای در شکل ۱۰ ارائه شده است. در این آزمایش، نمونه اولیه تحت تأثیر امواج فراصوت با دو شدت متفاوت (کم و زیاد) به مدت ۳ min قرار گرفت. شایان ذکر است، در آزمون DLS، ذرات با ابعاد بزرگ‌تر از  $10\text{ }\mu\text{m}$  در نمودار نشان داده نمی‌شوند. بنابراین، ریزحباب‌های مشاهده‌شده در تصاویر میکروسکوپی با ابعاد بیش از  $10\text{ }\mu\text{m}$  در نتایج DLS منعکس نشده‌اند.

بارگذاری داروها در حامل‌های پلیمری وجود دارد [۲۴]. با توجه به محدودیت‌های بالقوه روش‌های اتصال کووالانسی، مانند تغییرات احتمالی در ساختار دارو که می‌تواند اثربخشی آن را تحت تأثیر قرار دهد، کپسول‌دار کردن فیزیکی از راه برهم‌کنش‌های آب‌گریز یا بار الکتریکی هیچ تغییری در ساختار شیمیایی دارو ایجاد نمی‌کند [۳۱]. این روش اغلب به برهم‌کنش الکتروستاتیکی بین دارو و ماتریس پلیمری وابسته است و پیوندهای هیدروژنی نیز می‌توانند در ارتباط بین دارو و حامل نقش کلیدی ایفا کنند [۳۱، ۳۲]. روش دیالیز براساس اصل نفوذ عمل می‌کند. در این روش، حلال از کیسه دیالیز به داخل بافر آبی نفوذ کرده و با کاهش غلظت حلال در داخل کیسه، پلیمر شروع به رسوب یا خودگردایش می‌کند و DOX را در ماتریس پلیمری به دام می‌اندازد. این فرایند نوعی کپسول‌دار کردن فیزیکی است و هیچ پیوند کووالانسی بین دارو و پلیمر ایجاد نمی‌شود. منحنی کالیبره کردن داروی DOX در محلول بافری با pH برابر ۷/۴ رسم شد (شکل ۱۱ (a)). مقدار کپسول‌دار کردن موفقیت‌آمیز DOX در کوپلیمر PEG-*b*-PCL و نانوذرات حاصل از آن به ترتیب ۹۸/۴ و ۹۵/۸٪ به دست آمد. در ادامه، نمودار سینتیک رهایش داروی DOX از ریزحباب‌های دارای دارو در شکل ۱۱ (b) نشان داده شده است. نتایج حاکی از الگوی رهایش دومرحله‌ای است که شامل یک فاز انفجاری اولیه سریع و به دنبال آن فاز رهایش آهسته و کنترل شده طی دوره زمانی طولانی است. رهایش انفجاری اولیه DOX از میسل‌ها و ریزحباب‌ها



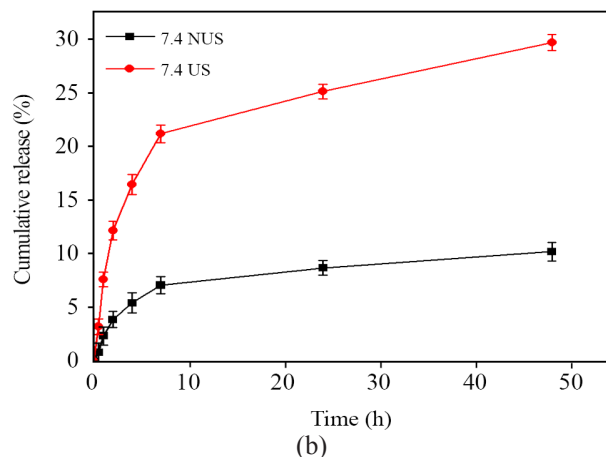
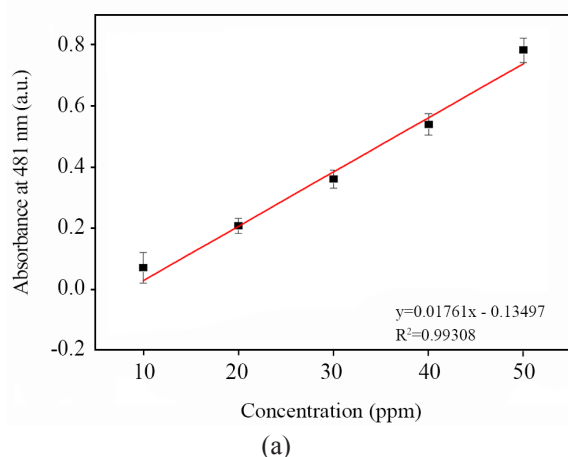
شکل ۱۰- اثر فراصوت با شدت زیاد و کم بر توزیع اندازه ذرات سنتز شده.

Fig. 10. The effect of high-intensity and low-intensity ultrasound on the distribution of the synthesized particles.

دارد. در مقابل، در شرایط اعمال امواج با شدت زیاد که به تخریب یا فروپاشی ذرات منجر می‌شود، آزادسازی میسل‌ها موجب افزایش غلظت آن‌ها در محیط می‌شود.

### رهایش داروی بارگذاری شده در محیط برون‌تنی

به‌طور معمول، سه روش اصلی شامل حل شدن یا کپسول‌دار کردن فیزیکی، تشکیل کمپلکس چندیونی و اتصال شیمیایی برای



شکل ۱۱- (a) منحنی کالیبره کردن مربوط به محلول DOX با غلظت‌های متفاوت در داخل بافر با pH=۷/۴ و (b) نمودار رهایش از ذرات بارگذاری شده با DOX.

Fig. 11. (a) Calibration curve of DOX solution having with different concentrations in the buffer with pH=7.4 and (b) drug release profile from particles loaded with DOX.

## نتیجه‌گیری

در این پژوهش، حامل داروی پاسخگو به فراصوت از راه سنتز ریزحباب‌های با پوسته پلیمری PEG-*b*-PCL و هسته PFH توسعه یافته است که قابلیت آزادسازی محتوای خود را با محرک فراصوت دارد. ابتدا، کوپلیمر قطعه‌ای PEG-*b*-PCL سنتز شد. آزمون‌های FTIR و <sup>1</sup>H-NMR سنتز موفقیت‌آمیز کوپلیمر دوقطعه‌ای PEG-*b*-PCL را تأیید کردند. سپس، با این پوسته و هسته PFH ریزحباب تهیه شد و توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا با روش DLS سنجیده شد. به کمک میکروسکوپی نوری، شکل‌شناسی ذرات سنتز شده بررسی شد. پاسخگویی به فراصوت با میکروسکوپی نوری ارزیابی شد و نتایج نشان داد، ذرات سنتز شده با موفقیت به محرک فراصوت پاسخگو هستند. پایداری ذرات و اثر شدت فراصوت بر آن‌ها با استفاده از DLS بررسی شد. در نهایت، ریزحباب‌های حامل داروی ضدسرطان DOX با موفقیت ساخته شده و رهایش دارو در محیط برون‌تنی بررسی شد. نتایج نشان داد، ریزحباب‌های سنتز شده با موفقیت قابلیت رهایش دارو با مقدار مناسب را دارند و نسبت به فراصوت پاسخ مناسبی می‌دهند. از این رو، محصول می‌تواند به‌عنوان حامل داروی پاسخگو به فراصوت مناسب مطرح شود.

## قدردانی

از آقای دکتر اسماعیل نجفی اقدام و آقای مهندس نیما ایوبی به دلیل ارائه دستگاه فراصوت و همکاری‌های ارزشمندشان که اثر بسزایی در پیشبرد این پژوهش داشت، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

## مراجع

- Poursadegh H., Barzegarzadeh M., and Amini-Fazl M.S., Synthesis of Magnetic Graphene Quantum Dot/Chitosan Bionanocomposite Hydrogel Beads for Drug Delivery System, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **36**, 409-420, 2023.
- Lei G., Zhuang L., and Gan B., The Roles of Ferroptosis in Cancer: Tumor Suppression, Tumor Microenvironment, and Therapeutic Interventions, *Cancer Cell*, **42**, 513-534, 2024.
- El Tekle G. and Garrett W.S., Bacteria in Cancer Initiation, Promotion and Progression, *Nat. Rev. Cancer*, **23**, 600-618, 2023.
- Tacar O., Sriamornsak P., and Dass C.R., Doxorubicin: An Update on Anticancer Molecular Action, Toxicity and Novel Drug Delivery Systems, *J. Pharm. Pharmacol.*, **65**, 157-170, 2013.
- Avramović N., Mandić B., Savić-Radojević A., and Simić T., Polymeric Nanocarriers of Drug Delivery Systems in Cancer Therapy, *Pharmaceutics*, **12**, 298, 2020.
- Topuz F. and Uyar T., Advances in the Development of Cyclodextrin-Based Nanogels/Microgels for Biomedical Applications: Drug Delivery and Beyond, *Carbohydr. Polym.*, **297**, 120033, 2022.
- Rommasi F. and Esfandiari N., Liposomal Nanomedicine: Applications for Drug Delivery in Cancer Therapy, *Nanoscale Res. Lett.*, **16**, 95, 2021.
- Plaza-Oliver M., Santander-Ortega M.J., and Lozano M.V., Current Approaches in Lipid-Based Nanocarriers for Oral Drug Delivery, *Drug Deliv. Transl. Res.*, **11**, 471-497, 2021.



9. Entzian K. and Aigner A., Drug Delivery by Ultrasound-Responsive Nanocarriers for Cancer Treatment, *Pharmaceutics*, **13**, 1135, 2021.
10. Deprez J., Lajoinie G., Engelen Y., De Smedt S., and Lentacker I., Opening Doors with Ultrasound and Microbubbles: Beating Biological Barriers to Promote Drug Delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **172**, 9-36, 2021.
11. Fournier L., de La Taille T., and Chauvierre C., Microbubbles for Human Diagnosis and Therapy, *Biomaterials*, **294**, 122025, 2023.
12. Dijkmans P., Juffermans L., Musters R., van Wamel A., Ten Cate F., van Gilst W., Visser C., de Jong N., and Kamp, O., Microbubbles and Ultrasound: From Diagnosis to Therapy, *Eur. J. Echocardiogr.*, **5**, 245-246, 2004.
13. Feng Z., Zhao J., Li Y., Xu S., Zhou J., Zhang J., Deng L., and Dong A., Temperature-Responsive In Situ Nanoparticle Hydrogels Based on Hydrophilic Pendant Cyclic Ether Modified PEG-PCL-PEG, *Biomater. Sci.*, **4**, 1493-1502, 2016.
14. Danafar H., Jaberizadeh H., and Andalib S., In Vitro and In Vivo Delivery of Gliclazide Loaded mPEG-PCL Micelles and Its Kinetic Release and Solubility Study, *Artif. Cell. Nanomed. Biotechnol.*, **46**, 1625-1636, 2018.
15. Andalib S., Molhemazar P., and Danafar H., In Vitro and In Vivo Delivery of Atorvastatin: A Comparative Study of Anti-Inflammatory Activity of Atorvastatin Loaded Copolymeric Micelles, *J. Biomater. Appl.*, **32**, 1127-1138, 2018.
16. Abdipour H., Abbasi F., Nasiri M., Ghamkhari A., and Ghorbani M., Multifunctional Microbubbles Comprising Poly(lactic-co-glycolic acid), Chitosan, Polyethylene Glycol, and Folic Acid for Targeted Cancer Therapy, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **94**, 105469, 2024.
17. Abdipour H., Nasiri M., and Abbasi F., An Overview of Microbubbles and Their Applications in Medicine, *Iran Polym. Tech., Res. Dev.*, **5**, 5-19, 2020.
18. Baghbani F., Moztarzadeh F., Mohandesi J.A., Yazdian F., and Mokhtari-Dizaji M., Novel Alginate-Stabilized Doxorubicin-Loaded Nanodroplets for Ultrasonic Theranosis of Breast Cancer, *Int. J. Biol. Macromol.*, **93**, 512-519, 2016.
19. Manjili H.K., Ghasemi P., Malvandi H., Mousavi M.S., Attari E., and Danafar H., Pharmacokinetics and In Vivo Delivery of Curcumin by Copolymeric mPEG-PCL Micelles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **116**, 17-30, 2017.
20. Surnar B. and Jayakannan M., Stimuli-Responsive Poly(caprolactone) Vesicles for Dual Drug Delivery under the Gastrointestinal Tract, *Biomacromolecules*, **14**, 4377-4387, 2013.
21. Deng H., Zhao X., Liu J., Deng L., Zhang, J., Liu J., and Dong, A., Reactive Oxygen Species (ROS) Responsive PEG-PCL Nanoparticles with pH-Controlled Negative-to-Positive Charge Reversal for Intracellular Delivery of Doxorubicin, *J. Mat. Chem. B*, **3**, 9397-9408, 2015.
22. Jagdale S., Gattani M., Bhavsar D., Kuchekar, B., and Chabukswar A., Formulation and Evaluation of Chewable Tablet of Levamisole, *Int. J. Res. Pharm. Sci.*, **1**, 282-289, 2010.
23. Hassanzadeh F., Maaleki S., Varshosaz J., Khodarahmi G.A., Farzan M., and Rostami M., Thermosensitive Folic Acid-Targeted Poly(ethylene-co-vinyl alcohol) Hemisuccinate Polymeric Nanoparticles for Delivery of Epirubicin to Breast Cancer Cells, *Iran. Polym. J.*, **25**, 967-976, 2016.
24. Adeli F., Abbasi F., Babazadeh M., and Davaran S., Thermo/pH Dual-Responsive Micelles Based on the Host-Guest Interaction between Benzimidazole-Terminated Graft Copolymer and  $\beta$ -Cyclodextrin-Functionalized Star Block Copolymer for Smart Drug Delivery, *J. Nanobiotechnol.*, **20**, 91, 2022.
25. Wang K., Liu T., Lin R., Liu B., Yang G., Bu X., Wang W., Zhang P., Zhou L., and Zhang J., Preparation and In Vitro Release of Buccal Tablets of Naringenin-Loaded MPEG-PCL Nanoparticles, *RSC Adv.*, **4**, 33672-33679, 2014.
26. Petrova S., Jäger E., Konefal R., Jäger A., Venturini C.G., Spěváček J., Pavlova E., and Štěpánek P., Novel Poly(ethylene oxide monomethyl ether)-*b*-Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Diblock Copolymers Containing a pH-Acid Labile Ketal Group as a Block Linkage, *Polym. Chem.*, **5**, 3884-3893, 2014.
27. Li Z. and Tan B.H., Towards the Development of Polycaprolactone Based Amphiphilic Block Copolymers: Molecular Design, Self-Assembly and Biomedical Applications, *Mater. Sci. Eng. C*, **45**, 620-634, 2014.
28. Li Y., Liu R., Liu L., Zhang Y., Sun J., Ma P., Wu Y., Duan S., and Zhang L., Study on Phase Transition and Contrast-Enhanced Imaging of Ultrasound-Responsive Nanodroplets with Polymer Shells, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **189**, 110849, 2020.
29. Almeida T.C.A., Larentis A.L., and Ferraz H.C., Evaluation of the Stability of Concentrated Emulsions for Lemon Beverages Using Sequential Experimental Designs, *PloS one*, **10**, e0118690, 2015.
30. Mohan P. and Rapoport N., Doxorubicin as a Molecular Nanotheranostic Agent: Effect of Doxorubicin Encapsulation in Micelles or Nanoemulsions on the Ultrasound-Mediated Intracellular Delivery and Nuclear Trafficking, *Mol. Pharm.*, **7**, 1959-1973, 2010.



31. Raj W., Jerczynski K., Rahimi M., Przekora A., Matyjaszewski K., and Pietrasik J., Molecular Bottlebrush with pH-Responsive Cleavable Bonds as a Unimolecular Vehicle for Anticancer Drug Delivery, *Sci. Eng. C*, **130**, 112439, 2021.
32. Hutchins K.M., Functional Materials Based on Molecules with Hydrogen-Bonding Ability: Applications to Drug *co*-Crystals and Polymer Complexes, *R. Soc. Open Sci.*, **5**, 180564, 2018.
33. Rapoport N., Nam K.-H., Gupta R., Gao Z., Mohan P., Payne A., Todd N., Liu X., Kim T., and Shea J., Ultrasound-Mediated Tumor Imaging and Nanotherapy Using Drug Loaded, Block Copolymer Stabilized Perfluorocarbon Nanoemulsions, *J. Control. Release*, **153**, 4-15, 2011.
34. Rapoport N.Y., Kennedy A.M., Shea J.E., Scaife C.L., and Nam K.-H., Controlled and Targeted Tumor Chemotherapy by Ultrasound-Activated Nanoemulsions/Microbubbles, *J. Control. Release*, **138**, 268-276, 2009.