



# Targeted Delivery of Curcumin to Hs-578T Cells Using Multifunctional PLA-PEG-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Modified with Folic Acid and Glucose

Yaghoubi H\*


<sup>1</sup> Department of Biology, Ard.C., Islamic Azad University, Ardabil, Iran

## Original Article

Use your device to scan and read the article online



**Citation:** Yaghoubi H. Targeted Delivery of Curcumin to Hs-578T Cells Using Multifunctional PLA-PEG-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Modified with Folic Acid and Glucose. Journal of Cell and Tissue. 2026; 17(1):33-58.

 <https://doi.org/10.61882/JCT/17..1.33>

## KEYWORDS

Curcumin, Drug Delivery Systems, Folic Acid, Glucose, and Hs-578T cell line

## EXTENDED ABSTRACT

**Introduction:** Cancer is one of the most significant diseases of the present century and ranks as the second leading cause of death worldwide. Its incidence, particularly breast cancer in women, is steadily increasing. This disease arises from uncontrolled cell proliferation and the ability of cancer cells to migrate to healthy tissues, leading to tumor formation and metastasis. The genetic and biological heterogeneity of cancer cells, especially in breast cancer, complicates effective treatment. Conventional therapies such as surgery, chemotherapy, and radiotherapy, although effective in reducing tumor size, are associated with limitations, including damage to healthy cells, drug resistance, and systemic side effects. Therefore, the development of targeted and innovative therapeutic strategies is a priority in cancer research. One promising approach is the use of nanoparticles for targeted drug delivery. Due to their small size, high surface-to-volume ratio, and modifiable surfaces, nanoparticles can efficiently carry drugs and deliver them to target cells. Controlled drug release from nanoparticles reduces uptake by healthy cells and minimizes systemic toxicity. Iron oxide nanoparticles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) possess unique magnetic and chemical properties that enable precise guidance to tumor sites and allow real-time monitoring of drug distribution via MRI. Surface modification with biocompatible polymers such as polyethylene glycol (PEG) enhances nanoparticle stability, prolongs systemic circulation, reduces immune clearance, and provides sites for conjugating targeting ligands such as folic acid and glucose. Polylactic acid (PLA), a biodegradable and biocompatible polymer, increases drug-loading capacity and enables sustained and controlled drug release. Combining PLA with PEG and targeting ligands creates multifunctional nanoparticles that are stable, biocompatible, and capable of selectively recognizing cancer cells while

\* Corresponding author. Tel: 09125798735, Fax: 04533727799

E-mail address: yaghoubi\_h@iau.ac.ir

DOI: <https://doi.org/10.61882/JCT/17.1.33>

Received: 1 Oct. 2025; Received in revised form: 2 Nov. 2025; Accepted: 9 Nov. 2025

Original Article

© Author



minimizing side effects on healthy tissues. Targeting ligands such as folic acid and glucose facilitate selective cellular uptake; folic acid binds to overexpressed receptors on many cancer cells, promoting intracellular drug delivery, while glucose exploits the high metabolic demand of cancer cells, improving the delivery of therapeutic agents or genes.

**Aims:** Dual-ligand nanoparticles enable multi-pathway targeting, enhancing therapeutic efficacy and potentially overcoming drug resistance. In this study, multifunctional PLA-PEG nanoparticles functionalized with folic acid and glucose and incorporating Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> were developed for targeted drug delivery to triple-negative breast cancer cells (Hs-578T). This system combines magnetic guidance, biocompatibility, controlled drug release, and selective targeting, providing a promising platform for effective and safe breast cancer treatment with reduced side effects compared to conventional therapies.

**Materials and Methods:** Various chemicals and reagents, including MTT ((3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)), Ethanol, HCl, NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Chloroform, NH<sub>2</sub>-PEG-FA, NH<sub>2</sub>-PEG-Glu, NaOH, and paraformaldehyde were procured from commercial suppliers, while FBS, DMEM, and trypsin-EDTA were used for *in vitro* studies with Hs-578T breast cancer cells. Multifunctional nanoparticles PPF (PLA-PEG-FA), PPG (PLA-PEG-Glu), and PPGF (PLA-PEG-Glu/FA) were synthesized via the reaction of PLA-acrylate with the respective NH<sub>2</sub>-PEG derivatives in chloroform under mechanical stirring and mild heating, followed by purification through dialysis and freeze-drying. Methanolic extract of *Silybum marianum* was prepared by ultrasonication of powdered aerial parts in 80% methanol, followed by centrifugation and filtration. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles were synthesized via coprecipitation of Fe (III) and Fe (II) salts under nitrogen, followed by gradual addition of *Silybum marianum* plant extract and NaOH, leading to nanoparticle formation. The particles were collected magnetically, washed, freeze-dried, and stored in dark, dry conditions. Targeted delivery of Curcumin (CUR) was achieved using folic acid and glucose ligands. CUR and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-OA were incorporated into PPF, PPG, or PPGF matrices using sonication and emulsification in PVA solutions, followed by rotary evaporation to remove chloroform, washing, and filtration to remove unencapsulated drug and large particles. Structural and chemical composition were analyzed using <sup>1</sup>H-NMR and FTIR spectroscopy. Morphology was observed via TEM, and average size and zeta potential were measured using dynamic light scattering (DLS). Drug encapsulation efficiency was determined spectrophotometrically by measuring unencapsulated CUR in the supernatant. CUR release kinetics were evaluated in two pH environments: pH=7.4 (normal cells), and pH=4.5 (tumor-like), with periodic sampling and replacement with fresh medium over three days. Cytotoxicity was assessed via the MTT assay, with IC<sub>50</sub> values determined after treating Hs-578T cells with varying concentrations of CUR, nanoparticles with CUR, or blank nanoparticles. Apoptosis was analyzed using Annexin V/propidium iodide staining and flow cytometry to distinguish apoptotic and necrotic cells. All experiments were performed in triplicate. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Duncan's test at a 5% significance level, and normality was verified with the Kolmogorov-Smirnov test. Results are reported as mean ± standard deviation.

**Results:** Targeted drug delivery has emerged as a promising strategy for treating difficult-to-treat diseases, including cancer, by directing therapeutic agents specifically to diseased tissues while minimizing uptake by normal cells. Biocompatible and biodegradable polymers are essential for efficient delivery systems. PLA, a widely used biodegradable polymer, allows loading and controlled release of hydrophobic drugs like curcumin. However, PLA alone can aggregate in serum due to hydrophobic interactions, leading to immune recognition and clearance. To overcome this, PLA was conjugated with PEG, which enhances nanoparticle circulation time and provides a stealth effect, reducing recognition by the immune system. PEG also improves drug loading and stability, although it is not biodegradable and may accumulate over repeated doses. Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles were incorporated to increase targeting efficiency, while folic acid and glucose ligands were used for selective recognition of cancer cells. The synthesized PLA-based nanoparticles demonstrated good biocompatibility with Hs-578T cells, showing no significant cytotoxicity. Drug

encapsulation within PLA-PEG nanoparticles allowed controlled and sustained release of curcumin, which was particularly enhanced under acidic conditions mimicking the tumor microenvironment. Notably, nanoparticles containing both folic acid and PEG showed higher drug release compared to those with PEG alone, highlighting the role of folic acid in facilitating curcumin release. This pH-sensitive release profile minimizes drug exposure to normal tissues, potentially reducing side effects. Cytotoxicity assay revealed that curcumin-loaded nanoparticles significantly inhibited Hs-578T cell proliferation compared to free curcumin, with the dual-ligand nanoparticles exhibiting the lowest IC<sub>50</sub> values. Flow cytometry analysis demonstrated that these nanoparticles primarily induced apoptosis rather than necrosis, suggesting selective activation of programmed cell death pathways. The enhanced apoptotic effect is likely due to increased cellular uptake and targeted delivery, which facilitates higher intracellular concentrations of curcumin.

**Discussion:** Overall, the results indicate that PLA-PEG-based nanoparticles, functionalized with magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and surface ligands, provide an effective platform for targeted curcumin delivery. These nanoparticles combine biocompatibility, controlled release, tumor-specific accumulation, and apoptosis induction, which collectively enhance therapeutic efficacy while minimizing systemic toxicity. The study underscores the potential of multifunctional nanocarriers as a promising approach for improving the effectiveness of anticancer therapies and offers a foundation for the further development of targeted, stimuli-responsive drug delivery systems.

**Conclusion:** As a final conclusion of this study, it can be stated that the development of novel drug delivery systems based on PLA-PEG copolymer nanoparticles is a promising and strategic step toward overcoming the therapeutic challenges of intractable diseases such as cancer. This study clearly demonstrated that the design of such nanocarriers not only offers high biocompatibility and safety for normal cells, but also, by taking advantage of the camouflage effect caused by PEG, increases blood circulation time and prevents premature elimination by the immune system. The outstanding feature of this system is the ability to control and intelligently release the drug in response to specific stimuli of the tumor microenvironment, especially higher acidity, which allows for maximum drug delivery to the target tissue and, subsequently, a significant reduction in systemic side effects. In this study, the effect of adding targeting ligands such as folic acid and glucose on the accuracy and efficiency of these nanoparticles in recognizing and binding to cancer cells was also clearly observed. In addition, the results of this study showed that the designed nanoparticles were successfully able to increase the induction of cell apoptosis in Hs-578T cancer cells. These findings strongly support the superiority of this nanotechnology compared to conventional drug formulations, both in increasing therapeutic efficacy and reducing toxicity. Overall, it can be concluded that PLA-PEG-based smart nanoparticles, with their multimodal capabilities, have great potential to become a comprehensive and reliable approach in the next generation of targeted cancer therapies, paving the way for further studies and ultimately effective clinical applications.



## انتقال هدفمند کورکومین به سلول‌های Hs-578T به کمک نانوذرات چندمنظوره PLA-PEG-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> اصلاح شده با اسید فولیک و گلوکز

هاشم یعقوبی\*

گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

چکیده	واژگان کلیدی
<p><b>هدف:</b> سرطان پستان سه‌گانه منفی با تهاجم بالا و مقاومت دارویی مواجه است. هدف این مطالعه طراحی و تولید نانوحامل هوشمند چندمنظوره مبتنی بر کوپلیمر (PLA)-PolyEthylene Glycol (PEG) Polylactide برای انتقال هدفمند کورکومین به سلول‌های سرطانی پستان (Hs-578T) و بهبود اختصاصیت و کارایی درمانی بود. <b>مواد و روش‌ها:</b> نانوذرات PLA-PEG با لیگاندهای اسید فولیک (FA) و گلوکز (Glu) برای هدف‌گیری سلولی و با اکسید آهن (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) برای هدایت مغناطیسی و ایجاد پتانسیل درمان ترکیبی سنتز شدند. ساختار نانوذرات (PPF (PLA-PEG-FA-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), PPG (PLA-PEG-Glu-FA-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) و PPGF (PLA-PEG-Glu-FA-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) با استفاده از <sup>1</sup>H-NMR و FTIR تایید شد. مورفولوژی و اندازه نانوذرات پس از بارگذاری کورکومین (CUR) با TEM، SEM و DLS بررسی شد. سینتیک رهایش دارو در شرایط مختلف pH مورد ارزیابی قرار گرفت و سمیت سلولی با آزمون MTT و فلوسایتومتری سنجیده شد. <b>نتایج:</b> نانوذرات کروی با اندازه ۱۵۰ الی ۲۰۰ نانومتر و بدون تجمع مشاهده شدند. رهایش کورکومین وابسته به pH بود و در محیط اسیدی (pH=۴/۸) که مشابه ریزمحیط تومور است، افزایش قابل توجهی داشت. نانوذرات بدون دارو سمیت قابل ملاحظه‌ای نداشتند، در حالی که فرمولاسیون‌های بارگذاری شده با کورکومین فعالیت ضدسرطانی معناداری نشان دادند. بیشترین اثر سیتوتوکسیک متعلق به نانوذرات دارای هر دو لیگاند و اکسید آهن (PPGFFe/CUR) با کم‌ترین IC<sub>50</sub> (۵۶/۱۶۱ μg/mL) بود. نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان داد که این نانوذرات عمدتاً آپوپتوزیس را القا کرده و از نکروزیس جلوگیری می‌کنند. <b>نتیجه‌گیری:</b> نانوحامل طراحی شده، قابلیت رهایش pH-حساس، سمیت پایین نانوحامل و اثر ضدسرطانی مؤثر را نشان داد و پتانسیل بالایی برای درمان ترکیبی سرطان پستان سه‌گانه منفی دارد.</p>	<p>دارورسانی هدفمند، کورکومین، گلوکز، فولیک‌اسید و Hs-578T</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۰۹</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۸/۱۱</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۱۸</p>

### ۱- مقدمه

سرطان به‌عنوان یکی از مهم‌ترین و چالش‌برانگیزترین بیماری‌های عصر حاضر، دومین عامل مرگ و میر در جهان محسوب می‌شود و شیوع آن به‌طور مستمر در حال افزایش است. این بیماری ناشی از تقسیم غیرکنترل شده سلول‌ها و توانایی آن‌ها در مهاجرت به بافت‌های سالم است که منجر به ایجاد تومور و متاستاز می‌شود (۱). تنوع ژنتیکی و بیولوژیکی سلول‌های سرطانی، به‌ویژه در سرطان پستان، موجب پیچیدگی‌های درمانی فراوان می‌شود (۲). سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان در زنان است.

\* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۹۱۲۵۷۹۸۷۳۵؛ فکس: ۰۴۵۳۳۷۲۷۷۹۹

آدرس پست الکترونیک: yaghoobi\_h@iau.ac.ir

طبق گزارشات منتشرشده از سازمان بهداشت جهانی (WHO)، سالانه دو میلیون مورد جدید سرطان پستان در جهان تشخیص داده می‌شود که سهم ایران از این آمار حدود ۱۵ هزار مورد است و این موضوع اهمیت یافتن روش‌های درمانی موثر، با عوارض جانبی کمتر و هدفمند را بیش‌ازپیش برجسته می‌کند (۳). سرطان پستان با زیرگونه‌های مختلفی از جمله تومورهای با گیرنده‌های هورمونی مثبت که به‌عنوان تریپل مثبت یا منفی شناخته می‌شوند، مواجه است (۴). سلول‌های Hs-578T، یکی از لاین‌های سلولی سه‌گانه منفی سرطان پستان، به‌دلیل ویژگی‌های خاص بیولوژیکی خود، مانند تکثیر سریع و مقاومت نسبی به داروهای شیمی‌درمانی، به‌عنوان مدل مناسبی برای مطالعه درمان‌های نوین و هدفمند در آزمایشگاه استفاده می‌شوند (۵). روش‌های درمان سنتی سرطان شامل جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و ترکیبات هورمونی است. این روش‌ها اگرچه در کاهش اندازه تومورها و افزایش بقای بیماران موثر بوده‌اند، اما با محدودیت‌های قابل‌توجهی مانند آسیب به سلول‌های سالم، مقاومت دارویی و عوارض سیستمیک همراه هستند. به‌همین دلیل، توسعه روش‌های درمانی هدفمند و نوآورانه یکی از اولویت‌های تحقیقاتی در حوزه سرطان به‌شمار می‌رود (۶). یکی از رویکردهای امیدوارکننده در این زمینه، استفاده از نانوذرات برای دارورسانی هدفمند است. نانوذرات به‌دلیل اندازه کوچک، نسبت سطح به حجم بالا و قابلیت اصلاح سطحی، توانایی بالایی در حمل دارو و انتقال آن به سلول‌های هدف دارند. علاوه بر این، نانوذرات می‌توانند با رهایش کنترل‌شده دارو، جذب توسط سلول‌های سالم را کاهش دهند و سمیت سیستمیک درمان را به حداقل برسانند (۷). سنتز سبز نانوذرات با استفاده از عصاره‌های گیاهی، به‌عنوان یک راه‌کار پایدار و دوست‌دار محیط‌زیست در مقیاس نانو مطرح است. در این روش، ترکیبات فیتوشیمیایی گیاهان به‌صورت هم‌زمان نقش عوامل کاهنده و تثبیت‌کننده را ایفا کرده و نیاز به استفاده از مواد شیمیایی سمی را مرتفع می‌سازند. این رویکرد علاوه بر کاهش بار آلاینده‌گی، منجر به تولید نانوذراتی با سازگاری زیستی بالاتر و پتانسیل کاربرد ایمن در حوزه دارورسانی می‌شود (۱).

نانوذرات اکسید آهن ( $Fe_3O_4$ ) به‌دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد مغناطیسی و شیمیایی خود، نقش بسیار مهمی در دارورسانی هدفمند دارند. این نانوذرات خاصیت سوپراپارامغناطیسی دارند؛ به این معنی که در غیاب میدان مغناطیسی، خاصیت مغناطیسی از دست می‌دهند و از تجمع ناخواسته جلوگیری می‌شوند، اما در حضور میدان مغناطیسی خارجی به‌راحتی جهت‌گیری می‌کنند و می‌توان آن‌ها را به‌سمت محل تومور هدایت کرد (۴). این ویژگی امکان کنترل دقیق محل تجمع دارو و کاهش اثرات جانبی داروهای شیمی‌درمانی را فراهم می‌آورد و به افزایش اثربخشی درمان کمک می‌کند. علاوه بر هدایت مغناطیسی، نانوذرات  $Fe_3O_4$  قابلیت تصویربرداری با رزونانس مغناطیسی (MRI) را نیز دارند؛ بنابراین می‌توان توزیع و تجمع دارو را در بدن به‌صورت هم‌زمان ردیابی و کنترل کرد و از کارایی و ایمنی سیستم دارورسانی اطمینان حاصل کرد (۸). همچنین، سطح نانوذرات  $Fe_3O_4$  به‌راحتی قابل اصلاح با پلیمرهای زیست‌سازگار مانند پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) است که باعث افزایش پایداری در محیط زیستی، کاهش حذف توسط سیستم ایمنی و بهبود ظرفیت بارگیری دارو می‌شود (۹). این اصلاح سطحی امکان اتصال لیگاندهای هدفمند مانند فولیک‌اسید و گلوکز را فراهم می‌کند تا نانوذرات به‌صورت انتخابی به سلول‌های سرطانی متصل شوند و رهایش دارو دقیقاً در محل مورد نظر انجام شود (۱۰). علاوه بر این، اندازه کوچک نانوذرات  $Fe_3O_4$  و نسبت سطح به حجم بالای آن‌ها موجب افزایش جذب سلول‌های سرطانی و ورود مؤثر دارو به درون سلول‌ها می‌شود (۱۱). همچنین، خاصیت مغناطیسی این نانوذرات امکان استفاده از آن‌ها در درمان‌های ترکیبی، مانند تلفیق دارورسانی هدفمند و درمان حرارتی مغناطیسی—جایی که نانوذرات تحت میدان مغناطیسی متناوب حرارت تولید کرده و سلول‌های سرطانی را به‌صورت انتخابی از بین می‌برند—را فراهم می‌کند (۱۲). به‌طور کلی، نانوذرات  $Fe_3O_4$  با ترکیب ویژگی‌های مغناطیسی، قابلیت اصلاح سطحی، زیست‌سازگاری و توانایی حمل و رهایش کنترل‌شده دارو، یک پلتفرم ایده‌آل برای دارورسانی هدفمند و افزایش کارایی درمان سرطان فراهم می‌کنند (۱۳). پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) یکی از مهم‌ترین پلیمرهای زیست‌سازگار در دارورسانی نانوذرات است و نقش‌های متعددی در بهبود

عملکرد سیستم‌های هدفمند دارد (۱۴). PEG علاوه بر افزایش زیست‌سازگاری نانوذرات، مانع از شناسایی سریع آن‌ها توسط سیستم ایمنی بدن می‌گردد؛ بنابراین نانوذرات زمان طولانی‌تری در گردش خون باقی می‌مانند و شانس بیشتری برای رسیدن به محل تومور دارند (۱۵). همچنین، استفاده از PEG موجب افزایش پایداری نانوذرات در محیط‌های آبی و زیستی شده و از تجمع ناخواسته یا انعقاد آن‌ها جلوگیری می‌کند. این پلیمر با ایجاد یک لایه هیدروفیلیک اطراف نانوذرات، جذب غیراختصاصی پروتئین‌ها را کاهش داده و به اصطلاح «اثر پوششی» ایجاد می‌کند که موجب کاهش پاکسازی سریع توسط طحال و کبد می‌شود. علاوه بر این، PEG امکان بارگیری مؤثر داروهای مختلف (آب‌دوست و یا آب‌گریز) را فراهم می‌آورد و با اصلاح سطح نانوذرات، امکان اتصال لیگندهای هدفمند مانند فولیک‌اسید و گلوکز برای شناسایی سلول‌های سرطانی را میسر می‌سازد (۱۶). از همه مهم‌تر، PEG نقش کلیدی در بهبود توزیع دارو در بدن، افزایش رهايش کنترل‌شده و کاهش سمیت سیستمیک داروها دارد (۱۰). به این ترتیب، حضور PEG در نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEI علاوه بر افزایش عملکرد فیزیکی و شیمیایی نانوذره، به ایجاد یک سیستم دارورسانی هدفمند، ایمن و مؤثر کمک می‌کند. از سوی دیگر، پلی‌لاکتیک‌اسید (PLA) یکی از پلیمرهای پرکاربرد در دارورسانی هدفمند است که به دلیل زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری خود، نقش مهمی در ساخت نانوحامل‌ها دارد (۱۶). PLA به صورت طبیعی در بدن تجزیه می‌شود و به محصولات بی‌ضرری مانند دی‌اکسیدکربن و آب تبدیل می‌گردد؛ بنابراین استفاده از آن باعث کاهش سمیت سیستمیک و عوارض جانبی می‌شود (۱۷). نانوذرات سنتز شده از PLA می‌توانند داروهای هیدروفوبیک و هیدروفیل را بارگیری کنند و با کنترل ساختار و اندازه ذرات، رهايش تدریجی و کنترل‌شده دارو را فراهم آورند که موجب افزایش اثربخشی درمان و کاهش دفعات تجویز دارو می‌شود (۱۸). علاوه بر این، PLA به راحتی با سایر پلیمرها مانند PEG یا PEI ترکیب می‌شود تا نانوذرات چندمنظوره‌ای بسازد که علاوه بر پایداری بالا، از زیست‌سازگاری و قابلیت اصلاح سطح با لیگندهای هدفمند مانند فولیک‌اسید و گلوکز نیز برخوردار باشند که برای شناسایی سلول‌های سرطانی اهمیت بالایی دارد (۱۹). همچنین، استفاده از PLA به عنوان بخش اصلی یا پوشش نانوذره، ظرفیت بارگیری دارو را افزایش داده و می‌تواند به ایجاد سیستم‌های دارورسانی هدفمندی کمک کند که هم کارایی بالایی داشته باشند و هم کم‌ترین آسیب را به سلول‌های سالم وارد کنند (۲۰). به کارگیری لیگندهای اختصاصی سطح سلول‌های سرطانی در طراحی نانوذرات هدفمند، به عنوان یکی از رویکردهای نوین و کارآمد در حوزه نانودارورسانی و ژن‌درمانی شناخته می‌شود (۲). بسیاری از سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های سالم، بیان بیش از حد گیرنده‌های خاصی را در سطح خود نشان می‌دهند. الحاق لیگندهای مکمل این گیرنده‌ها به سطح نانوذرات، امکان شناسایی انتخابی و اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطانی را فراهم می‌سازد (۲۱). این ویژگی منجر به افزایش جذب سلولی از طریق مکانیسم‌هایی نظیر اندوسیتوز وابسته به گیرنده شده و در نتیجه، کارایی انتقال ترکیبات درمانی به طور چشم‌گیری بهبود می‌یابد (۱). از مهم‌ترین مزایای این رویکرد می‌توان به افزایش اختصاصیت دارورسانی، بهبود راندمان انتقال دارو یا ژن، کاهش دوز مصرفی و کاهش سمیت سیستمیک ناشی از اثرات غیراختصاصی بر بافت‌های سالم اشاره نمود (۲۲). افزون بر این، امکان طراحی نانوذرات با لیگندهای چندگانه، دستیابی به هدف‌گیری هم‌زمان چند مسیر زیستی را فراهم می‌آورد که می‌تواند به غلبه بر مقاومت دارویی و ارتقای نتایج درمانی کمک نماید (۴). در این میان، فولیک‌اسید (FA) (به عنوان یکی از پرکاربردترین لیگندها در سامانه‌های هدفمندسازی نانوذرات مطرح است. دلیل اصلی این امر، بیان بیش از حد گیرنده فولیک‌اسید در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان سینه، تخمدان و ریه می‌باشد (۱۹). بارگذاری فولیک‌اسید در سطح نانوذرات نه تنها موجب افزایش تمایل و اختصاصیت اتصال به سلول‌های سرطانی می‌شود، بلکه فرآیند ورود درون سلولی ترکیبات درمانی را نیز تسهیل می‌کند (۲۰). هم‌چنین، فولیک‌اسید به دلیل اندازه کوچک، پایداری بالا، زیست‌سازگاری مطلوب و ایمنی‌زایی پایین، گزینه‌ای ایده‌آل برای استفاده در طراحی سامانه‌های نوین دارورسانی و ژن‌درمانی به شمار می‌رود (۲۳). از سوی دیگر، گلوکز

به‌عنوان جزء نویدبخشی در سامانه‌های انتقال ژن مطرح شده است، به‌ویژه برای بهبود هدف‌گیری و جذب ژن‌های درمانی توسط سلول‌های سرطانی (۲۴). به دلیل نیاز متابولیکی بالای بسیاری از سلول‌های سرطانی که اغلب مصرف گلوکز افزایش یافته‌ای نشان می‌دهند (پدیده‌ای که به اثر واربرگ معروف است)، الحاق گلوکز به حامل‌های انتقال ژن می‌تواند از این ترجیح متابولیکی بهره‌برداری کند (۲۵). با عاملی‌سازی نانوذرات یا لیپوزوم‌ها با گروه‌های گلوکز، پژوهشگران می‌توانند سامانه‌های انتقال هدفمندی ایجاد کنند که به طور اختصاصی به ناقل‌های گلوکز که در سطح سلول‌های سرطانی بیش‌بیان می‌شوند متصل شوند. این راهبرد نه تنها کارایی جذب ژن را افزایش می‌دهد بلکه اثرات ناخواسته بر بافت‌های سالم را نیز به حداقل می‌رساند. افزون بر این، حامل‌های اصلاح‌شده با گلوکز می‌توانند پایداری و حلالیت اسیدهای نوکلئیک را افزایش داده و انتقال آن‌ها به‌درون سلول‌ها را تسهیل کنند (۲). اسید فولیک (FA) و گلوکز در این مطالعه برای گیرنده‌های سلولی ثانویه به‌کار گرفته شدند، زیرا زیست‌سازی، جذب سلولی، سازوکار هدف‌گیری و اثرات هم‌افزای بهتری ارائه می‌دهند. در ژن‌درمانی و درمان سرطان، ترکیب ویژگی‌های هدف‌گیری گلوکز و اسید فولیک در سامانه‌های انتقال ژن، رویکردی نویدبخش به‌شمار می‌رود. این پژوهش با هدف طراحی نانوذرات چندمنظوره‌ای انجام شد که کارایی انتقال ژن به بافت‌های سرطانی را افزایش داده و اثرات ناخواسته بر سلول‌های طبیعی را کاهش دهد. بدین منظور، از PLA برای بارگیری و انتقال دارو استفاده شد. به‌منظور افزایش زمان گردش سیستمیک و انتقال انتخابی به سلول‌های سرطان سینه، پلیمر انشعابی با کونژوگه‌های پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) اسید فولیک و گلوکز اصلاح شد. هم‌چنین از نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> برای انتقال هدفمند دارو به سلول‌های هدف (لاین‌های سلولی Hs-578T) استفاده شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

**مواد:** کلرید پتاسیم (KCl)، متیل سولفوکسید ((DMSO, 4)-5,3-دی متیل-۲-تیاژولیل)-۲،۵-دی فنیل-H<sub>2</sub>-تترازولیوم بروماید (MTT)، اتانول، هیدروکلریک‌اسید (HCL)، سدیم کلراید (NaCl)، دی‌هیدروژن فسفات پتاسیم (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)، کلروفرم، NH<sub>2</sub>-PEG-Glu، NH<sub>2</sub>-PEG-FA و هیدروکسید سدیم (NaOH) از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. پارافرمالدهید از آزمایشگاه شیمی دکتر موجال (ایران) تهیه شد. سرم جنین گاوی (FBS)، محیط کشت DMEM و تریپسین-EDTA از شرکت Biowest (ایالات متحده آمریکا) خریداری شدند.

**سنتز نانوذرات (PPF)، PLA-PEG-Glu (PPG) و PLA-PEG-Glu/FA (PPGF):** جهت سنتز نانوذرات PPF ابتدا ۳۰ میکرومول NH<sub>2</sub>-PEG-FA و ۱۰ میکرومول آکریلات-PLA به صورت جداگانه در ۳ میلی‌لیتر کلروفرم حل شدند. سپس محلول کلروفرم حاوی NH<sub>2</sub>-PEG-FA به صورت قطره‌ای به محلول کلروفرم-آکریلات-PLA در دمای ۴۰ الی ۴۵ درجه سانتی‌گراد اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت تحت هم‌زده مکانیکی قرار گرفتند. خالص‌سازی PLA-PEG-FA از طریق فرآیند دیالیز در آب دیونیزه به مدت ۲ روز با جایگزین کردن آب در هر ۶ ساعت انجام شد. سرانجام، محصول با استفاده از دستگاه Freeze Dryer (LMC-2, Rubarth, Germany) خشک شد. علاوه بر این، سنتز نانوذرات PPG از طریق واکنش NH<sub>2</sub>-PEG-Glu با آکریلات-PLA همانطور که در بالا توضیح داده شد، انجام شد (۳). هم‌چنین سنتز نانوذرات PPGF نیز با ترکیب هر دو مولکول NH<sub>2</sub>-PEG-Glu/FA و آکریلات-PLA انجام شده و مابقی مراحل همان‌طور که در بالا ذکر شد، انجام شد.

**تهیه عصاره متانولی از گیاه خار مریم و سنتز سبز نانوذرات اکسید آهن (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>):** عصاره خارمریم به‌عنوان عامل زیستی در سنتز سبز نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> عمل نموده و با داشتن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی (به‌ویژه سیلیمارین)، نقش احیاکننده یون‌های

آهن و پایدارکننده نانوذرات را بر عهده دارد. این ترکیبات با کنترل رشد و تجمع ذرات، موجب تشکیل نانوذرات پایدار با اندازه یکنواخت و کاهش نیاز به عوامل شیمیایی سمی در فرآیند سنتز می‌شوند. برای این منظور نمونه گیاه (اندام هوایی) خار مریم (*Silybum marianum*) از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج جمع‌آوری شد. عصاره متانولی خار مریم با اضافه کردن ۱۰ گرم برگ پودر شده به ۱۰۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد تهیه شد. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه تحت امواج فراصوت با فرکانس ۳۰ کیلوهرتز و قدرت ۱۵۰ وات قرار گرفت و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌طور مداوم تکان داده شد. سپس عصاره حاصل سانتریفیوژ شد تا بقایای گیاهی حذف شود و در نهایت از طریق کاغذ صافی استاندارد فیلتر شد تا عصاره متانولی شفاف به دست آید. نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> با استفاده از روش هم‌رسوبی سنتز شدند. ابتدا به یک بالن سه دهانه‌ی ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه، ۳/۳ گرم هگزاآهیدرات کلرید آهن (III) (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) و ۳/۳ گرم تتراهیدرات کلرید آهن (II) (FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O) اضافه شد. پس از نصب دماسنج به یکی از دهانه‌ها، گاز نیتروژن به سیستم تزریق شد تا یک اتمسفر بی‌اثر ایجاد شود. محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد هم زده شد. متعاقباً، ۱۵ میلی‌لیتر عصاره هیدروآلکلی خار مریم به تدریج و تحت هم‌زدن مداوم اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه، ۶۰ میلی‌لیتر محلول ۱ مولار NaOH به‌صورت قطره قطره اضافه شد. تشکیل نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> با تغییر رنگ از قهوه‌ای به سیاه نشان داده شد. نانوذرات با استفاده از یک آهنربای خارجی جمع‌آوری و با آب دیونیزه کاملاً شسته شدند تا ناخالصی‌های باقیمانده حذف شوند (۲۶). پس از خشک کردن نمونه‌ها توسط دستگاه انجماد خشک (LMC-2, Rubarth, Germany) جهت حفظ ویژگی‌های ساختاری نانوذرات، آن‌ها را در مکانی تاریک و خشک و دمای اتاق نگهداری شدند.

**تهیه نانوذرات (PPFFe/CUR) (PPGF/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-OA/CUR) (PPGFe/CUR) و PPG/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-OA/CUR**

ارسال هدفمند دارو به سلول‌های سرطانی پستان (لاین‌های سلولی Hs-578T) با استفاده از اسید فولیک و گلوکز انجام شد. نانوذرات PPGFe/CUR، PPFFe/CUR و PPGFFe/CUR با ترکیب مقادیر مناسب کورکومین (CUR)، Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-OA، PPF و PPG (جدول ۱) تهیه شدند. بدین منظور، ابتدا مقدار مناسبی از CUR (با وزن مولکولی) در ۶ میلی‌لیتر کلروفرم حاوی PPF یا PPG و یا ترکیب هر دو (PPGF) و Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-OA به آرامی تزریق شد. پس از ۳۰ ثانیه، ترکیب به دست آمده تحت سونیکاسیون (روی یخ و ۳۰ کیلوهرتز) قرار گرفت. سپس محصولات به دست آمده در ۶ میلی‌لیتر محلول PVA یک درصد (با وزن مولکولی) اضافه شده و فرایند سونیکاسیون دوباره اجرا شد. در ادامه، ۳۰ میلی‌لیتر محلول PVA ۳ درصد (با وزن مولکولی) به آن اضافه شده و محلول نهایی تحت هم‌زدن مکانیکی شدید (۱۰۰ دور در دقیقه) و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در پایان به منظور حذف حلال کلروفرم مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه توسط دستگاه دوار (روتاری) و در خلاء مورد چرخش قرار گرفت. سپس، نانوذرات حاصل جمع‌آوری و چندین بار با آب دیونیزه شسته شدند (۲۷). در مرحله بعدی، نانوذرات توسط فیلتر غشایی ۰/۴۵ و ۰/۱ میکرومتر فیلتر شدند تا ذرات با اندازه بزرگ و ترکیبات آزاد (به‌عنوان مثال CUR بدون پوشش) حذف شوند. سرانجام، نانوذرات، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۱: ترکیبات مورد استفاده جهت سنتز نانوذرات مختلف

CUR	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (mg/ml)	PLA-PEG-Glu (mg/ml)	PLA-PEG-FA (mg/ml)	نوع نانوذره
-	-	-	۲۵	PPF
-	-	۲۵	-	PPG
-	-	۱۲۵	۱۲۵	PPGF
۱	-	-	۲۵	PPF/CUR
۱	-	۲۵	-	PPG/CUR
۱	-	۱۲۵	۱۲۵	PPGF/CUR
۱	۲	-	۲۵	PPFFe/CUR
۱	۲	۲۵	-	PPGFe/CUR
۱	۲	۱۲۵	۱۲۵	PPGFFe/CUR

تعیین مشخصات فیزیکوشیمیایی نانوذرات: ویژگی‌های ساختاری و تایید ترکیبات موجود در نانوذرات سنتز شده PPF و PPG توسط طیف سنجی تشدید مغناطیسی هسته‌ای هیدروژن (<sup>1</sup>H-NMR) و به کمک دستگاه (Bruker Avance Neo) و به کمک دستگاه مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) و با استفاده از روش قرص‌های KBr در منطقه  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Bomem-MB 100, ABB, Kanada) انجام شد (۲۸). مورفولوژی نانوذرات PPGFe/CUR، PPFFe/CUR و PPGFFe/CUR توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM, JEM-2100, JEOL Ltd, Japan) با ولتاژ شتاب-دهنده ۲۰۰ کیلوولت مشاهده شد. همچنین اندازه متوسط نانوذرات و پتانسیل زتا آن‌ها با استفاده از پراکندگی نور پویا (DLS, Malvern Instruments, Westborough, USA) تعیین شد (۲۹).

PDI معیاری برای توزیع جرم مولکولی در یک نمونه معین است. در زمینه نانوذرات، PDI بینشی در مورد یکنواختی اندازه ذرات ارائه می‌دهد. PDI پایین‌تر نشان‌دهنده نمونه یکنواخت‌تر است، در حالی که PDI بالاتر نشان‌دهنده توزیع اندازه وسیع‌تر است. مقادیر PDI نانوذرات به شرح زیر تعیین شد:

$$PDI = \frac{M_w}{M_n}$$

( $M_w$  = میانگین وزن مولکولی،  $M_n$  = متوسط وزن مولکولی)

مقادیر  $M_w$  و  $M_n$  به کمک معادلات زیر تعیین می‌شود

$$M_w = \frac{\sum(N_i \cdot M_i^2)}{\sum(N_i \cdot M_i)} \quad M_n = \frac{\sum(N_i \cdot M_i)}{\sum N_i}$$

که در این فرمول  $N_i$ : تعداد نانوذرات و  $M_i$ : جرم نانوذرات است

بازدهی بارگذاری داروی کورکومین: بازدهی انکپسولاسیون داروی کورکومین در نانوذرات با اندازه‌گیری مقدار کورکومینی که در نانوذرات، انکپسوله نشده تعیین شد. بنابراین، مقدار CUR موجود در مایع رویی لوله آزمایش، پس از سانتریفوژ سوسپانسیون نانوذرات توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۲۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس مقدار CUR موجود در مایع رویی با مقدار کل CUR استفاده شده در فرآیند بارگذاری مقایسه شد (۱۳). بازدهی بارگذاری CUR به شرح زیر تعیین شد (معادله ۱):

$$\text{مقدار CUR مورد استفاده برای تهیه نانوذرات} - \text{مقدار CUR در مایع رویی} = \frac{\text{مقدار CUR مورد استفاده برای تهیه نانوذرات}}{\text{مقدار CUR مورد استفاده برای تهیه نانوذرات}} \times 100$$

**سینتیک آزادسازی دارو:** برای مقایسه سینتیک انتشار CUR بین نانوذرات، نانوذرات حاوی دارو همانطور که در بالا توضیح داده شد تهیه شدند. سپس آزمایشات در دو محیط مختلف با pH متفاوت (pH=۷/۴ محیط اطراف سلول‌های سالم) و (pH=۴/۵ محیط اطراف سلول‌های سرطانی) انجام شد. برای تعیین سینتیک آزادسازی، نانوذرات به طور جداگانه در ۱۰ میلی‌لیتر بافر استات سدیم (pH=۴/۵) و محلول گلوکز ۵ درصد (pH=۷/۴) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در فواصل زمانی برنامه ریزی شده (هر ۳۰ دقیقه تا ۳ روز)، پس از سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و ۳۰ دقیقه)، مایع رویی نمونه‌ها برای سنجش آزادسازی جمع‌آوری شد. سپس، تا بازه زمانی بعدی، نانوذرات در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه، مجدداً به حالت سوسپانسیون درآمدند. سرانجام داده‌های حاصل از این آزمایش به کمک مدل سینتیکی Korsmeyer-Peppas مورد تحلیل قرار گرفتند، تا مکانیسم آزادسازی دارو مشخص شود (۳۰).

### مطالعات سمیت سلولی

**میزان IC<sub>50</sub>:** میزان IC<sub>50</sub> (غلظتی که موجب مرگ حداقل ۵۰ درصد سلول می‌شود) نانوذرات با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. برای این منظور سلول‌های Hs-578T به پلیت‌های ۹۶ چاهکی با تراکم سلول ۷×۱۰<sup>۳</sup> سلول در هر چاهک در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل منتقل شدند (محیط DMEM با ۱۰ درصد FBS) و سپس انکوبه شدند (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub>). پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف CUR (صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) و نانوذرات (صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) حاوی داروی CUR و یا بدون دارو (نمونه شاهد) تیمار شده و دوباره انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میکروگرم/میلی‌لیتر در محیط کشت) به هر چاهک اضافه شده و پس از انکوباسیون (۵ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد)، مایع رویی برداشته شده و بلورهای فورمازان توسط DMSO (۲۰۰ میکرولیتر در هر چاهک) حل شد. پس از انکوباسیون (۳۰ دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد)، جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) اندازه‌گیری شد (۲۱).

**آنالیز آپوپتوزیس سلولی:** آپوپتوزیس شامل حرکت فسفاتیدیل‌سرین از غشای پلاسمایی داخلی به غشای پلاسمایی خارجی است که آن را با رنگ‌آمیزی فلورسنت مبتنی بر آنکسین قابل تشخیص می‌کند (۳۱). در این آزمایش جهت تشخیص آپوپتوز از نکروز، از آنکسین به همراه پروپیدیوم دیدید استفاده می‌شود. سلول‌های Hs-578T تیمار شده با نانوذرات PPF<sub>2</sub>Fe/CUR، PPGFe/CUR و PPGFFe/CUR آزاد با استفاده از فلوسایتومتری و کیت Annexin V-Dy634 (Immunostep) و طبق پروتکل تامین‌کننده، برای آپوپتوزیس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. هم‌چنین از سلول‌های تیمار نشده به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. داده‌ها با فلوسایتومتر FACS Verse و نرم‌افزار FlowJo™ نسخه ۱۰ پردازش شدند (۳۲).

### ۳- آنالیز آماری

هر پارامتر اندازه‌گیری شده در این مطالعه در سه تکرار ارزیابی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS22 از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه و به‌دنبال آن آزمون دانکن برای مقایسه‌های چندگانه در آستانه معنی‌داری ۵ درصد انجام شد.

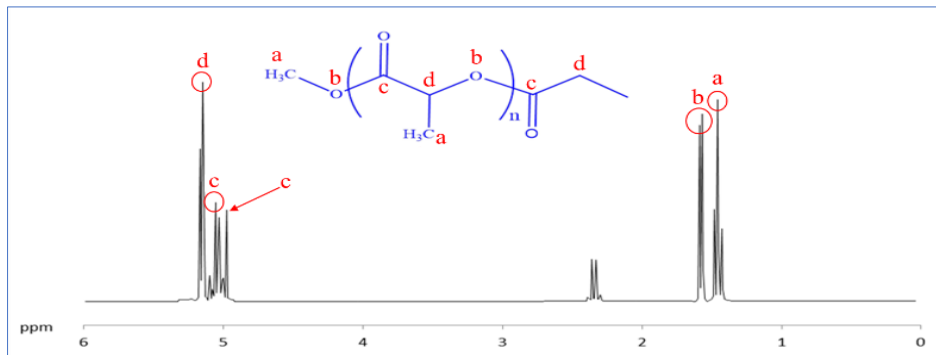
توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. نتایج به صورت مقادیر میانگین با انحراف معیار (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) گزارش شده‌اند.

#### ۴- نتایج

##### بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و تأیید گروه‌های عاملی نانوذرات

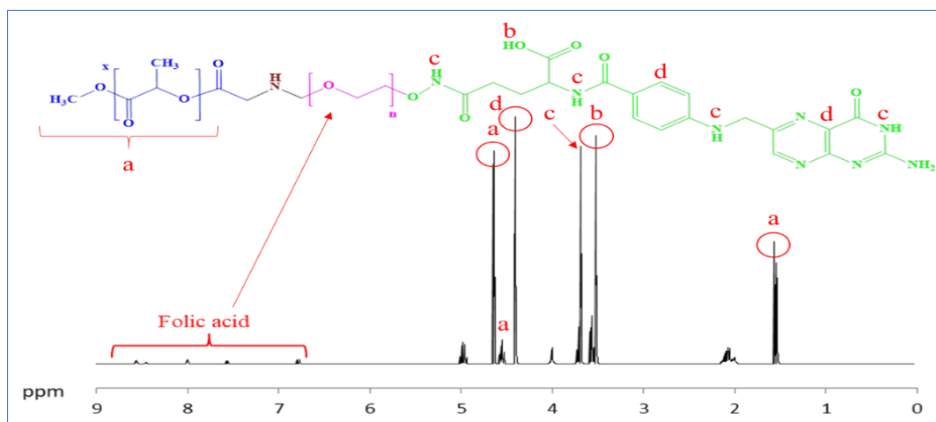
##### <sup>1</sup>H-NMR

نتایج طیف سنجی <sup>1</sup>H-NMR آکریلات PLA نشان داد که قله موجود در محدوده ppm ۱/۴ مربوط به هیدروژن‌های موجود در ترکیب -CH<sub>3</sub> است (شکل ۱- بالا نوشت a). همچنین هیدروژن‌های -OCH<sub>3</sub> در محدوده ppm ۱/۷ مشاهده شد (شکل ۱- بالا نوشت b). علاوه بر این هیدروژن‌های OCH= و -CH- به ترتیب در محدوده ۴/۸ الی ۵/۲ و ۵/۳ ppm مشاهده شد (شکل ۱- بالا نوشت‌های c و d).



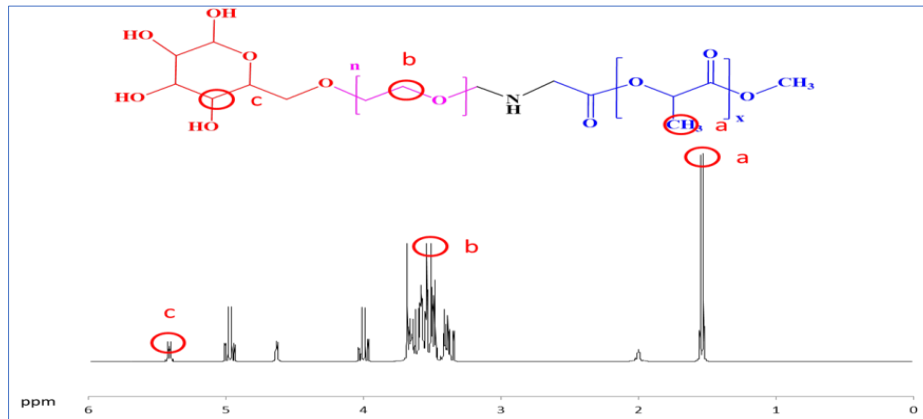
شکل ۱: طیف <sup>1</sup>H-NMR آکریلات PLA

طیف <sup>1</sup>H-NMR نانوذرات PLA-PEG-FA بیانگر وجود هر ۳ ترکیب مذکور بود. طبق نتایج حاصل مشخص شد که یک پیک مجزا مربوط به پروتون‌های هیدروکسیل (-O-H-) در ترکیب پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) در محدوده ppm ۳/۶ مشاهده شد (شکل ۲- بالا نوشت b). همچنین پروتون‌های گروه -NH- و -CH<sub>4</sub> به ترتیب در محدوده ۳/۸ و ۴/۴ ppm ظاهر شدند (شکل ۲- بالا نوشت‌های c و d). همچنین پیک‌های مربوط به اسید فولیک در محدوده ۶/۵ الی ۸/۵ ppm مشاهده شدند. در شکل ۲، پیک‌های مربوط به ترکیب آکریلات PLA با بالا نوشت a نشان داده شده است.



شکل ۲: طیف <sup>1</sup>H-NMR نانوذره PLA-PEG-FA

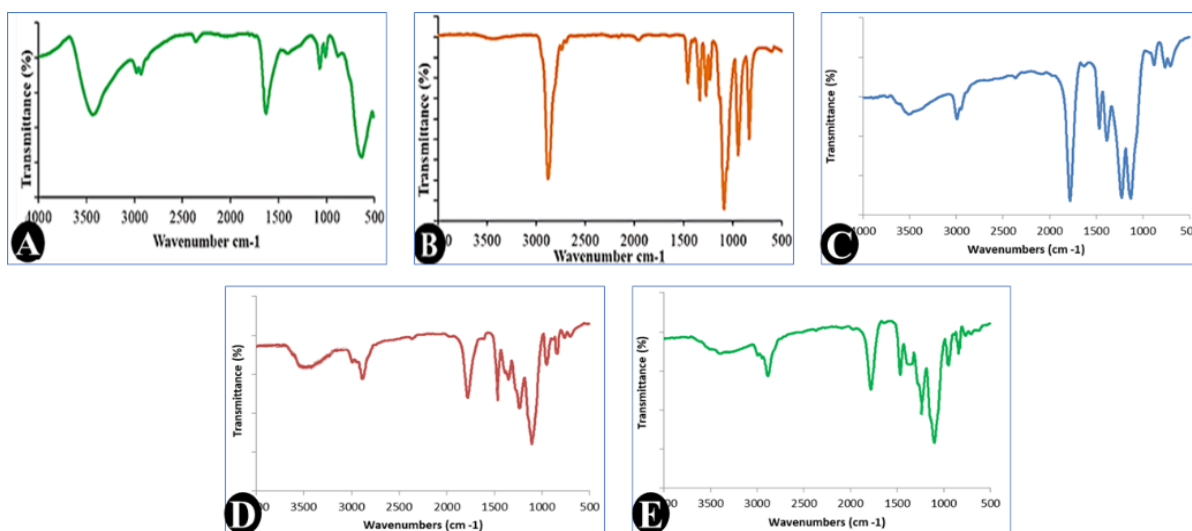
هم‌چنین طبق نتایج به‌دست آمده از طیف سنجی <sup>1</sup>H-NMR نانوذرات PLA-PEG-Glu علاوه بر تأیید نتایج قبلی در شناسایی ترکیباتی نظیر PLA و PEG وجود گلوکز در این ترکیب نیز تأیید شد (شکل ۳).



شکل ۳: طیف سنجی <sup>1</sup>H-NMR نانوذرات PLA-PEG-Glu

## FTIR

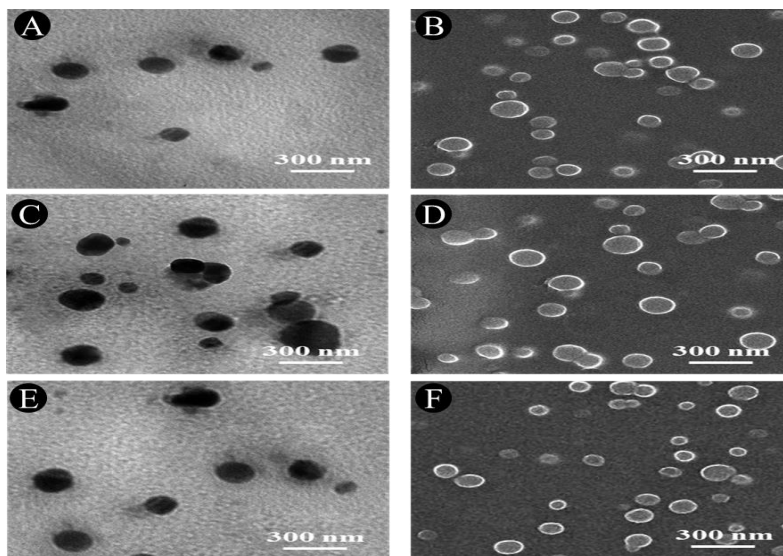
به‌منظور بررسی گروه‌های عاملی موجود در نانوذرات PLA، PLA-PEG-Glu و PLA-PEG-FA از طیف نگاره FTIR استفاده شد. طبق نتایج به‌دست آمده (شکل ۴)، طبق نتایج به‌دست آمده از طیف FTIR نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> مشخص شد که پیک‌های پهن و مشخص در محدوده  $cm^{-1} 570$  و  $cm^{-1} 2950$  به‌ترتیب با ارتعاش کششی پیوندهای C-H و Fe-O مرتبط هستند (شکل ۴-A). علاوه بر این، ارتعاش کششی پیوندهای C-H در محدوده  $cm^{-1} 980$  در طیف FTIR نانوذرات PEG مشاهده شد. این درحالی است که پیک قوی و مشخص (مربوط به C-O-C) در محدوده  $cm^{-1} 1183$  نیز مشاهده شد (شکل ۴-B). گروه‌های C=O و C-H در PLA توسط طیف‌های مربوط به PLA به‌ترتیب در  $1759$ ،  $2955$  و  $3100$   $cm^{-1}$  شناسایی شدند (شکل ۴-C). پس از اتصال PEG-FA به PLA و هم‌چنین اتصال نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> به ترکیب حاصل، تغییرات قابل ملاحظه‌ای در طیف FTIR مشاهده شد. مهم‌ترین تغییر، ظهور یک پیک پهن در محدوده  $3300$  تا  $3500$   $cm^{-1}$  بود که به‌دلیل هم‌پوشانی کشش گروه‌های هیدروکسیل (O-H) و آمین (N-H) موجود در ساختار اسید فولیک ایجاد شد. هم‌چنین، ظهور پیک جدید در محدوده  $1600$  تا  $1650$   $cm^{-1}$  (ناشی از خمش N-H و کشش C=C حلقه‌های آروماتیک) و نیز در محدوده  $1480$  تا  $1580$   $cm^{-1}$  (مربوط به کشش C=C آروماتیک) تأییدکننده موفقیت‌آمیز بودن اتصال کووالانسی لیگاند اسید فولیک به سطح نانوذره بود (شکل ۴-D). در مقابل، اصلاح سطح نانوذره با گلوکز، الگوی طیفی نسبتاً متمایزی را نشان داد. بارزترین تغییر، افزایش شدت و پهنای باند جذبی در ناحیه  $3200$  تا  $3600$   $cm^{-1}$  بود که حاکی از حضور تعداد زیادی گروه هیدروکسیل (O-H) از مولکول گلوکز متصل شده است. علاوه بر این، تغییر شکل و تقویت قابل توجه پیک‌های موجود در محدوده  $1000$  تا  $1150$   $cm^{-1}$ ، که به کشش پیوندهای C-O نسبت داده شد، شاهد دیگری بر موفقیت‌آمیز بودن فرآیند اصلاح سطح با این قند بود (شکل ۴-E).



شکل ۴: طیف FTIR نانوذرات به ترتیب (A) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, (B) PEG, (C) PLA, (D) PPF, (E) و PPG

### تصاویر TEM و SEM

تصاویر مربوط به TEM و SEM نانوذرات PPGFe/CUR, PPFFe/CUR, PPGFe/CUR و PPGFFe/CUR نشان داد که این نانوذرات دارای شکل کروی با سطح صاف و توزیع یکنواخت و قطر ۱۵۰-۲۰۰ نانومتر هستند (شکل ۵). ساختار کروی در نانوذرات میسلی شکل به طور کلی به دلیل خود آرایی کوپلیمرهای قطعه‌ای دوگانه دوست در محلول‌های آبی قابل مشاهده است (۱۴).



شکل ۵: خصوصیات مورفولوژی نانوذرات (A, C, E) تصویر TEM از نانوذرات PPGFe/CUR, PPFFe/CUR, PPGFe/CUR و PPGFFe/CUR (B, D) و (F) تصویر SEM از نانوذرات PPGFe/CUR, PPFFe/CUR و PPGFFe/CUR

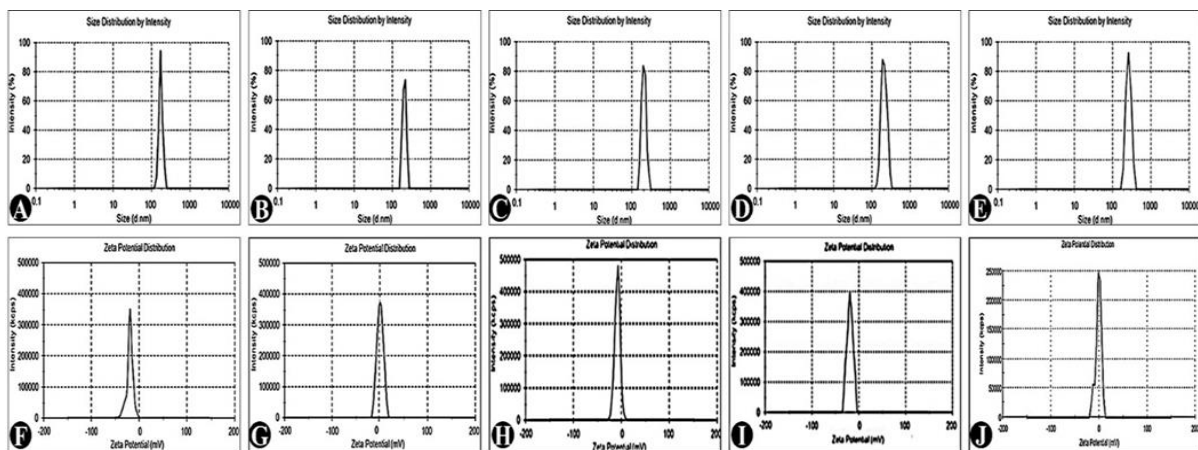
### DLS

طبق نتایج به دست آمده از DLS (جدول ۲)، کم‌ترین و بیش‌ترین اندازه نانوذرات به ترتیب در نانوذرات PPF (۱۷۹ نانومتر) (شکل ۶-A) و PPGFe/CUR (۲۱۲ نانومتر) (شکل ۶-E) مشاهده شد. علاوه بر این انکپسوله شدن CUR و Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> در نانوذرات PPF, PPG و PPGF موجب افزایش اندازه آن‌ها شد. با این حال، تفاوت قابل توجهی در اندازه بین این نانوذرات وجود

ندارد. هم‌چنین نتایج حاصل از بررسی پتانسیل زتای نانوذرات نشان داد که به‌طور کلی بار سطحی نانوذرات کمی منفی بودند. به‌عنوان مثال، میانگین پتانسیل زتای نانوذرات PPF/Fe/CUR، PPG/Fe/CUR و PPGFFe/CUR به ترتیب  $-۴/۵ \pm ۰/۵۰$ ،  $-۲/۳ \pm ۰/۵۳$  و  $-۳/۷ \pm ۰/۳$  (میلی‌ولت) بود (جدول ۲). احتمالاً علت کاهش پتانسیل زتا در نانوذرات، وجود گروه‌های کربوکسیل آنیونی در بخش PLA است. شاخص پراکندگی ذرات (PDI) یک پارامتر کمی است که میزان یکنواختی یا ناهمگونی توزیع اندازه نانوذرات در یک محلول را نشان می‌دهد. هرچه این شاخص به صفر نزدیک‌تر باشد، نمونه از نظر اندازه یکنواخت‌تر (تک‌پخش) است (۳۳). همان طوری که از جدول ۲ استنباط می‌شود افزایش ترکیبات انکپسوله شده در نانوذرات نظیر دارو یا اکسید آهن موجب افزایش شاخص PDI می‌شود. هم‌چنین مشخص شد که اصلاح نانوذرات با گلوکز نسبت به فولیک‌اسید، این شاخص را به‌طور نسبی افزایش می‌دهد.

جدول ۲: اندازه، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی ذرات (PDI) نانوذرات سنتز شده

نوع نانوذره	اندازه ذرات (nm) ± SD	پتانسیل زتا (mV) ± SD	PDI
PPF	۱۷۹ ± ۱۶	-۳/۱۴ ± ۰/۳۴	۰/۳۲ ± ۰/۰۸
PPG	۱۹۱ ± ۹	-۴/۱ ± ۰/۱۷	۰/۴۳ ± ۰/۰۷
PPGF	۱۹۳ ± ۱۷	-۲/۵ ± ۰/۵۲	۰/۷۶ ± ۰/۱۲
PPF/CUR	۱۸۶ ± ۱۳	-۴/۵ ± ۰/۵۰	۰/۵۱ ± ۰/۰۹
PPG/CUR	۱۹۱ ± ۱۵	-۲/۳ ± ۰/۵۳	۰/۶۲ ± ۰/۱۱
PPGF/CUR	۱۸۱ ± ۱۲	-۳/۷ ± ۰/۳	۰/۸۹ ± ۰/۱۳
PPFFe/CUR	۲۰۱ ± ۱۶	۰/۴ ± ۰/۱۶	۰/۶۸ ± ۰/۰۹
PPGFe/CUR	۲۰۷ ± ۱۳	-۱/۲ ± ۰/۴۱	۰/۷۷ ± ۰/۱۰
PPGFFe/CUR	۲۱۲ ± ۹	-۲/۲ ± ۰/۳	۰/۹۵ ± ۰/۱۵

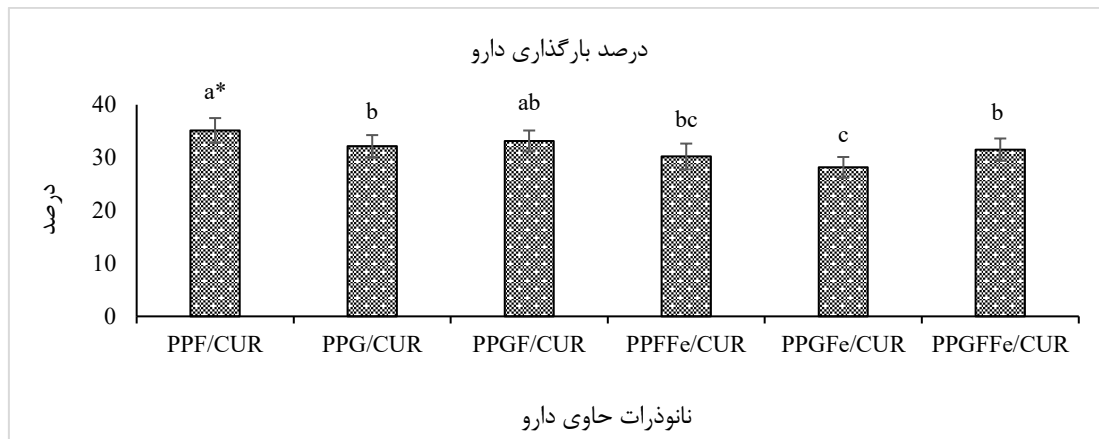


شکل ۶: اندازه و پتانسیل نانوذرات (A تا E) اندازه نانوذرات PPF، PPG، PPGF، PPF/Fe/CUR و PPGFFe/CUR؛ (F تا J) پتانسیل زتای نانوذرات PPF، PPG، PPGF، PPF/Fe/CUR و PPGFFe/CUR.

### درصد بارگذاری داروی CUR

طبق نتایج به‌دست آمده از درصد بارگذاری داروی کورکومین در نانوذرات سنتز شده (شکل ۷)، مشخص شد که بین نانوذرات مختلف ظرفیت بارگذاری متفاوت با درصد معنی‌داری وجود دارد. به‌عنوان مثال بیشترین ظرفیت بارگذاری دارو (۳۵/۱۴ درصد)

در نانوذرات PPF مشاهده شد که به طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها به غیر از PPGF بود (شکل ۷). هم چنین از نتایج به دست آمده از بارگذاری دارو در نانوذرات چنین استنباط می شود که استفاده از گلوکز به جای اسید فولیک میزان بارگذاری دارو را به طور معنی داری کاهش می دهد. به طوری که درصد بارگذاری داروی کورکومین در نانوذرات حاوی اسید فولیک تنها (PPF) برابر با ۳۵/۱۴ درصد بود که با جایگزینی گلوکز به جای فولیک اسید این میزان به ۳۲/۱۵ درصد کاهش یافت. هم چنین افزودن گلوکز به نانوذره دارای اسید فولیک نیز میزان بارگذاری را کاهش داد. اما وجود اکسید آهن تاثیر معنی داری بر درصد بارگذاری دارو نداشت (شکل ۷).



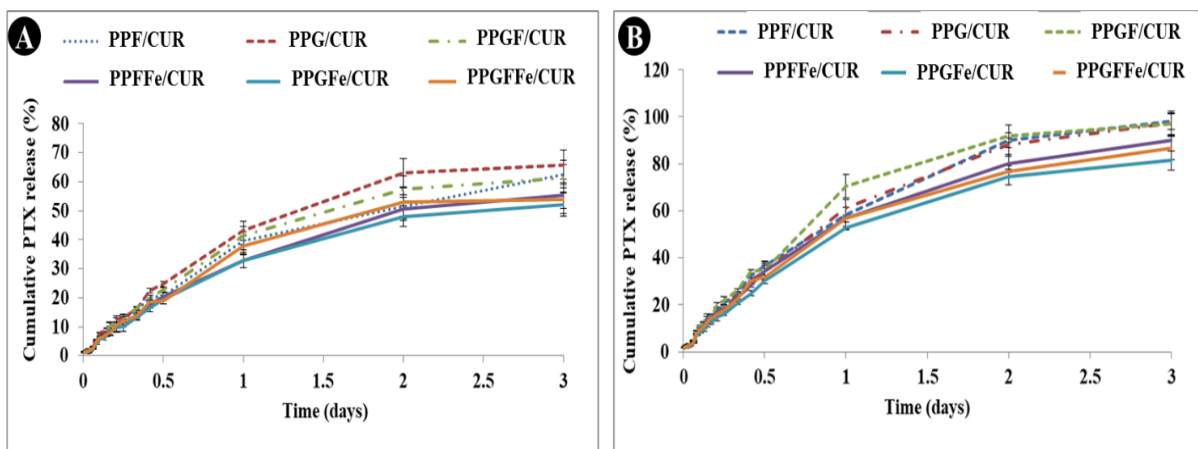
شکل ۷: درصد بارگذاری داروی کورکومین در نانوذرات سنتز شده

\*حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها در هر مقطع زمانی بر اساس آزمون چنددامنه ای دانکن است

### بررسی الگوی رهش CUR از نانوذرات PPF/CUR, PPG/CUR, PPGF/CUR, PPFFe/CUR, PPGFe/CUR و PPGFFe/CUR

طبق نتایج به دست آمده از رهش داروی کورکومین از نانوذرات سنتز شده، مشخص شد که میزان رهش دارو وابسته به pH بوده و کاهش pH از ۷/۴ به ۴/۸ امکان رهش دارو از نانوذرات را افزایش می دهد (شکل ۸-A و B). طبق نتایج به دست آمده مشخص شد که انکپسولاسیون نانوذرات اکسید آهن امکان رهش دارو در هر دو محیط pH را افزایش داد. به عنوان مثال میزان رهش دارو از نانوذرات PPF/CUR, PPG/CUR و PPGF/CUR در pH ۷/۴ به ترتیب برابر با ۴۷، ۴۲ و ۴۵ درصد بود که پس از افزودن Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> به نانوذرات مذکور و سنتز نانوذرات PPFFe/CUR, PPGFe/CUR و PPGFFe/CUR به ترتیب به ۶۲، ۶۵ و ۶۱ درصد افزایش یافت (شکل ۸-A). که این امر می تواند به دلیل افزایش قطبیت نانوذرات با افزودن اکسید آهن باشد که میزان رهش دارو را افزایش می دهد. از سویی دیگر به نظر می رسد که Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> به دلیل خواص آب دوست بودن، به عنوان کانال آب در سراسر هسته آگریز نانوذرات عمل می کند. انتقال آب از طریق این کانال ها به سمت هسته هیدروفوبیک نانوذرات روند تخریب نانوذرات را تسریع می کند (۳۴). هم چنین مشخص شد که الگوهای انتشار داروی کورکومین از نانوذرات یک فرآیند دو مرحله ای است: در مرحله اول، نسبت انتشار CUR از نانوذرات به طور انفجاری رخ داده، سپس در مرحله دوم انتشار به طور پایدار ادامه یافته است. به طور کلی، بیش از ۵۰ درصد داروی منتشر شده پس از ۳ روز انکوباسیون، در روز اول آزاد شد. به عنوان مثال، انتشار CUR از PPFFe/CUR پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در محیط با pH ۷/۴ برابر با ۳۲ درصد بود، در حالی که کل انتشار دارو از همین نانوذره پس از ۳ روز ۶۲ درصد بود. از سویی دیگر همانطور که در شکل ۸-A و B نشان داده شده است،

می‌توان بیان کرد که سینتیک انتشار داروی CUR از نانوذرات وابسته به زمان است. به طوریکه مقدار CUR آزاد شده از نانوذرات، با افزایش مدت زمان انکوباسیون، افزایشی بود. نتایج حاصل از ارزیابی مشخصات رهایش CUR در شرایط اسیدی (pH=۴/۷) که در شکل ۸-B ارائه شده است، بیانگر عملکرد مطلوب سیستم نانوحامل طراحی شده در رهایش کنترل شده دارو در محیط اسیدی (محیط اطراف سلول‌های سرطانی) است. با توجه به این که پس از تزریق نانوذرات به جریان خون و رسیدن به بافت هدف، ورود آن‌ها به درون سلول‌ها عمدتاً از مسیر اندوزومی صورت می‌گیرد و با توجه به گزارش‌های موجود، بخش عمده‌ای از داروی وارد شده به سلول از این طریق، توسط لیزوزوم شناسایی و متعاقباً حذف می‌شود (۳۵)، لذا رهایش سریع و کارآمد دارو در محیط اسیدی اندوزوم، پیش از ادغام با لیزوزوم، از اهمیت حیاتی برخوردار است. یافته‌های حاضر حاکی از آن است که نانوذرات طراحی شده قادرند با بهره‌گیری از شرایط اسیدی این محفظه‌های درون‌سلولی، رهایش موثری را انجام دهند که این امر احتمال حذف دارو را کاهش داده و کارایی درمانی را افزایش می‌دهد.



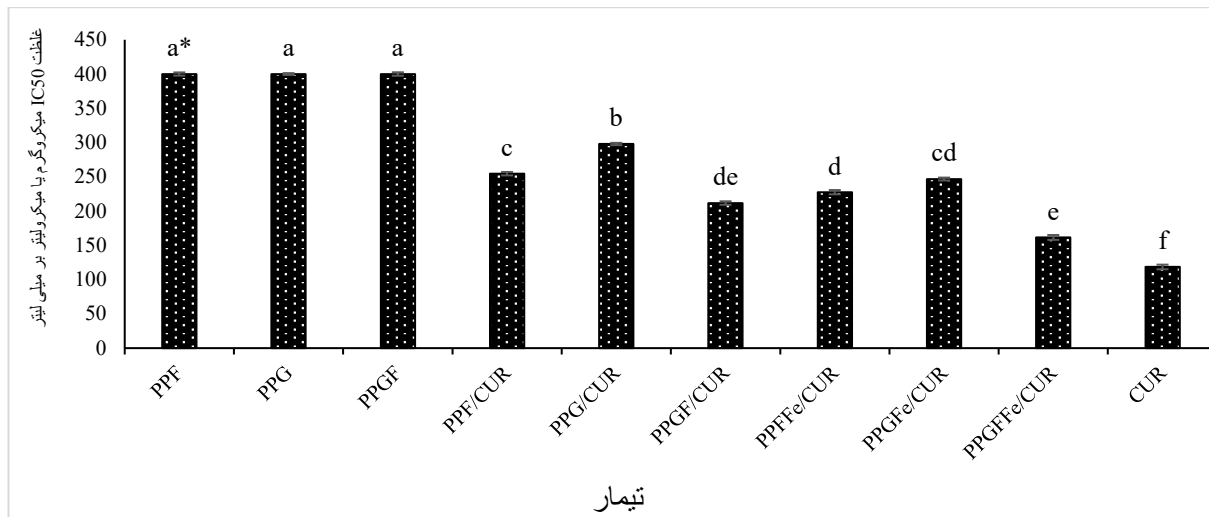
شکل ۸: الگوی رهش CUR از نانوذرات PPF/CUR، PPGF/CUR، PPGFFe/CUR، PPFFe/CUR، PPG/CUR، PPGF/CUR و PPGFFe/CUR (A)؛ pH=۴/۸ (B) و pH=۷/۴

### بررسی سمیت سلولی

#### درصد زنده‌مانی سلولی

طبق نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۹)، مشخص شد که نانوذرات به تنهایی (فاقد داروی کورکومین) تاثیر معنی‌داری بر روی زنده‌مانی سلولی نداشتند و با افزایش غلظت تا ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نیز این تاثیر معنی‌دار نبود. هم‌چنین بین لیگاندهای مختلف (فولیک‌اسید یا گلوکز) نیز اختلاف معنی‌داری در زنده‌مانی سلول‌های Hs-578T تیمار شده نیز مشاهده نشد (شکل ۹). اما با بررسی و تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل مشخص شد که استفاده از گلوکز به‌عنوان گیرنده سطح سلولی کم‌ترین تاثیر را بر روی زنده‌مانی سلولی داشته و نسبت به اسید فولیک سمیت پائینی را نشان داد. اما با افزودن داروی کورکومین توان مقابله با سلول‌های سرطانی Hs-578T توسط نانوذرات به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که بیانگر تاثیر غیرمعنی‌دار نانوذرات بر روی زنده‌مانی سلولی است که در دارو رسانی هدفمند جهت درمان سرطان از اهمیت بالایی برخوردار است. از سویی دیگر مشخص شد که با افزایش غلظت نانوذرات حاوی کورکومین میزان زنده‌مانی سلولی به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. برای نمونه درصد زنده‌مانی سلول‌های Hs-578T تیمار شده با ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر PPGF و PPG به ترتیب ۸۰/۸۷، ۸۵/۳۳ و ۸۲/۳۳ درصد بود که با افزودن داروی کورکومین این میزان به ۴۲/۷۶، ۴۵/۷۸ و ۳۸/۷۸ درصد



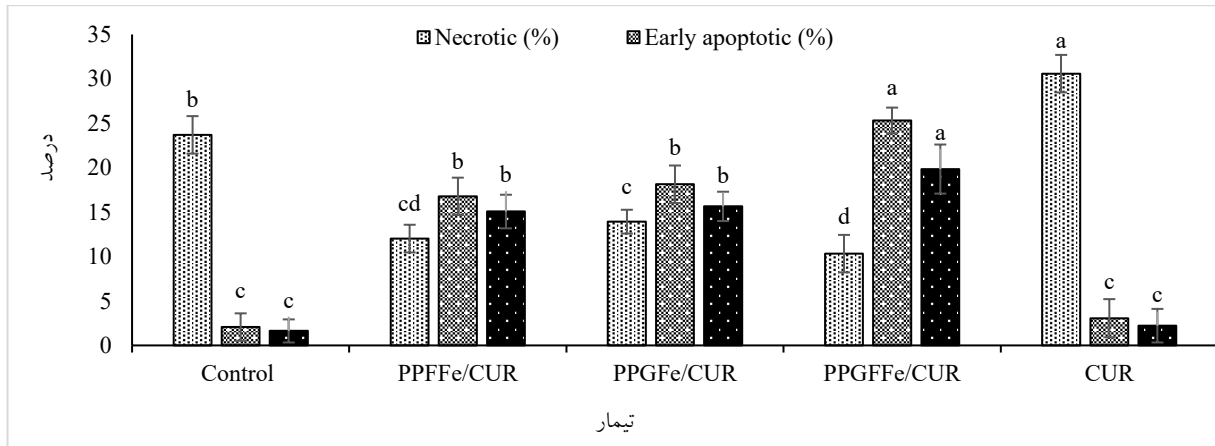


شکل ۱۰: مقدار IC<sub>50</sub> نانوذرات حاوی داروی کورکومین و یا فاقد آن و هم‌چنین کورکومین (CUR) آزاد.

\*حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها در هر مقطع زمانی بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن است

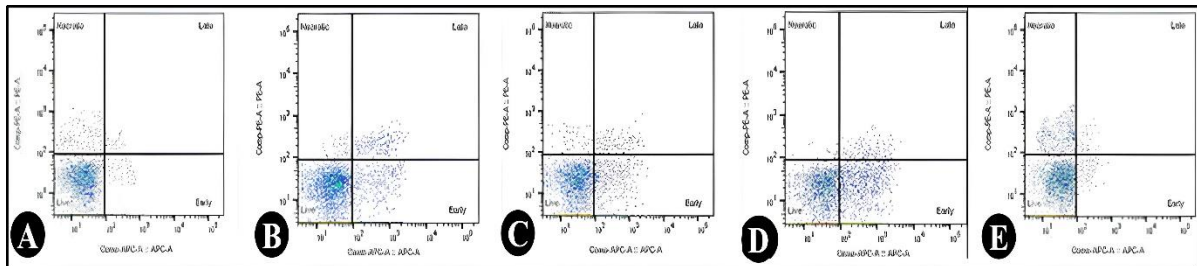
### آپوپتوزیس سلولی

آپوپتوزیس یک نوع مرگ برنامه‌ریزی شده و تنظیم شده سلولی است که در شرایط فیزیولوژیک یا پاتولوژیک رخ داده و بدون تحریک پاسخ التهابی یا آسیب به بافت‌های مجاور انجام می‌شود. در مقابل، نکروز به‌عنوان یک نوع مرگ غیرکنترل شده سلولی شناخته می‌شود که با تخریب غیراختیاری غشای پلاسمایی و نشت محتویات داخل سلول همراه بوده و منجر به بروز التهاب و آسیب به سلول‌های سالم اطراف می‌شود (۱۶). بنابراین، ارزیابی سمیت سلولی داروها و ترکیبات دارویی-پزشکی با تمرکز بر الگوهای مرگ سلولی، اعم از آپتوز یا نکروز، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این پژوهش پس از بررسی سمیت سلولی نانوذرات حاوی داروی کورکومین یا فاقد آن، نیاز به بررسی این سمیت از نظر آپوپتوزیس سلولی است. همان طوری که در شکل ۱۱ و ۱۲ که مربوط به سلول‌های Hs-578 تیمار شده با غلظت IC<sub>50</sub> ترکیبات است، نشان داده شده است، بیشترین درصد سلول‌های Hs-578 واقع در مرحله پیش و پس آپوپتوتیک (به ترتیب ۳۲/۲۵ و ۱۹/۸۵ درصد) مربوط به تیمار این سلول‌ها با نانوذرات PPGFe/CUR بود، به طوری که از این نظر با تمامی تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (شکل ۱۱ و شکل ۱۲-D). اما از نظر سلول‌های واقع در مرحله نکروتیک، تیمار سلول‌ها با کورکومین آزاد بیشترین مقدار (۳۰/۵۹ درصد) را داشت که از این نظر با تمامی تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد (شکل ۱۱ و شکل ۱۲-E). از نظر تاثیر نوع لیگاند استفاده شده (اسید فولیک یا گلوکز) بر درصد آپوپتوزیس سلولی نیز همان‌طور که در شکل ۱۱ و ۱۲-B و C نشان داده شده است، جایگزینی گلوکز با اسید فولیک و یا بالعکس، تفاوت معناداری از نظر آماری در میزان بروز آپوپتوزیس سلولی نشان نداد. هم‌چنین درصد بالای سلول‌های نکروزه شده مشاهده شده در تیمار شاهد می‌تواند مربوط به رقابت سلول‌ها در جذب مواد غذایی از محیط باشد (شکل ۱۱-A).



شکل ۱۱: درصد سلول‌های Hs-578 نکروزه شده، پیش و پس آپتوزیس تحت تاثیر غلظت‌های IC<sub>50</sub> نانوذرات PPFfe/CUR، PPGFe/CUR و PPGFFe/CUR

\*حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها در هر مقطع زمانی بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن است



شکل ۱۲: تصویر شماتیک فلوسایتمتری از سلول‌های Hs-578 واقع در فازهای نکروتیک، پیش و پس آپتوزیس تحت تاثیر غلظت‌های IC<sub>50</sub> محاسبه‌شده؛ (A) تیمار شاهد، (B) نانوذرات PPFfe/CUR، (C) نانوذرات PPGFe/CUR، (D) نانوذرات PPGFFe/CUR و (E) کورکومین آزاد.

## ۵- بحث

امروزه دارورسانی هدفمند به‌عنوان یکی از امید بخش‌ترین راه‌کارهای درمان بسیاری از بیماری‌های سخت علاج از قبیل سرطان می‌باشد. در این روش درمانی سعی بر آن است تا با استفاده از نانوذرات هدفمند، دارو یا قطعات ژنی به بافت هدف ارسال شود، در حالی که کم‌ترین جذب در بافت‌های نرمال را داشته باشد (۲۲، ۳۶ و ۱۶). در این پژوهش از نانوذرات کopolymerی PLA جهت بارگیری داروی ضدسرطان کورکومین جهت مقابله با لاین‌های سلولی Hs-578 استفاده شد. هم‌چنین جهت افزایش راندمان بارگیری و گردش در جریان خون از PEG و جهت افزایش هدفمندی از نانوذرات اکسید آهن (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) بیوسنتز شده استفاده شد. علاوه‌براین از اسید فولیک و گلوکز به‌عنوان لیگاندهای سطحی برای شناسایی سلول‌های هدف (سلول‌های سرطانی) استفاده شد.

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که نانوذرات حاوی PLA از زیست‌سازگاری مناسبی بر سلول‌های Hs-578 برخوردار بودند. به‌طوری‌که هیچ‌گونه سمیت قابل ملاحظه‌ای در این نانوذرات مشاهده نشد (شکل ۹). نتایج به‌دست آمده در این پژوهش با نتایج تحقیقات پیشین هم‌راستا بود (۳۷ و ۳۸). از خواص منحصر به فرد کopolymerهای آمفی‌پاتیک از قبیل PLA-PEG می‌توان به توانایی این نانوذرات در کنترل رهش دارو اشاره کرد. کنترل رهش دارو یکی دیگر از مباحث مهم در دارورسانی است

که می‌تواند از عوارض ناشی از دوز بالای دارو جلوگیری کرده در عین حال با توجه به رهش تدریجی دارو تعداد جلسات تزریق دارو را به حداقل برساند این خصوصیت بیشتر در بیماری‌های مرتبط با چشم که نیاز به تزریق دارو درون مردمک چشم می‌باشد بسیار حائز اهمیت در این بیماری‌ها افزایش تعداد دفعات تزریق دارو درون چشم خطر جداسدن مردمک را افزایش می‌دهد (۳۹). در تحقیق انجام شده توسط Rostami و همکاران (۴۰)، مشخص شد که نانوذرات PLA-PEG از خواص آهسته روش مناسبی در pH خنثی برخوردارند در حالی که در محیط اسیدی به سرعت تخریب شده و دارو را رهاسازی می‌کنند. همان‌طور که به‌خوبی مشخص شده است، بافت‌های سرطانی در مقایسه با بافت‌های نرمال از محیط اسیدی تری برخوردار هستند، این خصوصیت PLA باعث می‌گردد تا رهاسازی دارو در بافت‌های سرطانی به میزان قابل توجهی افزایش یابد (۱۷). در حالی که میزان رهش دارو در بافت‌های نرمال در حداقل مقدار خود باشد. این ویژگی به‌طور قابل توجهی عوارض ناشی از داروها را کاهش می‌دهد. اگرچه شیمی درمانی به‌عنوان یکی از راه‌کارهای درمان سرطان در مراحل ابتدایی مفید می‌باشد، با این حال امکان افزایش تعداد جلسات درمانی به‌منظور حذف کامل سلول‌های سرطانی به دلیل عوارض جانبی بسیار بالای داروهای مورد استفاده سخت و در اکثر موارد امکان‌ناپذیر می‌شود (۴۱). افزایش غلظت دارو با استفاده از ارسال آن از طریق پلیمرهایی از قبیل PLA-PEG به‌دلیل کاهش عوارض جانبی دارو امکان ادامه درمان را فراهم می‌نماید که در نتیجه آن شانس درمان در این قبیل بیماری‌ها نیز به موازات آن افزایش خواهد یافت (۴۲).

کپسوله‌سازی دارو در نانوذرات تحت تاثیر عوامل فیزیکی - مانند اندازه، شکل و ویژگی‌های سطح - و عوامل شیمیایی از جمله ترکیب و پایداری پوشش قرار می‌گیرد (۴۳). نانو ذرات کوچک‌تر و اشکال خاص تمایل به افزایش نفوذ سلولی و تعامل با غشاهای سلولی دارند (۴۴). شرایط محیطی مانند pH و دما نیز نقش‌های حیاتی به‌ویژه در تعدیل آزادسازی محموله دارویی از نانوذرات دارند (۴۵). pH بر بار الکتریکی و پایداری اتصال کمپلکس‌های دارو-نانوذره تاثیر می‌گذارد، جایی که pH کمی اسیدی، انتقال کارآمد محموله‌های دارویی را تسهیل می‌کند، در حالی که شرایط قلیایی مانع از این فرآیند می‌شود. نکته مهم این است که سلول‌های سرطانی معمولاً شرایط اسیدی‌تری نسبت به سلول‌های سالم دارند (pH=۵)، که بر متابولیسم سلولی، تهاجم و پاسخ ایمنی تاثیر می‌گذارد. این تفاوت pH نه تنها بر راندمان انتقال ژن تاثیر می‌گذارد، بلکه با بهره‌برداری از اسیدیته تومور، فرصت‌هایی را برای استراتژی‌های درمانی هدفمند ارائه می‌دهد (۴۶). درک این عوامل درهم‌تنیده برای بهینه‌سازی انتقال هدفمند دارو مبتنی بر نانوذرات ضروری است. مطالعات آزادسازی ما نشان داد که رهش داروی کورکومین از نانوذرات در محیط اسیدی به مقدار قابل توجهی در مقایسه با محیط خنثی افزایش داشت (شکل ۸). نکته قابل توجه در این پژوهش این است که رهش دارو از نانوذرات PPF و PPGF در مقایسه با نانوذرات PPG در هر دو محیط خنثی و اسیدی رهش بیشتری داشتند، که نشان می‌دهد نقش کلیدی اسیدفولیک در تسهیل آزادسازی محموله در هر دو محیط pH دارد. این رفتار حساس به pH با ریزمحیط اسیدی‌تر تومورها مطابقت دارد و پتانسیل نانوکپسول‌های PPGF را برای انتقال هدفمند محموله دارویی در بافت‌های سرطانی برجسته می‌کند. Zhang و همکاران (۴۷)، نانوذرات مبتنی بر کیتوزان-PEG اصلاح شده با فولات به همراه داروی کورکومین را طراحی و سنتز نموده و گزارش کردند که رهش دارو توسط این نانوذرات نسبت به تغییر pH واکنش داشته و رهش این دارو در pH اسیدی (۵/۵) در مقایسه با pH خنثی (۷/۴) به طور قابل توجهی سریع‌تر بود، که آن را به‌دلیل پروتونه شدن گروه‌های آمین که ماتریس پلیمری را متورم می‌کنند، نسبت دادند.

شیمی‌درمانی هم‌چنان یکی از اصلی‌ترین روش‌های جهت مقابله با سرطان محسوب می‌شود و داروهای مورد استفاده در این حوزه بر اساس مکانیسم اثر در گروه‌های متفاوتی طبقه‌بندی می‌شوند. این گروه‌ها شامل عوامل آلکیله‌کننده نظیر سیکلوفسفامید

و نیموستین، آنتی‌متابولیت‌هایی مانند فلورواوراسیل و جم‌سیتابین، آنتی‌بیوتیک‌های ضدتوموری هم‌چون دوکسوروبیسن، ترکیبات زیست‌فعال با منشا طبیعی از جمله پاکلیتاکسل، کورکومین، کامپوتوسین و کوئرسیتین و هم‌چنین داروهای هورمونی ضدتومور می‌باشند (۴۸). هرچند این داروها نقش مهمی در مهار تکثیر و القای مرگ سلولی در تومورها ایفا می‌کنند، اما سمیت سیستمیک و عوارض جانبی غیرقابل پیش‌بینی هم‌چنان از محدودیت‌های عمده کاربرد بالینی آن‌ها به شمار می‌رود (۴۱). ماهیت غیرهدفمند این داروها اغلب منجر به آسیب به سلول‌های سالم در کنار سلول‌های سرطانی شده و بروز مشکلاتی همچون سرکوب سیستم ایمنی، عفونت و خونریزی را به‌همراه دارد (۴۹). به‌منظور غلبه بر این محدودیت‌ها، سامانه‌های نوین دارورسانی مبتنی بر نانوفناوری توسعه یافته‌اند که در میان آن‌ها نانوذرات پلیمری جایگاه ویژه‌ای دارند. این نانوذرات علاوه بر فراهم‌سازی ظرفیت بالای بارگذاری دارو، امکان انتقال هدفمند ترکیبات شیمی‌درمانی به بافت‌های توموری و کنترل سرعت رهایش دارو را فراهم می‌آورند (۵۰). به‌کارگیری این نانوساختارها منجر به افزایش پایداری دارو در برابر متابولیسم سریع، بهبود حلالیت ترکیبات آب‌گریز، ارتقای بازده کپسوله‌سازی و در نهایت افزایش نیمه‌عمر دارو در گردش خون می‌شود. در نتیجه، استفاده از نانوذرات پلیمری می‌تواند کارایی درمانی را به‌شکل قابل توجهی ارتقا دهد و در عین حال سمیت سیستمیک و عوارض جانبی ناخواسته را کاهش بخشد (۵۱). شواهد تجربی نشان داده است که نانوحامل‌های پلیمری بر پایه دکستران، پس از اصلاح شیمیایی با منومرهای مناسب و عامل‌های اتصال‌دهنده، قابلیت بارگذاری مؤثر داروهای نظیر کورکومین را دارا بوده و با کاهش سمیت قلبی ناشی از دارو، عملکرد درمانی بهتری در درمان بدخیمی‌ها ارائه می‌دهند (۵۲). این دسته از سامانه‌های دارورسانی، به‌دلیل حساسیت بالا به تغییرات محیطی و توانایی غلبه بر مقاومت دارویی سلول‌های سرطانی، به‌عنوان گزینه‌ای امیدبخش در طراحی نسل جدید راهبردهای شیمی‌درمانی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۴۳).

پروتئین‌های خانواده Bcl-2 و هم‌چنین آنزیم‌های کاسپاز به‌عنوان اجزای کلیدی در مسیرهای تنظیمی آپوپتوزیس سلولی شناخته می‌شوند و نقش تعیین‌کننده‌ای در آغاز و اجرای این فرآیند دارند (۵۳). خانواده پروتئین‌های Bcl-2 شامل دو گروه عمده پروتئین‌های ضدآپوپتوتیک (مانند Bcl-2 و Bcl-xL) و پروآپوپتوتیک (نظیر Bak و Bax) است که توازن آن‌ها بقای سلولی یا القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده را مشخص می‌سازد (۵۴). کاسپازها نیز به‌عنوان پروتئازهای سیستمی وابسته به آسپارات، به دو دسته آغازگر (مانند کاسپاز-۸ و کاسپاز-۹) و اجرایی (نظیر کاسپاز-۳ و کاسپاز-۷) تقسیم می‌شوند و در پاسخ به سیگنال‌های درون‌زاد یا برون‌زاد فعال می‌گردند (۵۵). هرگونه اختلال در این شبکه تنظیمی می‌تواند موجب فرار سلول‌های سرطانی از آپوپتوزیس شود و به‌همین دلیل، مقاومت در برابر مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده یکی از شاخص‌ترین ویژگی‌های سلول‌های بدخیم به‌شمار می‌رود (۵۶). بر اساس شواهد علمی، بهره‌گیری از فناوری نانو می‌تواند نقش مهمی در غلبه بر این مقاومت ایفا کند. نانوذرات به‌واسطه ویژگی‌هایی هم‌چون قابلیت بارگذاری ترکیبات زیست‌فعال، افزایش پایداری داروها و انتقال هدفمند به بافت‌های توموری، قادرند مسیرهای آپوپتوتیک را به‌طور مؤثرتری فعال سازند (۵۷). مطالعات متعددی اثبات کرده‌اند که کپسوله‌سازی ترکیبات ضدسرطانی در نانوحامل‌ها، اثر القایی آن‌ها بر مرگ برنامه‌ریزی‌شده را تقویت می‌کند. به‌عنوان مثال، بررسی انجام‌شده بر روی نانوذرات بارگذاری‌شده با کوئرسیتین نشان داد که این فرمولاسیون نسبت به کوئرسیتین آزاد با کارایی بیشتری موجب فعال‌سازی مسیر ذاتی آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی کبد شده است (۵۸). این پدیده احتمالاً ناشی از افزایش جذب سلولی، بهبود زیست‌دسترسی‌پذیری و پایداری بیشتر کوئرسیتین در محیط‌های بیولوژیکی می‌باشد. علاوه بر این، تحقیقات دیگری به ارزیابی اثرات ترکیبی داروهای شیمی‌درمانی در قالب نانوذرات پرداخته‌اند. یکی از این مطالعات نشان داد که هم‌زمانی جمسیتابین و سیس‌پلاتین در ساختار نانوذرات نه تنها موجب ارتقای اثرات سیتوتوکسیک هر دو دارو شد، بلکه به‌طور چشم‌گیری میزان آپوپتوزیس را در سلول‌های سرطانی مثانه افزایش داد (۵۹). این یافته اهمیت هم‌افزایی ناشی از سیستم‌های دارورسانی

نانویی را نشان می‌دهد که قادرند با عبور از مکانیسم‌های مقاومت دارویی و فعال‌سازی قوی‌تر کاسپازها، کارایی درمانی را ارتقا بخشند. برآیند نتایج حاصل از مطالعات مختلف بیانگر آن است که بهره‌برداری از نانوذرات نه تنها می‌تواند بر محدودیت‌های داروهای آزاد در زمینه حلالیت، پایداری و نفوذ سلولی غلبه کند، بلکه از طریق تعدیل بیان پروتئین‌های خانواده Bcl-2، افزایش نسبت Bax/Bcl-2 و تحریک فعال‌سازی کاسپازها، القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده را به شکل موثرتری رقم می‌زند. داده‌های به‌دست آمده در پژوهش حاضر نیز با این گزارش‌ها مطابقت دارد و نشان می‌دهد که سامانه‌های نانویی توانسته‌اند القای آپوپتوزیس را به‌میزان قابل توجهی افزایش دهند (شکل ۱۱ و ۱۲). این امر بیانگر آن است که استفاده از نانوحامل‌ها می‌تواند به‌عنوان راهبردی امیدبخش برای طراحی نسل جدید درمان‌های هدفمند سرطان مدنظر قرار گیرد.

## ۶- نتیجه‌گیری

به‌عنوان نتیجه‌گیری نهایی این پژوهش، می‌توان اذعان داشت که توسعه سامانه‌های نوین دارورسانی مبتنی بر نانوذرات کopolyمیری PLA-PEG، گامی امیدبخش و استراتژیک در جهت غلبه بر چالش‌های درمانی بیماری‌های صعب‌العلاجی مانند سرطان محسوب می‌شود. این مطالعه به وضوح نشان داد که طراحی چنین نانوحامل‌هایی نه تنها زیست‌سازگاری و ایمنی بالایی را در برابر سلول‌های طبیعی ارائه می‌دهد، بلکه با بهره‌گیری از اثر استتاری ناشی از PEG، زمان گردش خون را افزایش داده و از حذف پیش از موعد توسط سیستم ایمنی جلوگیری می‌کند. ویژگی برجسته این سامانه، قابلیت رهش کنترل‌شده و هوشمند دارو در پاسخ به محرک‌های خاص ریزمحیط تومور، به‌ویژه اسیدیته بالاتر، است که امکان رساندن حداکثری دارو به بافت هدف و به‌دنبال آن، کاهش چشمگیر عوارض جانبی سیستمیک را فراهم می‌آورد. هم‌چنین در این پژوهش به وضوح تاثیر افزودن لیگاندهای هدفمندی مانند فولیک‌اسید و گلوکز، بر روی دقت و کارایی این نانوذرات در شناسایی و اتصال به سلول‌های سرطانی مشاهده شد. علاوه بر این، نتایج این تحقیق نشان داد که نانوذرات طراحی‌شده با موفقیت توانستند القای آپوپتوزیس سلولی را در سلول‌های سرطانی Hs-578T افزایش دهند. این یافته‌ها به‌طور قاطع از برتری این فناوری نانو در مقایسه با فرمولاسیون‌های دارویی متعارف، هم در افزایش کارایی درمانی و هم در کاهش سمیت، حمایت می‌کند. در مجموع، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات هوشمند بر پایه PLA-PEG، با دارا بودن قابلیت‌های چندوجهی، پتانسیل عظیمی برای تبدیل شدن به یک روش جامع و قابل اعتماد در نسل آینده درمان‌های هدفمند سرطان دارند و راه را برای مطالعات بیشتر و در نهایت کاربردهای بالینی موثر هموار می‌سازند.

## ۷- منابع

1. Bourang S, Jahanbakhsh Godehkahriz S, Noruzpour M, Asghari Zakaria R, Granados-Principal S. Anticancer properties of copolymer nanoparticles loaded with *Foeniculum vulgare* derivatives in Hs578T and SUM159 cancer cell lines. *Cancer Nanotechnology*. 2025;1-28: (1)16.
2. Mohajeri S, Dashti S, Noruzpour M, Bourang S, Yaghoubi H. Design and preparation of PLA-chitosan-PEG-glucose copolymer for combined delivery of Paclitaxel and siRNA. *Discover Applied Sciences*. 2025;7(8):801.
3. Noruzpour M, Zakaria RA, Zare N, Bourang S, Ebrahimi HA, Granados-Principal S. Delivery of *Moringa oleifera* extract via PLA-PEG-FA/chitosan-PLA NPs into breast cancer cell lines. *BioNanoScience*. 2025;15(2):287.
4. Amani A, Dustparast M, Noruzpour M, Zakaria RA, Ebrahimi HA. Design and invitro characterization of green synthesized magnetic nanoparticles conjugated with multitargeted poly lactic

- acid copolymers for co-delivery of siRNA and paclitaxel. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;167:106007.
5. Kim H, Woo J, Dan K, Lee K-M, Jin M-S, Park IA, et al. Quantitative proteomics reveals knockdown of CD44 promotes proliferation and migration in claudin-low MDA-MB-231 and Hs 578T breast cancer cell lines. *Journal of Proteome Research*. 2021;20(7):3720-33.
  6. Zhong Y, Peng Z, Peng Y, Li B, Pan Y, Ouyang Q, et al. Construction of Fe-doped ZIF-8/DOX nanocomposites for ferroptosis strategy in the treatment of breast cancer. *Journal of Materials Chemistry B*. 2023;11(27):6335-45.
  7. Ahmadi-Nouraldin F, Bourang S, Azizi S, Noori M, Noruzpour M, Yaghoubi H. Preparation and characterization of multi-target nanoparticles for co-drug delivery. *Medicine in Drug Discovery*. 2024;21:100177.
  8. Nguyen MD, Tran H-V, Xu S, Lee TR. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: structures, synthesis, magnetic properties, surface functionalization, and emerging applications. *Applied Sciences*. 2021;11(23):11301.
  9. Mundel R, Thakur T, Chatterjee M. Emerging uses of PLA-PEG copolymer in cancer drug delivery. *3 Biotech*. 2022;12(2):41.
  10. Wang J-Z, You M-L, Ding Z-Q, Ye W-B. A review of emerging bone tissue engineering via PEG conjugated biodegradable amphiphilic copolymers. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;97:1021-35.
  11. Jahazi S, Akbari H. Preparation and characterization of doxorubicin loaded Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG nanoparticles on AGS and MCF-7 cancer cells. *Modares Journal of Biotechnology*. 2020;11(2):167-75.
  12. Dong W, Huang A, Huang J, Wu P, Guo S, Liu H, et al. Plasmid-loadable magnetic/ultrasound-responsive nanodroplets with a SPIO-NP dispersed perfluoropentane core and lipid shell for tumor-targeted intracellular plasmid delivery. *Biomaterials science*. 2020;8(19):5329-45.
  13. Mohajeri S, Yaghoubi H, Bourang S, Noruzpour M. Multifunctional magnetic nanocapsules for dual delivery of siRNA and chemotherapy to MCF-7 cells (Breast cancer cells). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2025:1-23.
  14. Chang C-W, Choi D, Kim WJ, Yockman JW, Christensen LV, Kim Y-H, Kim SW. Non-ionic amphiphilic biodegradable PEG-PLGA-PEG copolymer enhances gene delivery efficiency in rat skeletal muscle. *Journal of Controlled Release*. 2007;118(2):245-53.
  15. Ke X, Shelton L, Hu Y, Zhu Y, Chow E, Tang H, et al. Surface-functionalized PEGylated nanoparticles deliver messenger RNA to pulmonary immune cells. *ACS applied materials & interfaces*. 2020;12(32):35835-44.
  16. Wadhawan A, Singh J, Sharma H, Handa S, Singh G, Kumar R, et al. Anticancer biosurfactant-loaded PLA-PEG nanoparticles induce apoptosis in human MDA-MB-231 breast cancer cells. *ACS omega*. 2022;7(6):5231-41.
  17. Zhang C, Yang L, Wan F, Bera H, Cun D, Rantanen J, Yang M. Quality by design thinking in the development of long-acting injectable PLGA/PLA-based microspheres for peptide and protein drug delivery. *International journal of pharmaceutics*. 2020;585:119441.
  18. Zou W, Liu C, Chen Z, Zhang N. Preparation and characterization of cationic PLA-PEG nanoparticles for delivery of plasmid DNA. *Nanoscale research letters*. 2009;4:982-92.
  19. Narmani A, Rezvani M, Farhood B, Darkhor P, Mohammadnejad J, Amini B, et al. Folic acid functionalized nanoparticles as pharmaceutical carriers in drug delivery systems. *Drug development research*. 2019;80(4):404-24.
  20. Ramalho MJ, Alves B, Andrade S, Lima J, Loureiro JA, Pereira MC. Folic-acid-conjugated poly (lactic-co-glycolic acid) (nanoparticles loaded with gallic acid induce glioblastoma cell death by reactive-oxygen-species-induced stress. *Polymers*. 2024;16(15):2161.

21. Bourang S, Asadian S, Noruzpour M, Mansuryar A, Azizi S, Ebrahimi HA, Amani Hooshyar V. PLA-HA/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles loaded with curcumin: physicochemical characterization and toxicity evaluation in HCT116 colorectal cancer cells. *Discover Applied Sciences*. 2024;6(4):186.
22. Bourang S, Noruzpour M, Jahanbakhsh Godekahriz S, Ebrahimi HAC, Amani A, Asghari Zakaria R, Yaghoubi H. Application of nanoparticles in breast cancer treatment: a systematic review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2024;397(9):6459-505.
23. Soltani M, Ahmadzadeh N, Nasiraei Haghighi H, Khatamian N, Homayouni Tabrizi M. Targeted cancer therapy potential of quercetin-conjugated with folic acid-modified nanocrystalline cellulose nanoparticles: a study on AGS and A2780 cell lines. *BMC biotechnology*. 2025;25(1):29.
24. Rostami N, Gomari MM, Abdouss M, Moeinzadeh A, Choupani E, Davarnejad R, et al. Synthesis and characterization of folic acid-functionalized DPLA-co-PEG nanomicelles for the targeted delivery of letrozole. *ACS Applied Bio Materials*. 2023;6(5):1806-15.
25. Fadaka A, Ajiboye B, Ojo O, Adewale O, Olayide I, Emuowhochere R. Biology of glucose metabolism in cancer cells. *Journal of Oncological Sciences*. 2017;3(2):45-51.
26. Bourang S, Jahanbakhsh Godekahriz S, Asghari Zakaria R, Parsa H, Noruzpuor M. Green synthesis of iron oxide, copper, zinc oxide and silver nanoparticles from aqueous extract of *F. vulgare* and evaluation of their structural and antimicrobial properties. *Agricultural Biotechnology Journal*. 2024;16(3):60-88.
27. Mansuryar A, Bourang S, Noruzpour M, Ebrahimi HA, Amani A, Granados-Principal S, Calahorra J. The effect of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> biosynthesized through the green synthesis of *Silybum marianum* and HA in the targeted delivery of 5-Fluorouracil to HCT116 cell line. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2025;33(2):27.
28. Bourang S, Jahanbakhsh-Godekahriz S, Asghari-Zakaria R, Parsa-Khankandi H, Noruzpour M. Green synthesis of iron oxide, copper, zinc oxide and silver nanoparticles from aqueous extract of *F. vulgare* and evaluation of their structural and antimicrobial properties. *Agricultural Biotechnology Journal*. 2024;16(3):61-88.
29. Noruzpuor M, Asghari Zakaria R, Zare N, Ebrahimi HA, Parsa H, Bourang S. Green synthesis of metal nanoparticles using aqueous extract of *Moringa oleifera* L. and investigating their antioxidant and antibacterial properties. *Applied Chemistry Today*. 2024;19(71):283-302.
30. Jiao X, Wang Z, Wang F, Wen Y. Dual Stimuli-Responsive Controlled Release Nanocarrier for Multidrug Resistance Cancer Therapy. *ChemPhysChem*. 2019;20(24):3271-5.
31. Solano-Gálvez SG, Abadi-Chiriti J, Gutiérrez-Velez L, Rodríguez-Puente E, Konstat-Korzenny E, Álvarez-Hernández D-A, et al. Apoptosis: activation and inhibition in health and disease. *Medical Sciences*. 2018;6(3):54.
32. Bourang S, Noruzpour M, Azizi S, Yaghoubi H, Ebrahimi HA. Synthesis and in vitro characterization of PCL-PEG-HA/FeCo magnetic nanoparticles encapsulating curcumin and 5-FU. *Nanomedicine Journal*. 2024;11(2).
33. Hoseini B, Jaafari MR, Golabpour A, Momtazi-Borojeni AA, Karimi M, Eslami S. Application of ensemble machine learning approach to assess the factors affecting size and polydispersity index of liposomal nanoparticles. *Scientific reports*. 2023;13(1):18012.
34. Ghosal K, Chatterjee S, Thomas S, Roy P. A detailed review on synthesis, functionalization, application, challenges, and current status of magnetic nanoparticles in the field of drug delivery and gene delivery system. *AAPS PharmSciTech*. 2022;24(1):25.
35. Ho W, Gao M, Li F, Li Z, Zhang XQ, Xu X. Next-generation vaccines: nanoparticle-mediated DNA and mRNA delivery. *Advanced healthcare materials*. 2021;10(8):2001812.
36. Puchkov PA, Maslov MA. Lipophilic Polyamines as promising components of Liposomal gene delivery systems. *Pharmaceutics*. 2021;13(6):920.

37. Sagar NA, Tarafdar S, Agarwal S, Tarafdar A, Sharma S. Polyamines: functions, metabolism, and role in human disease management. *Medical Sciences*. 2021;9(2):44.
38. Parveen S, Sahoo SK. Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. *European journal of pharmacology*. 2011;670(2-3):372-83.
39. Davoodi P, Lee LY, Xu Q, Sunil V, Sun Y, Soh S, Wang C-H. Drug delivery systems for programmed and on-demand release. *Advanced drug delivery reviews*. 2018;132:104-38.
40. Rostami N, Faridghiasi F, Ghebleh A, Noei H, Samadzadeh M, Gomari MM, et al. Design, synthesis, and comparison of PLA-PEG-PLA and PEG-PLA-PEG copolymers for curcumin delivery to cancer cells. *Polymers*. 2023;15(14):3133.
41. Behranvand N, Nasri F, Zolfaghari E, Enameh R, Khani P, Hosseini A, Garssen J, Falak R. Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2022;71(3):507-26.
42. Jeong H, Lim H, Lee DY, Song YS, Kim BY. Preparation and Drug Release Behavior of Nifedipine-Loaded Poly(lactic acid)/Polyethylene Glycol Microcapsules. *J Nanosci Nanotechnol*. 2021;21(7):3735-41.
43. da Silva Feltrin F, Agner T, Sayer C, Lona LMF. Curcumin encapsulation in functional PLGA nanoparticles: A promising strategy for cancer therapies. *Advances in colloid and interface science*. 2022;300:102582.
44. Logozzi M, Spugnini E, Mizzoni D, Di Raimo R, Fais S. Extracellular acidity and increased exosome release as key phenotypes of malignant tumors. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2019;38:93-101.
45. Zhou M, Li Y-J, Tang Y-C, Hao X-Y, Xu W-J, Xiang D-X, Wu J-Y. Apoptotic bodies for advanced drug delivery and therapy. *Journal of Controlled Release*. 2022;351:394-406.
46. Wang S. pH-Responsive amphiphilic carboxylate polymers: Design and potential for endosomal escape. *Frontiers in Chemistry*. 2021;9:645297.
47. Zhang ML, Zhang GP, Ma HS, Pan YZ, Liao XL. Preparation of pH-responsive polyurethane nano micelles and their antibacterial application. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2024;35(4):519-34.
48. Mozar FS, Meivita MP, Go S-X, Li L, Bajalovic N, Loke DK. Ultra-efficient MCF-7 cell ablation and chemotherapy-integrated electrothermal therapy with DOX-WS2-PEG-M13 nanostructures. *Discover Materials*. 2024;4(1):5.
49. Liu K, Zheng D, Lei H, Liu J, Lei J, Wang L, Ma X. Development of novel lignin-based targeted polymeric nanoparticle platform for efficient delivery of anticancer drugs. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2018;4(5):1730-7.
50. Hamimed S, Jabberi M, Chatti A. Nanotechnology in drug and gene delivery. *Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2022;395(7):7-69-87.
51. Mosleh-Shirazi S, Abbasi M, reza Moaddeli M, Vaez A, Shafiee M, Kasae SR, et al. Nanotechnology advances in the detection and treatment of cancer: an overview. *Nanotheranostics*. 2022;6(4):400.
52. Fan Y-W, Lu I-C, Hsu M-Y, Kuo W-T, Wu S-Y, Lan S-H, et al. Synthetic lethality in human bladder cancer cells by curcumin via concurrent Aurora A inhibition and autophagy induction. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2023;121:109438.
53. Kaloni D, Diepstraten ST, Strasser A, Kelly GL. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. *Apoptosis*. 2023;28(1):20-38.
54. Czabotar PE, Garcia-Saez AJ. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2023;24(10):732-48.
55. Green DR. Caspase activation and inhibition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2022;14(8):a041020.

56. Kitakata H, Endo J, Ikura H, Moriyama H, Shirakawa K, Katsumata Y, Sano M. Therapeutic targets for DOX-induced cardiomyopathy: role of apoptosis vs. ferroptosis. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(3):1414.
57. Subroto E, Andoyo R, Indiarto R. Solid lipid nanoparticles: Review of the current research on encapsulation and delivery systems for active and antioxidant compounds. *Antioxidants*. 2023.12(3):633.
58. Ahmadi M, Valizadeh A, Bazavar M, Yousefi B. Investigating the role of quercetin in increasing the rate of cisplatin-induced apoptosis via the NF-κB pathway in MG-63 cancer cells. *Drug research*. 2022;72(07):385-9.
59. Romani AM. Cisplatin in cancer treatment. *Biochemical pharmacology*. 2022;206:115323.