



Engineering of CNC-based hydrogel nanoparticles with controlled concentrations to enhance the selectivity and efficacy of cisplatin in AGS cells

Madadzadeh P, Yaghoubi H*

- Department of Biology, Ard.C., Islamic Azad University, Ardabil, Iran

Original Article

Use your device to scan
and read the article online

Citation: Madadzadeh P, Yaghoubi H. Engineering of CNC-based hydrogel nanoparticles with controlled concentrations to enhance the selectivity and efficacy of cisplatin in AGS cells. Journal of Cell and Tissue. 2026; 17(2):174-194.



<https://doi.org/10.66224/JCT.174>

KEYWORDS

AGS cell line,
Cellular apoptosis,
Cellulose
nanocrystals,
Cisplatin, and
Hyaluronic acid

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Cancer is recognized as one of the leading causes of mortality worldwide and remains a major global health challenge. Among the various types of cancer, gastric cancer is considered one of the most aggressive and prevalent malignancies due to its high incidence rate, late diagnosis, and poor prognosis. The AGS cell line is widely used as a reliable *in vitro* model for studying human gastric adenocarcinoma because of its adhesive growth pattern, relatively rapid proliferation, and preservation of the invasive characteristics of primary tumor cells. Conventional therapeutic approaches for gastric cancer, including surgery, radiotherapy, and chemotherapy, have shown partial clinical success; however, these methods are frequently associated with serious limitations such as systemic toxicity, damage to healthy tissues, severe side effects, and the development of drug resistance. Consequently, the development of advanced drug delivery systems has attracted considerable attention as a promising strategy to improve therapeutic efficacy while minimizing adverse effects. In this regard, nanotechnology has emerged as a powerful platform for the design of smart nanocarriers capable of enhancing drug stability, improving bioavailability, and enabling controlled and targeted drug release. Cisplatin is one of the most important chemotherapeutic agents used in the treatment of gastric cancer and exerts its anticancer activity primarily through binding to DNA, disrupting replication and transcription processes, and ultimately inducing apoptosis. Nevertheless, its clinical application is limited by severe toxicity and acquired drug resistance. Cellulose nanocrystals have gained significant attention in drug delivery

* Corresponding author. Tel: 04533728020

E-mail address: yaghoobi_h@iau.ac.ir

DOI: <https://doi.org/10.66224/JCT.174>

Received: 12 May. 2026; Received in revised form: 24 Jun. 2026; Accepted: 1 Jul. 2026

Original Article

© Author



systems owing to their biodegradability, high mechanical strength, structural stability, and ability to provide sustained and controlled drug release. In addition, bovine serum albumin is considered an ideal biological carrier because of its excellent biocompatibility, low toxicity, biodegradability, and natural tendency to accumulate in tumor tissues. Polyvinyl alcohol also plays an important role as a biocompatible polymeric matrix in the fabrication of stable nanocarriers. Furthermore, hyaluronic acid serves as a targeting ligand through its specific interaction with CD44 receptors, which are overexpressed on the surface of many cancer cells, including gastric cancer cells. This targeted interaction facilitates the selective uptake of nanoparticles by tumor cells and significantly enhances the efficiency of targeted drug delivery systems.

Aims: The aim of this study was to design and evaluate a smart nanocarrier system based on cellulose nanocrystals, polyvinyl alcohol, bovine serum albumin, and hyaluronic acid for the targeted delivery of cisplatin to gastric cancer cells. This study sought to improve drug stability, controlled release behavior, selective cellular uptake, and reduced toxicity toward normal cells by utilizing the biocompatible and targeting properties of these components. In addition, the cytotoxicity and anticancer selectivity of the synthesized nanoparticles were investigated in the AGS gastric cancer cell line to evaluate the potential efficiency of this nanocarrier system in enhancing the therapeutic performance of gastric cancer treatment.

Materials and methods: In this study, cellulose nanocrystals were extracted from raw cellulose through controlled sulfuric acid hydrolysis using 64% sulfuric acid, followed by ultrasonication, centrifugation, and dialysis to obtain both stable suspensions and freeze-dried powders. Cisplatin was subsequently loaded onto cellulose nanocrystals at different concentrations, and the drug-loading efficiency was determined spectrophotometrically at 370 nm. Multifunctional BSA (Bovine Serum Albumin)-PVA (Polyvinyl Alcohol)-CNC (Cellulose Nanocrystals)-CDP (Cisplatin) nanoparticles coated with PEG-hyaluronic acid were then synthesized by initially coating the drug-loaded cellulose nanocrystals with bovine serum albumin, followed by the formation of a stable hydrogel network using polyvinyl alcohol. To improve targeting ability and biological stability, the nanoparticle surface was further functionalized with NH₂-PEG-HA in the presence of EDC/NHS as a coupling agent, and the final suspension was purified by dialysis before further analyses. The physicochemical properties of the synthesized nanoparticles, including crystalline structure, thermal stability, particle size, and zeta potential, were characterized using X-ray Diffraction (XRD), Thermogravimetric Analysis (TGA), and Dynamic Light Scattering (DLS) analyses, respectively. In addition, the release kinetics of cisplatin from the nanocapsules were investigated under different pH conditions simulating normal and tumor microenvironments, and the obtained data were analyzed using the Korsmeyer–Peppas kinetic model. To evaluate biocompatibility and selective cytotoxicity, AGS gastric cancer cells and normal GES-1 gastric epithelial cells were treated with the synthesized nanocapsules and free cisplatin, followed by MTT assay for IC₅₀ determination. Furthermore, the selectivity index (SI) was calculated to assess preferential toxicity toward cancer cells. Finally, apoptosis induction was evaluated using Annexin V/PI staining and flow cytometry. All experiments were performed in triplicate, and the data were statistically analyzed using one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test in SPSS22 software.

Results: The physicochemical characterization results demonstrated that all synthesized nanoparticles and nanocapsules possessed a predominantly amorphous structure. The XRD patterns exhibited broad diffraction peaks within the 15–30° range, while the absence of sharp crystalline peaks confirmed the successful incorporation of cellulose nanocrystal–cisplatin complexes into the BSA-PVA matrix and the formation of a homogeneous noncrystalline system. TGA analysis further revealed that increasing the concentration of cellulose nanocrystals from 50 to 200 mg significantly enhanced

the thermal stability of CNC-CDP nanoparticles, as higher concentrations remained thermally stable up to nearly 300°C. Moreover, the BPC_(100 mg)CP-HA nanocapsules showed lower thermal degradation and greater structural stability compared with drug-free nanocapsules, indicating the reinforcing effect of CNC-CDP within the nanocapsule network. DLS analysis demonstrated that increasing the cellulose nanocrystal concentration increased particle size from 322 to 363 nm, while the zeta potential decreased from +13.05 to +2.14 mV. Surface coating with BSA, PVA, PEG, and hyaluronic acid further increased the particle size to 476 nm and elevated the PDI value, confirming the successful formation of multilayered nanocapsules. Drug release studies indicated that cisplatin release was significantly higher under acidic conditions (pH=5.8) than under physiological conditions (pH=7.4), and the release rate increased over time. In contrast, increasing the cellulose nanocrystal concentration reduced the drug release rate, suggesting a more compact and stable nanostructure. MTT assay results showed that drug-free nanocapsules exhibited negligible cytotoxicity against both AGS and GES-1 cells, whereas cisplatin-loaded nanocapsules significantly reduced the viability of cancer cells. Among all formulations, BPC_(50 mg)CP-HA exhibited the strongest anticancer activity, with an IC₅₀ value of 224.75 µg.mL⁻¹ against AGS cells and the highest selectivity index (SI=1.75), indicating superior selective toxicity toward cancer cells. Furthermore, flow cytometry analysis demonstrated that this formulation induced the highest percentages of early and late apoptotic cells, while free cisplatin caused the greatest level of necrotic cell death.

Discussion: In recent years, smart nanocarrier systems have emerged as promising strategies for targeted cancer therapy due to their ability to improve drug stability, provide controlled release, and reduce systemic side effects. In the present study, multifunctional nanocapsules composed of cellulose nanocrystals, BSA, PVA, PEG, and hyaluronic acid were designed for the targeted delivery of cisplatin to AGS gastric cancer cells. The obtained results demonstrated that drug-free nanocapsules exhibited negligible cytotoxicity against both AGS and GES-1 cells, indicating the favorable biocompatibility of the synthesized nanocarrier system. This biocompatibility may be attributed to the intrinsic properties of the nanocarrier components, which are unlikely to induce oxidative stress, membrane damage, or mitochondrial dysfunction in healthy cells. Furthermore, PEGylation and hyaluronic acid-mediated targeting reduced nonspecific nanoparticle accumulation in normal cells while improving selective uptake by cancer cells through CD44 receptor interactions. Physicochemical characterization revealed that increasing the concentration of cellulose nanocrystals resulted in larger particle sizes and lower zeta potential values, likely due to the formation of denser polymeric networks and stronger hydrogen-bonding interactions among the nanocarrier components. Nevertheless, the BPC_(100 mg)CP-HA formulation exhibited an appropriate particle size distribution and acceptable uniformity for drug delivery applications. Drug release studies further demonstrated that cisplatin release was significantly higher under acidic conditions than at physiological pH, while increasing cellulose nanocrystal concentration reduced the release rate. This behavior was associated with the formation of a more compact polymeric network that restricted drug diffusion and enabled sustained and controlled release. In addition, flow cytometry analysis revealed that the BPC_(50 mg)CP-HA nanocapsules induced the highest levels of apoptosis in AGS cells, whereas free cisplatin predominantly caused necrotic cell death. These findings suggest that encapsulation of cisplatin within the designed nanocarrier system not only enhances anticancer selectivity but also promotes apoptosis-mediated cell death, thereby potentially improving the therapeutic efficacy of cisplatin in gastric cancer treatment.

Conclusion: This study demonstrates that smart nanocapsules BPCCP-HA based on cellulose nanocrystals and a BSA-PVA hydrogel provide an effective strategy to overcome the therapeutic limitations of cisplatin. This system enhances

physicochemical properties, structural stability, and pH-responsive drug release, thereby improving targeted delivery of the drug to AGS cancer cells. The designed formulation shows good biocompatibility and low toxicity toward healthy cells.



مهندسی نانوذرات هیدروژلی مبتنی بر CNC با غلظت‌های کنترل شده جهت افزایش انتخاب‌پذیری و اثرگذاری سیس‌پلاتین در سلول‌های AGS

پیام مددزاده^۱، هاشم یعقوبی^{۲*}

-گروه زیست‌شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

واژگان کلیدی	چکیده
آپوپتوزیس سلولی، سیس‌پلاتین، لاین سلولی AGS، نانوکریستال سلولزی، هیالورونیک‌اسید	هدف: پیشرفت‌های نانوفناوری امکان توسعه حامل‌های هوشمندی را فراهم کرده است. در این پژوهش، یک سیستم نانوحامل هوشمند مبتنی بر نانوکریستال‌های سلولزی (CNC) در قالب نانوهیدروژل BSA-PVA تقویت‌شده با PEG و هیالورونیک‌اسید (HA) طراحی شد تا انتقال هدفمند داروی سیس‌پلاتین (CDP) به سلول‌های سرطان معده AGS را فراهم سازد. مواد و روش‌ها: نانوذرات CNC با روش پیونددهی شیمیایی و حل‌درحلال سنتز و داروی CDP به‌وسیله انتشار حلال و امولسیون چندمرحله‌ای بارگذاری شد. سپس نانوکپسول‌های BPCCP-HA ساخته و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، مورفولوژی، رهایش وابسته به pH و اثرات سمیت و آپوپتوزیس آن‌ها بر سلول‌های سرطانی AGS و سالم GES-1 بررسی شد. نتایج: نتایج حاصل از DLS نیز نشان داد که با افزایش غلظت CNC از ۵۰ به ۲۰۰ mg، اندازه نانوذرات CNC-CDP از ۳۲۲ به ۳۶۳ نانومتر افزایش یافته و پتانسیل زتا از ۱۳/۰۵+ تا ۲/۱۴+ mV کاهش یافت. الگوی رهایش دارو در pH مختلف نشان داد که رهایش داروی سیس‌پلاتین از نانوکپسول‌های BPCCP-HA به‌طور معنی‌داری وابسته به pH، غلظت CNC و زمان بود. نتایج ارزیابی سمیت سلولی نشان داد که نانوکپسول‌های فاقد دارو (BPCCP-HA) حتی در بالاترین غلظت ($400 \mu\text{g.mL}^{-1}$) سمیت قابل‌توجهی نشان ندادند، اما افزودن BPCCP-HA سمیت سلولی را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. هم‌چنین مشخص شد که نانوکپسول BPCCP-HA حاوی ۵۰ mg نانوذره CNC بیشترین تأثیر را در القای آپوپتوزیس در سلول‌های AGS داشت. نتیجه‌گیری: نانوحامل توسعه‌یافته در این مطالعه نه تنها سمیت سلولی را افزایش می‌دهد، بلکه مرگ سلولی را به سمت آپوپتوز مطلوب هدایت می‌کند.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۲/۲۲

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۴/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۱۰

۱- مقدمه

سرطان یکی از مهم‌ترین چالش‌های سلامت جهانی به‌شمار می‌رود و به‌عنوان یکی از عوامل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر جهان شناخته می‌شود. در میان انواع سرطان‌ها، سرطان معده نیز یک بدخیمی شایع و خطرناک محسوب می‌شود (۱). رده سلولی AGS یک مدل آزمایشگاهی ارزشمند و استاندارد برای مطالعه آدنوکارسینوم معده انسان است. ویژگی‌های عمومی این رده سلولی شامل رشد چسبنده و نسبتاً سریع، پایداری ژنتیکی در شرایط کشت و حفظ ویژگی‌های تهاجمی سلول‌های سرطانی

اولیه است (۲). در حال حاضر، پرکاربردترین راهبردهای درمانی جهت درمان بیماری سرطان، به ویژه سرطان معده شامل جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی می‌باشد. اگرچه این روش‌ها تا حدی موفق بوده‌اند، اما با محدودیت‌های جدی از جمله عوارض جانبی گسترده، آسیب به بافت‌های سالم و به ویژه، توسعه مقاومت دارویی مواجه هستند (۳). شیمی‌درمانی به عنوان یک درمان سیستمیک، فاقد اختصاصیت لازم است و به سلول‌های سالم با تقسیم سریع نیز آسیب می‌رساند. این چالش‌ها، مسیر را برای ظهور و توسعه روش‌های درمانی نوین هموار ساخته است (۴). در این میان، نانوتکنولوژی به عنوان یک راهبرد تحول‌آفرین، پتانسیل فوق‌العاده‌ای برای غلبه بر این موانع از خود نشان داده است. در این روش با بهره‌گیری از نانوحامل‌های هوشمند، می‌توان عوامل درمانی را به‌طور انتخابی به بافت تومور رساند، فراهمی زیستی آن را افزایش داد و عوارض جانبی را به حداقل رساند. این رویکرد هدفمند، به‌ویژه برای دارورسانی موثر عوامل درمانی نوین امیدبخش بوده است (۵). از سویی نیز سیس‌پلاتین (CDP) یک داروی شیمی‌درمانی کلاس پلاتین و از پایه‌های مهم درمان سرطان معده، به‌ویژه در مراحل پیشرفته یا متاستاتیک است (۶). اهمیت درمانی این دارو به دلیل مکانیسم اثر قوی است که با اتصال به DNA سلول‌های سرطانی و ایجاد اختلال در رونویسی و تکثیر، منجر به مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (آپوپتوزیس) می‌شود (۷). از سویی، نانوکریستال‌های سلولزی به عنوان تقویت‌کننده‌های زیست‌تخریب‌پذیر شرایط لازم را جهت افزایش استحکام مکانیکی نانوحامل‌ها، پایداری ساختاری و مقاومت در برابر تخریب زودرس فراهم می‌کنند (۸). این نانوساختارها با ایجاد شبکه‌ای متراکم، امکان رهایش کنترل‌شده و تدریجی دارو را میسر ساخته و از رهایش ناگهانی و بی‌موقع عوامل درمانی جلوگیری می‌کنند. با بهینه‌سازی غلظت این نانوساختارها در نانوحامل‌ها و عامل‌دار کردن سطح نانوحامل‌ها توسط لیگاند‌های هدفمند مانند فولیک‌اسید، می‌توان دارو را به‌طور اختصاصی و با بازدهی بالاتری به سلول‌های سرطانی رساند و عوارض جانبی را به حداقل رساند (۹). از سویی دیگر، آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان یک پروتئین سرمی فراوان، در دسترس و ارزان به طور گسترده‌ای در سیستم‌های دارورسانی (به ویژه آزمون‌های درون آزمایشگاهی) به کار می‌رود (۱۰). این پروتئین به دلیل زیست‌سازگاری عالی، سمیت پایین و قابلیت تجزیه‌پذیری زیستی، یک حامل ایده‌آل برای رهایش دارو محسوب می‌شود. در دارورسانی هدفمند، آلبومین سرم گاوی می‌تواند به‌طور طبیعی از طریق اثر افزایش نفوذ و نگهداری (EPR) در بافت‌های توموری تجمع یابد (۱۱). پلی‌وینیل‌الکل (PVA) یک پلیمر خطی است که برای تشکیل هیדרوژل نیاز به ایجاد پیوندهای عرضی دارد. در روش‌های سنتی از عوامل شیمیایی مانند گلو تارآلدهید برای ایجاد این پیوندها استفاده می‌شود که باقی‌مانده سمی این عوامل می‌تواند برای کاربردهای زیست‌پزشکی خطرناک باشد (۱۲). هم‌چنین لیگاند‌های هیالورونیک‌اسید به عنوان یک هدف‌یاب مولکولی دقیق در دارورسانی هدفمند عمل می‌کند که با اتصال اختصاصی به گیرنده‌های CD44 که بر سطح بسیاری از سلول‌های سرطانی از جمله سرطان معده به وفور بیان می‌شوند، امکان شناسایی و ورود انتخابی نانوحامل‌های دارویی را به درون سلول‌های سرطانی فراهم می‌کند (۱۳). این مکانیسم هدف‌گیری فعال، تجمع ترجیحی دارو در بافت توموری را به شدت افزایش داده و موجب کاهش قابل توجه عوارض جانبی ناشی از تأثیر بر سلول‌های سالم می‌شود (۱۴). از دیگر مزایای هیالورونیک‌اسید، پایداری شیمیایی بالا، سمیت پایین و هزینه تولید مقرون به صرفه است که آن را به گزینه‌ای ایده‌آل برای کاربردهای بالینی تبدیل می‌کند. این لیگاند از طریق آندوسیتوز وابسته به گیرنده، ورود کارآمد نانوذرات حاوی دارو را به سلول سرطانی تسهیل می‌نماید (۱۵). نانوذره‌ی چندمنظوره‌ی طراحی‌شده در این پژوهش با ترکیب هم‌افزای نانوکریستال‌های سلولزی، هیدروژل PVA، پوشش PEG (Polyethylene Glycol)، آلبومین سرم گاوی و لیگاند هیالورونیک‌اسید، سامانه‌ای هوشمند برای بارگذاری بهینه و رهایش کنترل‌شده‌ی سیس‌پلاتین ایجاد می‌کند که با بهره‌گیری هم‌زمان از هدف‌گیری غیرفعال و هدف‌گیری فعال، تجمع انتخابی دارو در بافت توموری را افزایش داده، زمان ماندگاری دارو در گردش خون را بهبود می‌بخشد و سمیت آن را به صورت انتخابی علیه سلول‌های سرطان معده (رده AGS) تقویت

می‌کند؛ به‌طوری‌که هدف نهایی این پژوهش، دستیابی به یک فرمولاسیون کارآمد و پیشرفته برای غلبه بر محدودیت‌های درمانی سیس‌پلاتین و ارتقای اثربخشی آن در درمان سرطان پستان است.

۲- مواد و روش‌ها

مواد: کلرید پتاسیم (KCl)، متیل سولفوکسید (DMSO، 4-5، 3-دی متیل-۲-تiazolیل)-۲، ۵-دی فنیل-H₂-تترازولیوم بروماید (MTT)، اتانول، هیدروکلریک اسید (HCL)، سدیم کلراید (NaCl)، دی‌هیدروژن فسفات پتاسیم (KH₂PO₄)، کلروفرم، هیالورونیک اسید (HA)-پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)-آمین (NH₂)، هیدروکسید سدیم (NaOH) و داروی سیس‌پلاتین (CDP) از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. پلی‌وینیل الکل (PVA)، پلی‌وینیل‌پیرولیدون (PVP) و پارافرمالدهید از آزمایشگاه شیمی دکتر موجال (ایران) تهیه شد. سرم جنین گاوی (FBS)، آلبومین سرم گاوی (BSA)، محیط کشت DMEM/F-12، DMEM و تریپسین-EDTA از شرکت Biowest (ایالات متحده آمریکا) خریداری شدند.

روش انجام کار

سنتز نانوکریستال‌های سلولزی: در این پژوهش نانوکریستال‌های سلولزی از طریق هیدرولیز اسیدی کنترل‌شده سلولز خام استخراج شدند. بدین صورت که ابتدا ۵ g سلولز خام (جرم مولی تقریبی ۱۶۲/۱۴ g/mol) با ۴۰ mL اسیدسولفوریک (H₂SO₄)، ۶۴ درصد وزنی (جرم مولی ۹۸/۰۸ g/mol) تحت هیدرولیز قرار گرفتند. نسبت جامد به مایع در این آزمایش ۱ به ۱۰ حفظ شد و واکنش به مدت ۴۵ دقیقه و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تحت هم‌زدن مداوم انجام شد. سپس سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۵ دقیقه تحت امواج فراصوت (۵۰ Hz) قرار گرفت. در انتها به ترکیب حاصل ۶۰۰ mL آب مقطر یخ‌زده اضافه شده و جهت خالص‌سازی و جداسازی نانوکریستال‌ها از اسید و ناخالصی‌ها، ۳ مرتبه سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه) شد. در ادامه رسوب حاصل، در آب دیونیزه، مجدداً پراکنده شد. در نهایت، سوسپانسیون نانوکریستال‌های سلولزی به‌منظور حذف یون‌های باقیمانده و تعدیل pH، با استفاده از غشای دیالیز دارای آستانه جداسازی ۱۲ تا ۱۴ KDa، در مجاورت آب مقطر قرار گرفت تا pH محیط به محدوده خنثی (۶ تا ۷) رسید. برای تولید پودر نانوکریستال سلولز، بخشی از سوسپانسیون همگن شده و سپس توسط دستگاه انجماد خشک (LMC-2, Rubarth, Germany)، خشک شد (۱۶).

بارگذاری داروی سیس‌پلاتین در نانوکریستال‌های سلولزی (CNC-CDP): جهت تهیه داروی سیس‌پلاتین با غلظت ۱ mmol/L، ابتدا ۳ mg پودر سیس‌پلاتین (Cl₂H₆N₂Pt) در ۱۰۰ mL اتانول ۹۶ درصد با غلظت ۱ mmol/L تهیه گردید. سپس غلظت‌های مختلفی از نانوکریستال‌های سلولزی (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ mg به‌ازای هر mL از محلول سیس‌پلاتین) به محلول افزوده و مخلوط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در تاریکی و تحت هم‌زدن قرار گرفتند. پس از آن، سوسپانسیون‌ها با سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه) جداسازی و رسوب با اتانول مطلق شستشو داده شد. در نهایت، نانوکریستال‌های سلولزی بارگذاری شده با سیس‌پلاتین توسط دستگاه انجماد خشک (LMC-2, Rubarth, Germany) خشک گردید و برای استفاده در مراحل در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بازده بارگذاری با اندازه‌گیری سیس‌پلاتین موجود در مایع رویی توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۷۰ نانومتر تعیین شد (۱۷).

بازدهی بارگذاری CDP در هر کدام از غلظت‌های نانوکریستال‌های سلولزی به شرح زیر تعیین شد (معادله ۱):

$$100 \times \frac{\text{مقدار داروی سیس پلاتین مورد استفاده برای تهیه نانوکریستال} - \text{مقدار داروی سیس پلاتین در مایع رویی}}{\text{مقدار داروی سیس پلاتین مورد استفاده برای تهیه نانوکریستال}} = \text{درصد بارگذاری دارو} : \text{معادله ۱}$$

تهیه نانوذرات *BSA-PVA-CNC-CDP* پوشش دار شده با *PEG-Hyaluronic acid* (*BPCCP-HA*): جهت

سنتز نانوذرات BPCCP-HA ابتدا، ۱۰ mg از نانوکریستال‌های سلولزی (در غلظت‌های مختلف) بارگذاری شده با CDP به ۲۰ mL از محلول BSA به همراه ۱۰ mg/mL بافر فسفات سالین (PBS) افزوده شده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و تحت همزدن ملایم قرار داده شد تا پوشش اولیه تشکیل شد. سپس، ۱۰ mL از محلول PVA (۴ درصد w/v) به مخلوط اضافه شد و همزدن به مدت ۲ ساعت دیگر ادامه یافت تا شبکه هیدروژلی پایدار ایجاد شود. در مرحله بعد، برای اصلاح سطح، ۵ mL از محلول پلی اتیلن گلیکول-هیالورونیک اسید-آمین (NH₂-PEG-HA)، با غلظت ۲ mmol در حضور کاتالیز EDC/NHS (به عنوان عامل اتصال دهنده) به مخلوط اضافه و واکنش به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی انجام شد. سوسپانسیون حاصل جهت حذف مواد واکنش دهنده استفاده نشده، به مدت ۴۸ ساعت در برابر آب دیونیزه (با استفاده از غشای دارای آستانه جداسازی ۱۲ KDa) دیالیز گردید. در نهایت، نانوذرات پایدار شده BPCCP-HA برای استفاده در آزمون‌های بعدی، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۸).

تعیین مشخصات فیزیکی و شیمیایی نانوذرات: جهت شناسایی فازهای بلوری موجود در نانوذرات تهیه شده از دستگاه XRD

(Bruker D8 DISCOVER, Germany) استفاده شد. همچنین، خواص حرارتی نانوکپسول‌های CNC-CDP (با درصدهای مختلف CNC)، نانوکپسول BPP-HA (BSA-PVA-PEG-HA) و نانوکپسول BPC(100 mg)CP-HA از طریق آنالیز گرماسنجی وزنی (TGA-DTA-32، ژاپن) در دماهای بین ۲۵ درجه سانتی‌گراد تا ۶۰۰ با نرخ گرمایش ۱۰ °C/min تحت فشار هوا تعیین شد. اندازه متوسط و پتانسیل زتای نانوذرات و نانوکپسول‌ها با استفاده از پراکندگی نور پویا (DLS, Malvern Instruments, Westborough, USA) تعیین شد.

سینتیک رهایش دارو: برای مقایسه سینتیک انتشار داروی CDP بین نانوذرات BPCCP-HA حاوی غلظت‌های مختلف

CNC، از دو محیط مختلف با pH متفاوت (pH=۷/۴ محیط اطراف سلول‌های سالم) و (pH=۵/۸ محیط اطراف سلول‌های سرطانی) استفاده شد. برای تعیین سینتیک آزادسازی، نانوکپسول‌ها به طور جداگانه در ۱۰ mL بافر استات سدیم (pH=۵/۵) و محلول گلوکز ۵ درصد (pH=۷/۴) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در فواصل زمانی برنامه‌ریزی شده (هر ۳۰ دقیقه تا ۳ روز)، پس از سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ rpm و ۳۰ دقیقه)، مایع رویی نمونه‌ها برای سنجش آزادسازی جمع‌آوری شد. سپس، تا بازه زمانی بعدی، نانوذرات در ۱۰ mL محیط کشت تازه، مجدداً به حالت سوسپانسیون درآمدند. میزان غلظت داروی سیس پلاتین در هر نمونه به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۳۷۰ nm اندازه‌گیری شد. درصد رهایش داروی سیس پلاتین از نانوکپسول‌ها به کمک معادله ۲ محاسبه شد:

$$\text{درصد رهایش دارو} = \frac{\text{محتوای کل داروی سیس پلاتین در مایع رویی PBS}}{\text{مقدار داروی سیس پلاتین محصور شده در نانوکپسول‌ها}} \times 100 \quad \text{معادله ۲}$$

سرانجام داده‌های حاصل از این آزمایش به کمک مدل سینتیکی Korsmeyer-Peppas مورد تحلیل قرار گرفتند، تا مکانیسم آزادسازی دارو مشخص شود (۱۸).

مطالعات سمیت سلولی: در این پژوهش در کنار سلول‌های سرطانی (AGS) از لاین سلولی اپی‌تلیال معده انسان (GES-1)

به عنوان نمونه‌ی شاهد، به صورت موازی استفاده شد. هدف از استفاده از سلول سالم، ایجاد یک گروه شاهد معتبر برای ارزیابی انتخاب‌گری و سمیت ذاتی نانوذرات بود.

کشت سلول‌های سالم *GES-1*: سلول‌های *GES-1* در محیط DMEM/F-12 مکمل شده با ۵ درصد سرم اسب، g/ml ۱۰۰ μ انسولین، ng/mL ۲۰ فاکتور رشد اپی‌درمی، $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ۵/۰ هیدروکورتیزون، ng/mL ۱۰۰ پنی‌سیلین/استرپتومایسین و در پلیت‌های ۹۶ چاهکی کشت شدند. این سلول‌ها به انکوباتور (۵ درصد CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲۴ ساعت منتقل شدند.

کشت لاین‌های سلول‌های سرطانی *AGS*: برای این منظور سلول‌های AGS به پلیت‌های ۹۶ چاهکی با تراکم سلول 7×10^3 سلول در هر چاهک در $200 \mu\text{L}$ محیط کشت کامل منتقل شدند (محیط DMEM با ۱۰ درصد FBS) و سپس انکوبه شدند (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ به مدت ۲۴ ساعت).

تست *MTT* (محاسبه میزان *IC50*): میزان *IC50* (غلظتی که موجب مرگ حداقل ۵۰ درصد سلول می‌شود) نانوکپسول‌های BPCCP-HA (حاوی غلظت‌های مختلف CNC) با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. برای این منظور ۲۴ ساعت پس از کشت، سلول‌ها (سلول‌های AGS و یا *GES-1*) با غلظت‌های مختلف CDP (صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و $400 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$)^۱ و صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ از نانوکپسول‌های BPCCP-HA (با غلظت‌های مختلف CNC) و همچنین صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و $400 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ از نانوکپسول‌های BPCP-HA (بدون دارو و در غلظت‌های مختلف CNC) تیمار شده و دوباره انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت، $20 \mu\text{L}$ محلول MTT ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 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 ($200 \mu\text{L}$ در هر چاهک) حل شد. پس از انکوباسیون (۳۰ دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد)، جذب نوری در ۵۷۰ nm توسط دستگاه قرائت صفحه چندچاهکی (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) اندازه‌گیری شد (۱۹).

شاخص انتخابی (*SI*): به منظور ارزیابی سمیت انتخابی و پیش‌بینی عوارض جانبی سامانه نانودارویی، شاخص انتخابی (*SI*) بر اساس معادله ۳ محاسبه شد. مقادیر *SI* بالاتر از یک نشان‌دهنده سمیت ترجیحی بر سلول‌های سرطانی و ایمنی بالاتر سامانه دارورسانی می‌باشند، در حالی که مقادیر کمتر از یک بیانگر سمیت بیشتر بر سلول‌های سالم است.

$$\text{معادله ۳:} \quad ((SI) \text{ شاخص انتخابی}) = \frac{IC_{50} \text{ سلول‌های نرمال (GES-1)}}{IC_{50} \text{ سلول‌های سرطانی (AGS)}}$$

بررسی مرگ سلولی: برای این منظور و جهت تمایز بین آپوپتوزیس از نکروزیس، از کیت آنکسین به همراه پروپیدیوم یدید استفاده شد. سلول‌های AGS تیمار شده با نانوکپسول‌های BPCCP-HA (با غلظت‌های مختلف CNC) و CDP آزاد با استفاده از فلوسایتومتری و کیت Annexin V-Dy634 (Immunostep) و طبق پروتکل تأمین‌کننده، برای آپوپتوزیس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. همچنین از سلول‌های AGS تیمار نشده به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. داده‌ها با فلوسایتومتر FACS Verse و نرم‌افزار FlowJo™ نسخه ۱۰ پردازش شدند (۲۰).

۳- آنالیز آماری

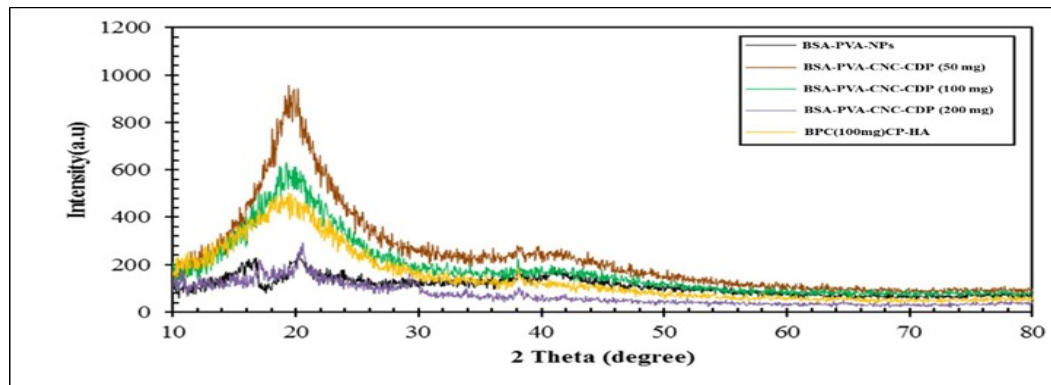
هر پارامتر اندازه‌گیری شده در این مطالعه در سه تکرار ارزیابی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS22 از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن آزمون دانکن برای مقایسه‌های چندگانه در آستانه معنی‌داری ۵ درصد انجام شد. توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. نتایج به صورت مقادیر میانگین با انحراف معیار (میانگین $\pm$ انحراف معیار) گزارش شده‌اند.

۴- نتایج

ارزیابی مشخصات ساختاری، حرارتی و ابعادی نانوذرات

XRD

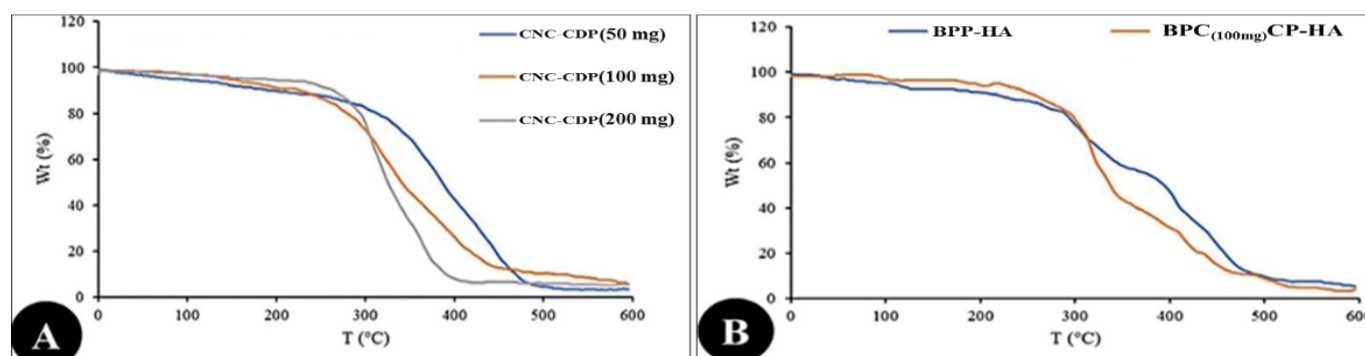
الگوی XRD نانوذرات و نانوکپسول‌های سنتز شده در غلظت‌های مختلف CNC (شکل ۱)، ماهیت غیربلوری کلیه نمونه‌ها از جمله نانوذرات پایه و فرمولاسیون‌های حاوی دارو را تأیید می‌کند. فقدان قله‌های تیز بلوری و حضور یک قله پهن، نشان‌دهنده بارگذاری موفق و تلفیق نانوکریستال‌های سلولزی-سیس‌پلاتین (CDP-CNC) در داخل ماتریس BSA-PVA و تبدیل آن به حالت آمورف است. طبق نتایج به‌دست آمده از طیف XRD (شکل ۱)، مشخص شد که همه الگوهای XRD، از جمله نمونه‌ی BPC_(100mg)CP-HA، قله‌ی پهن و گسترده در محدوده‌ی زاویه‌ی ۱۵ تا ۳۰ $^{\circ}$ θ درجه نشان می‌دهند. این قله‌ی پهن مشخصه‌ی اصلی مواد با ساختار آمورف یا نانوبلور است. عدم وجود قله‌های تیز و باریک نشان می‌دهد که نمونه‌ها فاقد نظم بلوری بلند-برد می‌باشند. هم‌چنین الگوی بسیار پهن و فاقد بلورینگی برای BSA-PVA-NPs تأیید می‌کند که نانوذرات پایه با موفقیت سنتز شده‌اند و دارای ساختاری آمورف هستند. از سویی دیگر، با بارگذاری دارو در دُزهای مختلف CNC (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg)، الگوی کلی نمونه‌ها (BSA-PVA-CNC-CDP) تغییر محسوسی نمی‌کند و ماهیت آمورف خود را حفظ می‌کنند. طبق نتایج به‌دست آمده چنین استنباط می‌شود که نانوذرات CNC-CDP (که به خودی خود ممکن است حالت بلوری داشته باشد) در درون ماتریس آمورف BSA-PVA به خوبی تلفیق شده و به حالت آمورف یا مولکولی درآمده است. به عبارت دیگر، دارو در شبکه‌ی نانوذرات حل شده و یک سیستم یکنواخت و غیربلوری تشکیل داده است.



شکل ۱: طیف XRD نانوذرات BSA-PVA، BSA-PVA-CNC-CDP (بارگذاری شده با داروی سیس‌پلاتین و غلظت‌های مختلف CNC (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg) و نانوکپسول BPC_(100mg)CP-HA

TGA

طبق نتایج حاصل از نمودار TGA نانوذرات و نانوکپسول‌های سنتز شده مشخص شد که، در نانوذرات CNC-CDP با افزایش غلظت نانوکریستال‌های سلولزی از ۵۰ به ۲۰۰ mg، پایداری حرارتی به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای بهبود یافته است، به‌طوری که نمونه ۲۰۰ mg تا دمای نزدیک به ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بدون تخریب قابل‌توجه باقی می‌ماند که نشان‌دهنده نقش مؤثر نانوکریستال‌های سلولزی در افزایش یکپارچگی ساختاری و مقاومت در برابر تجزیه حرارتی است (شکل ۲-۱). نانوکپسول-BPP-HA، کاهش وزن سریع‌تری در محدوده ۱۰۰ تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد احتمالاً ناشی از تخریب زودهنگام پلیمرها یا اجزای پروتئینی است. در مقابل، نانوکپسول BPC_(100mg)CP-HA، پایداری حرارتی بالاتری را در مقایسه با BPP-HA نشان می‌دهد که حاکی از اثر سینرژیستی CNC-CDP در تقویت شبکه نانوکپسول و به‌تأخیر انداختن تخریب حرارتی است (شکل ۲-۲). باقی‌مانده نهایی در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد در نمونه‌های حاوی سلولز بیشتر است که نشان‌دهنده تشکیل خاکستر غنی از کربن و پایداری حرارتی برتر در دماهای بالا است. این نتایج به‌وضوح تأثیر مثبت ترکیب CNC-CDP را در طراحی نانوحامل‌های پایدار برای کاربردهای دارورسانی هدفمند تأیید می‌کند.



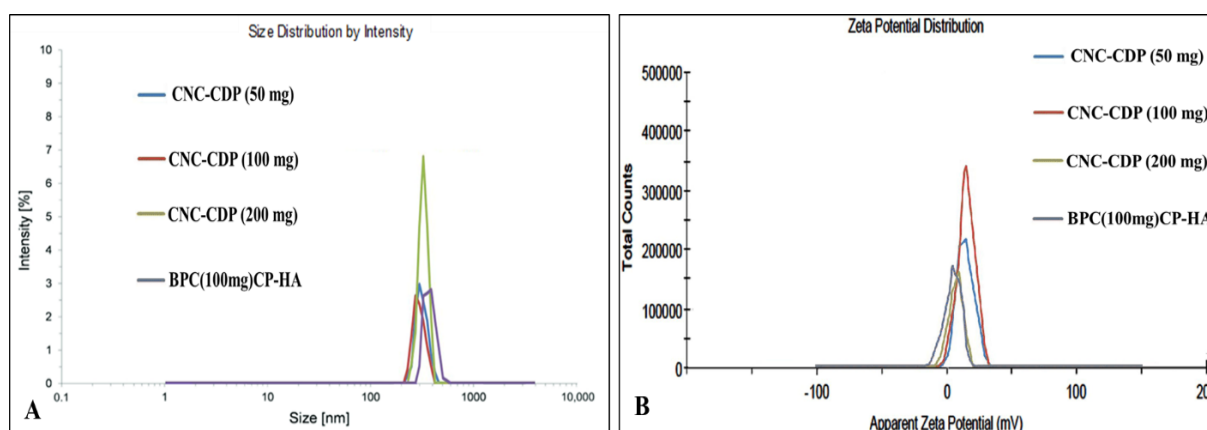
شکل ۲. نمودار TGA: (A) نانوذرات CNC-CDP حاوی ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg نانوکریستال‌های سلولزی به ازای هر mL از محلول CDP. (B) نانوکپسول BPP-HA (BSA-PVA-PEG-HA) و نانوکپسول BPC_(100mg)CP-HA به ترتیب

DLS

طبق نتایج حاصل از اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات و نانوکپسول سنتز شده (جدول ۱ و شکل ۳) مشخص شد که نانوذرات CNC-CDP و نانوکپسول BPC_(100mg)CP-HA از نظر اندازه و یکنواختی در محدوده مطلوبی برای دارورسانی قرار دارند. طبق نتایج حاصل مشخص شد که با افزایش غلظت نانوکریستال سلولزی از ۵۰ به ۲۰۰ mg در نانوذرات CNC-CDP، اندازه ذرات از $322 \pm 14/7$ به $363 \pm 21/3$ نانومتر و یکنواختی نانوذرات (PDI) افزایش یافت، که نشان‌دهنده تشکیل ساختارهای پایدارتر بود. همچنین پتانسیل زتای نانوذرات با افزایش غلظت نانوکریستال سلولزی، از $13/05 \pm 4/23$ در نانوذرات CNC₍₅₀₎-CDP (mg) به $2/14 \pm 6/72$ mV در نانوذرات CNC_(200 mg)-CDP کاهش یافت. از سویی دیگر مشخص شد که با افزودن BSA، PVA و PEG به نانوذرات CNC_(100 mg)-CDP موجب افزایش اندازه، پتانسیل زتا و PDI این نانوذرات در مقایسه با حالت اولیه به‌ترتیب به $476 \pm 14/5$ نانومتر، $8/91 \pm 5/17$ mV و $0/51 \pm 0/08$ افزایش یافت (جدول ۱ و شکل ۳).

جدول ۱: اندازه، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی ذرات (PDI) نانوذرات CNC-CDP حاوی ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg نانوکریستال‌های سلولزی به ازای هر mV از محلول سیس پلاتین و نانوکپسول BPC_(100mg)CP-HA

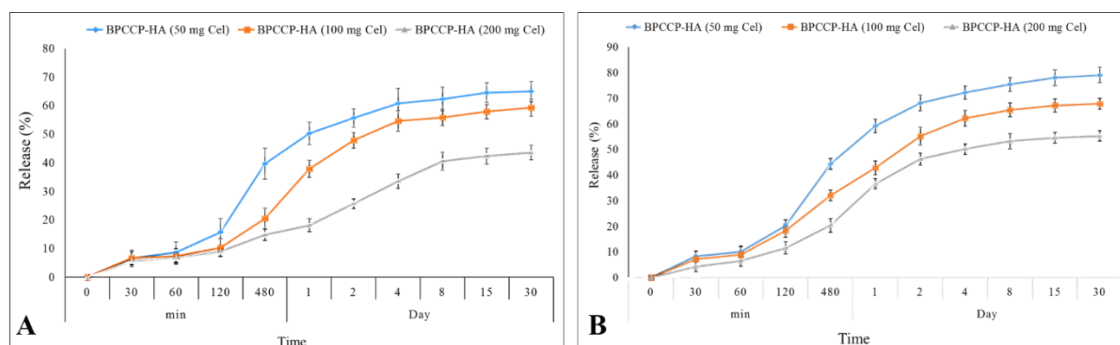
انحراف معیار	PDI	انحراف معیار	پتانسیل زتا (mV)	انحراف معیار	اندازه ذرات (nm)	نوع نانوذره/ نانوکپسول
±۰/۰۵	۰/۲۸	±۴/۲۳	+۱۳/۰۵	±۱۴/۷	۳۲۲	CNC-CDP (50 mg)
±۰/۰۹	۰/۳۱	±۳/۱۴	+۱۲/۰۱	±۱۱/۳	۳۳۸	CNC-CDP (100 mg)
±۰/۱۰	۰/۳۳	±۶/۷۲	+۲/۱۴	±۱۲/۳	۳۶۳	CNC-CDP (200 mg)
±۰/۰۸	۰/۵۱	±۵/۱۷	+۸/۹۱	±۱۴/۵	۴۷۶	BPC _(100mg) CP-HA



شکل ۳: (A) اندازه و (B) پتانسیل زتای نانوذرات CNC-CDP حاوی ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg نانوکریستال‌های سلولزی به ازای هر mL از محلول سیس-پلاتین و نانوکپسول BPC_(100mg)CP-HA

الگوی رهش داروی CDP از نانوکپسول‌های BPC_(100mg)CP-HA با غلظت‌های مختلف CNC

الگوی آزادسازی داروی CDP از نانوکپسول‌های BPC_(100mg)CP-HA با غلظت‌های مختلف CNC در شرایط خنثی (pH=۷/۴) و اسیدی (pH=۵/۸) نشان داد که آزادسازی CDP علاوه بر تأثیرپذیری مستقیم از دو محیط با pH مختلف به طور معنی‌داری تحت تأثیر غلظت نانوکریستال‌های سلولزی و مدت زمان آزمایش قرار دارد (شکل ۴-A و B). همان‌طوری‌که از شکل ۴-A و B استنباط می‌شود، با کاهش سطح pH از ۷/۴ به ۵/۸ میزان رهایش داروی CDP در همه غلظت‌های نانوکریستال‌های سلولزی (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg) افزایش یافت، اما این افزایش در رهایش دارو با غلظت نانوکریستال‌ها رابطه‌ی عکس داشت به‌طوری‌که افزایش غلظت این ترکیبات موجب کاهش رهایش دارو شد. از سویی دیگر، آزادسازی CDP به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر مدت زمان آزمایش بوده و این تأثیر از نوع تأثیر مستقیم بوده و افزایش مدت زمان، رهایش دارو را افزایش داده است.

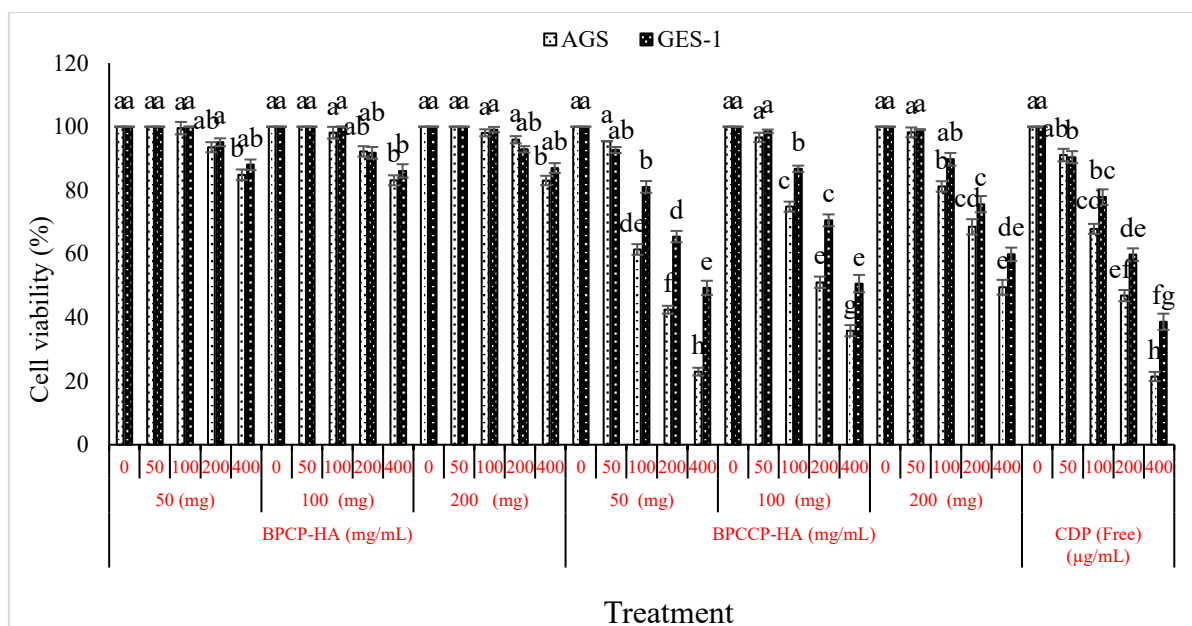


شکل ۴: نمودار رهائش داروی CDP از نانوکپسول‌های BPCCP-HA با غلظت‌های متفاوت (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg نانوکریستال سلولزی) از محیط با pHهای مختلف؛ (A) pH=۷/۴ و (B) pH=۵/۸

بررسی سمیت سلولی

میزان زنده‌مانی سلولی

طبق نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۵)، مشخص شد که نانوذرات BPCP-HA (فاقد داروی CDP) تاثیر معنی‌داری و در سطح احتمال ۵ درصد بر روی زنده‌مانی سلول‌های AGS و GES-1 نداشتند و با افزایش غلظت تا ۴۰۰ mg/mL نیز این تاثیر معنی‌دار نبود. اما با افزودن داروی CDP توان مقابله با سلول‌های سرطانی AGS توسط نانوکپسول‌ها به‌طور معنی‌داری (در سطح احتمال ۵ درصد) افزایش یافت. از سویی دیگر مشخص شد که با افزایش غلظت نانوکپسول‌های حاوی CDP میزان زنده‌مانی سلولی به‌طور معنی‌داری و در سطح احتمال ۵ درصد کاهش بود. هم‌چنین طبق نتایج به‌دست آمده مشخص شد که استفاده از غلظت‌های پایین‌تر نانوکریستال‌های سلولزی در ساختار نانوکپسول‌های BPCCP-HA، میزان زنده‌مانی سلول‌های AGS یا GES-1 نیز به نسبت کاهش غلظت، کاهش بود. به‌طوری‌که با کاهش غلظت نانوکریستال‌های سلولزی از ۲۰۰ به ۵۰ mg/mL زنده‌مانی سلولی هر دو لاین سلولی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۵). برای نمونه درصد زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده با بالاترین غلظت (۴۰۰ μg/mL) و کم‌ترین غلظت نانوکریستال‌های سلولزی (BPCP_(50 mg)-HA) در سلول‌های AGS یا GES-1 (به ترتیب برابر با ۲۲/۹۸ یا ۴۹/۳۴ درصد) مشاهده شد (شکل ۵). کم‌ترین درصد زنده‌مانی سلولی (۲۱/۴۵ درصد) در تیمار سلول‌های AGS با نانوکپسول‌های CDP آزاد و در غلظت ۴۰۰ μg/mL مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد، کمتر از سایر تیمارها بود. از سویی دیگر، با بررسی اثر تیمارهای مختلف بر روی سلول‌های GES-1، مشاهده شد که نانوذرات BPCP-HA (فاقد داروی CDP) اثر سیتوتوکسیک قابل توجهی بر زنده‌مانی این سلول‌ها نداشتند. در مقابل، داروی آزاد CDP کاهش معنی‌داری در زنده‌مانی سلول‌های سالم ایجاد کرد، که می‌تواند مربوط به عدم انتخابگری این دارو باشد (شکل ۵).



شکل ۵: درصد زنده‌مانی سلول‌های AGS و GES-1 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات BPCP-HA و BPCCP-HA حاوی داروی CDP و همچنین CDP آزاد. *حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (در سطح احتمال ۵٪) بین تیمارها در هر یک از مقاطع زمانی مورد مطالعه است.

میزان IC_{50} و شاخص انتخابی (SI)

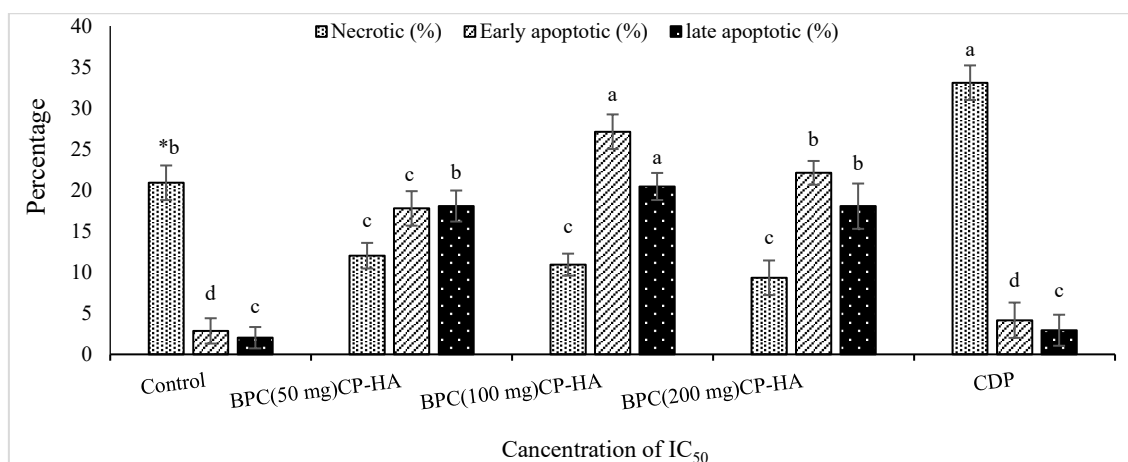
نتایج آزمون سمیت سلولی نشان داد که تیمارهای حاوی نانوذرات سنتز شده بر پایه BPCP-HA در تمامی غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg دارای IC_{50} بیشتر از $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ در هر دو رده سلولی AGS و GES-1 بودند که بیانگر سمیت بسیار پایین و عدم فعالیت ضدسرطانی مؤثر این فرمولاسیون‌ها است (جدول ۲). در مقابل، نانوذرات BPCCP-HA عملکرد زیستی بهتری از خود نشان دادند، به‌طوری‌که فرمولاسیون BPCP-HA با IC_{50} برابر $224/75 \mu\text{g}/\text{mL}$ در سلول‌های AGS و $394/56 \mu\text{g}/\text{mL}$ در سلول‌های نرمال GES-1 دارای بالاترین شاخص انتخاب‌پذیری ($SI=1/57$) در میان نانوکپسول‌های سنتز شده بود که نشان‌دهنده اثر ترجیحی بیشتر بر سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال است. همچنین با افزایش غلظت نانوکریستال‌های سلولزی، میزان IC_{50} در سلول‌های AGS به طور معنی‌داری و در سطح احتمال ۵ درصد افزایش یافت و شاخص SI نیز کاهش پیدا کرد، به‌طوری‌که در غلظت ۲۰۰ mg از نانوکریستال‌های سلولزی مقدار SI به ۱/۰۲ رسید که حاکی از کاهش انتخاب‌پذیری ضدسرطانی در غلظت‌های بالاتر است (جدول ۲). همچنین داروی آزاد CDP نیز با IC_{50} برابر $172/87 \mu\text{g}/\text{mL}$ در سلول‌های AGS و $223/45 \mu\text{g}/\text{mL}$ در سلول‌های GES-1 دارای SI معادل ۱/۳۱ بود، که اگرچه سمیت بیشتری نسبت به نانوکپسول‌ها نشان داد، اما انتخاب‌پذیری آن کمتر از فرمولاسیون BPCP-HA بود.

جدول ۲: میزان IC_{50} برای سلول‌های AGS و GES-1 و شاخص انتخابی نانوکپسول‌های سنتز شده و CDP آزاد
*حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (در سطح احتمال ۵٪) بین تیمارها در هر یک از مقاطع زمانی مورد مطالعه است.

Treatment	IC_{50} (AGS)	IC_{50} (GES-1)	SI
BPC _(50 mg) P-HA	>400 ^a	>400 ^a	1 ^b
BPC _(100 mg) P-HA	>400 ^a	>400 ^a	1 ^b
BPC _(200 mg) P-HA	>400 ^a	>400 ^a	1 ^b
BPC _(50 mg) CP-HA	224.75 ^c	394.56 ^a	1.75 ^a
BPC _(100 mg) CP-HA	302.07 ^b	399.14 ^a	1.32 ^a
BPC _(200 mg) CP-HA	390.08 ^a	>400 ^a	1.02 ^a
CDP (Free)	172.87 ^d	223.45 ^c	1.31 ^b

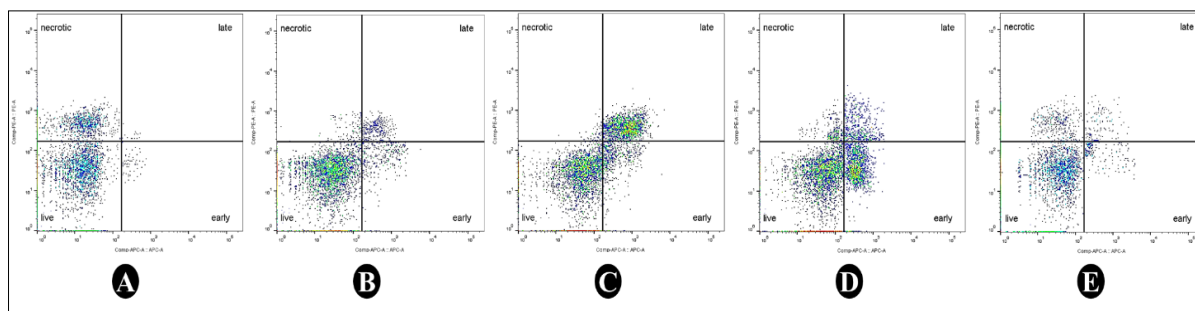
آپوپتوزیس سلولی

ارزیابی سمیت سلولی داروها و ترکیبات دارویی-پزشکی با تمرکز بر الگوهای مرگ سلولی، اعم از آپوپتوزیس یا نکروزیس، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این پژوهش پس از بررسی سمیت سلولی نانوکپسول‌های BPCP-HA، BPCCP-HA و CDP (داروی آزاد سیس‌پلاتین)، نیاز به بررسی این سمیت از نظر آپوپتوزیس سلولی است. همان‌طوری‌که در شکل‌های ۶ و ۷ که مربوط به سلول‌های AGS تیمار شده با غلظت IC_{50} ترکیبات است، نشان داده شده است، بیشترین درصد سلول‌های AGS واقع در مرحله پیش و پس آپوپتوزیس (به ترتیب ۲۷/۱۲ و ۲۰/۴۵ درصد) مربوط به تیمار این سلول‌ها با نانوکپسول‌های BPC₍₅₀₎CPHA (mg) بود، به‌طوری‌که از این نظر با تمامی تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (شکل ۶ و شکل ۷-D). اما از نظر سلول‌های واقع در مرحله نکروزیس تیمار سلول‌ها با CDP آزاد بیشترین مقدار (۳۳/۰۹ درصد) را داشت که از این نظر با تمامی تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد (شکل ۶ و شکل ۷-E).



شکل ۶: درصد سلول‌های AGS واقع در مرحله نکروتیک، پیش و پس آپوپتوتیک تحت تاثیر غلظت‌های IC_{50} نانوکپسول‌های BPCP-HA، BPCCP-HA و CDP (داروی آزاد سیس‌پلاتین)

*حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (در سطح احتمال ۵٪) بین تیمارها در هر یک از مقاطع زمانی مورد مطالعه است.



شکل ۷: تصویر شماتیک فلوسایتومتری از سلول‌های AGS واقع در فازهای نکروتیک، پیش و پس آپوپتوتیک تحت تأثیر غلظت‌های IC_{50} محاسبه شده؛ (A) تیمار شاهد، (B) نانوکپسول CP-HA (50 mg), (C) نانوکپسول CP-HA (100 mg), (D) نانوکپسول CP-HA (200 mg) و (E) CDP آزاد.

۵- بحث

در سال‌های اخیر، طراحی و توسعه سامانه‌های مبتنی بر نانوحامل هوشمند برای انتقال کارآمد و هدفمند داروهای ضدسرطان، به یکی از ارکان اصلی پزشکی نوین جهت درمان سرطان تبدیل شده است. اهمیت این فناوری در قابلیت آن برای محافظت از عوامل درمانی، افزایش نیمه عمر گردش خون سیستمیک و کاهش عوارض جانبی از طریق تجمع ترجیحی در بافت تومور به واسطه اثر افزایش نفوذ و احتباس است (۲۱). در این مطالعه، یک سامانه نانوحامل هوشمند بر پایه نانوکریستال‌های سلولزی و هیدروژل‌های BSA-PVA تقویت‌شده با PEG و لیگاند هیالورونیک اسید، جهت انتقال هدفمند و کارآمد داروی سیس‌پلاتین به سلول‌های سرطان پستان AGS طراحی و سنتز شد. هدف کلی این تحقیق، ارزیابی تأثیر غلظت‌های مختلف نانوکریستال‌های سلولزی به عنوان جزء تقویت‌کننده و پایدارساز در این نانوذرات، بر راندمان بارگذاری، رهایش کنترل‌شده و سمیت سلولی سیس‌پلاتین است. این نانوحامل با هدف‌گیری فعال گیرنده‌های $CD44$ که بر روی سلول‌های AGS به وفور بیان می‌شوند، امکان تجمع ترجیحی دارو در بافت تومور و افزایش اثرات ضدسرطانی این دارو را فراهم می‌کند. رویکرد مذکور نه تنها حلالیت و پایداری این عامل ضدسرطانی را بهبود می‌بخشد، بلکه با افزایش نفوذ و احتباس درون توموری، یک استراتژی مؤثر برای غلبه بر محدودیت‌های درمانی رایج و دستیابی به یک روش درمانی هدفمندتر و کم‌عارضه‌تر ارائه می‌دهد. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که نانوکپسول‌های BPCP-HA (BSA-PVA-CDP-PEG-HA) (حاوی CNC در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg) از زیست‌سازگاری مناسبی بر سلول‌های سرطانی (AGS) و سلول‌های سالم (GES-1) برخوردار بودند. به‌طوری‌که هیچ‌گونه سمیت قابل ملاحظه‌ای در این نانوحامل‌ها مشاهده نشد (شکل ۵). این زیست‌سازگاری مطلوب را می‌توان به ماهیت ذاتی اجزای تشکیل‌دهنده نانوذرات نسبت داد. از سویی دیگر، می‌توان دلیل اصلی عدم سمیت قابل ملاحظه این نانوحامل‌ها را به عدم تداخل مخرب آن‌ها با فرآیندهای سلولی حیاتی نسبت داد (۲۲). این نانوکپسول‌ها از ترکیباتی سنتز شده‌اند که تمایل به ایجاد تنش اکسیداتیو، آسیب غشای سلولی و یا اختلال در عملکرد میتوکندری و چرخه سلولی ندارند (۲۳). همچنین، پوشش PEG و هدف‌گیری با هیالورونیک اسید، از تجمع غیراختصاصی و در نتیجه قرار گرفتن طولانی مدت و با غلظت بالا در سلول‌های سالم (مانند GES-1 در این پژوهش) جلوگیری می‌کند (۲۴). بنابراین، سلول‌های سالم فاقد غلظت بالای گیرنده $CD44$ در سطح خود، در معرض دُز مؤثر نانوحامل‌ها قرار نگرفته و مکانیسم سمیت القا نمی‌شود. این موضوع، همراه با زیست‌تخریب‌پذیری کنترل‌شده اجزا، منجر به پاسخ سیتوتوکسیک قابل توجهی نمی‌شود. موفقیت یک سامانه نانوحامل در دارورسانی هدفمند تا حد زیادی به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن، به‌ویژه اندازه ذرات و یکنواختی توزیع (شاخص پراکندگی) وابسته است (۲۵). اندازه نانوذرات نقش کلیدی در فرآیندهای زیستی حیاتی از جمله فرار از سیستم رتیکولوآندوتلیال، نفوذ به بافت تومور از طریق اثر

افزایش نفوذ و احتباس (EPR) و درون‌یاخته‌ای شدن مؤثر دارد (۲۶). به‌طور کلی، ذرات در محدوده ۱۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر برای دستیابی به تعادل مطلوب بین زمان گردش طولانی‌مدت در خون و نفوذ کارآمد به‌درون تومور ایده‌آل در نظر گرفته می‌شوند (۲۷). هم‌چنین، یک PDI پایین (کم‌تر از ۰/۵) نشان‌دهنده توزیع یکنواخت اندازه ذرات است که برای پیش‌بینی پذیری رفتار فارماکوکینتیک و توزیع بیولوژیکی ضروری است (۲۸). مطابق با یافته‌های این مطالعه، افزایش غلظت نانوکریستال‌های سلولزی از ۵۰ به ۱۰۰ و ۲۰۰ mg در نانوذرات حامل سیس‌پلاتین (CNC-CDP)، منجر به افزایش قابل‌توجه اندازه ذرات و بهبود یکنواختی آن‌ها (کاهش PDI) شد (جدول ۱). این روند می‌تواند ناشی از نقش تقویت‌کنندگی ساختاری و عامل ایجاد شبکه نانوکریستال‌های سلولزی باشد. در غلظت‌های بالاتر، این نانوالیاف‌های سلولزی با ایجاد پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش‌های فیزیکی قوی‌تر، به عنوان یک اسکلت یا عامل متصل‌کننده عمل می‌کنند که ذرات کوچک‌تر را به یکدیگر متصل کرده و ذرات بزرگ‌تر، اما با ساختار یکپارچه‌تر و پایدارتر تشکیل می‌دهند (۲۹). این فرآیند ادغام کنترل‌شده، توزیع اندازه را یکنواخت‌تر می‌سازد. هم‌زمان، افزایش غلظت نانوالیاف‌های سلولزی موجب کاهش بار سطحی (پتانسیل زتای کم‌تر) شد (جدول ۱). دلیل این امر احتمالاً خنثی‌سازی نسبی گروه‌های باردار سطح توسط گروه‌های هیدروکسیل فراوان و نسبتاً خنثی روی نانوکریستال‌های سلولزی است (۸). این کاهش بار سطحی می‌تواند با کاهش دافعه الکترواستاتیکی بین ذرات، به تشکیل ساختارهای بزرگ‌تر و متراکم‌تر کمک کند، که با افزایش اندازه مشاهده شده همسو است. فرمولاسیون بهینه نانوکپسول BPC(100mg)CP-HA، توانست اندازه ذره‌ای در محدوده ایده‌آل و PDI بسیار پایینی ایجاد کند (جدول ۱). این نتیجه نشان‌دهنده یک هم‌افزایی مطلوب بین اجزا است. به‌نظر می‌رسد پروتئین BSA و پلیمر PVA با نقش‌های امولسیون‌کنندگی و تثبیت‌کنندگی خود، تشکیل نانوذرات را تسهیل و هدایت می‌کنند، در حالی که نانوکریستال سلولزی در غلظت بهینه (۱۰۰ mg) به‌عنوان تقویت‌کننده شبکه و بهبوددهنده پایداری فیزیکی عمل می‌کند، بدون آن‌که موجب افزایش نامطلوب اندازه یا ناهمگنی شود (۳۰). نتایج بررسی الگوی رهایش داروی سیس‌پلاتین از نانوکپسول‌های BPCCP-HA (CNC) در غلظت‌های (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg) در دو محیط با اسیدیته متفاوت (۷/۴ و ۵/۸) نشان‌دهنده وابستگی شدید روند رهایش به متغیرهای کلیدی pH محیط، غلظت نانوکریستال سلولزی و زمان است. طبق نتایج حاصل (شکل ۴)، کاهش pH از ۷/۴ به ۵/۸ به‌طور معناداری نرخ و میزان کلی رهایش دارو را در تمامی فرمولاسیون‌ها افزایش داد. مکانیسم این پدیده احتمالاً ناشی از تضعیف برهمکنش‌های فیزیکوشیمیایی بین دارو و ماتریکس نانوکپسول و نیز تورم بیشتر شبکه پلیمری در محیط اسیدی است (۳۱). محیط اسیدی شبیه‌ساز شده می‌تواند باعث پروتونه‌شدن گروه‌های عاملی در آلومین، PVA و سلولز می‌شود که منجر به کاهش پیوندهای هیدروژنی و الکترواستاتیکی متصل‌کننده دارو و در نتیجه تسهیل خروج آن می‌گردد (۳۲). علاوه‌براین، نتایج حاصل، یک رابطه معکوس معنادار بین غلظت نانوکریستال‌های سلولزی و میزان رهایش دارو را در هر دو محیط pH آشکار کرد (شکل ۴). به‌طوریکه با افزایش غلظت نانوکریستال‌های سلولزی از ۵۰ به ۲۰۰ mg، میزان رهایش دارو کاهش یافت. این مشاهدات را می‌توان به نقش تقویت‌کنندگی ساختاری و افزایش غلظت شبکه توسط نانوکریستال‌های سلولزی نسبت داد. در غلظت‌های بالاتر، نانوکریستال‌های سلولزی با ایجاد یک شبکه فیبری متراکم‌تر و پایدارتر درون ماتریکس نانوکپسول، به‌عنوان یک سد فیزیکی مؤثر عمل کرده و انتشار دارو را با محدودیت بیشتری مواجه می‌سازند (۳۳). این ساختار متراکم، خروج مولکول‌های سیس‌پلاتین را کندتر نموده و منجر به پروفایل رهایش کنترل‌شده‌تر و با دوام‌تر می‌شود. از سوی دیگر، رهایش دارو در تمامی شرایط به‌صورت وابسته به زمان بود، به‌طوری که با افزایش زمان، درصد رهایش تجمعی به‌طور پیوسته و معناداری افزایش یافت. این رفتار نشان‌دهنده مکانیسم رهایش مبتنی بر انتشار کنترل‌شده از درون شبکه پلیمری است و از پایداری فیزیکی نانوکپسول‌ها در طول دوره آزمایش حکایت دارد. همسو با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، Bourang و همکاران (۳۴)، با بررسی تاثیر

میزان pH بر رهایش داروی سیس پلاتین از نانوذرات مبتنی بر PLA-PEG/PLA-chitosan پوشش دار شده با هیالورونیک-اسید، گزارش کردند که کاهش pH محیط از ۷/۴ به ۵ میزان رهایش دارو را به طور معنی دار و تصاعدی افزایش می دهد. هم چنین گزارش کردند که افزایش رهایش دارو با گذر زمان یک رابطه مستقیم داشتند که با نتایج به دست آمده در این پژوهش هم راستا بود. ارزیابی مکانیسم القای آپوپتوزیس به عنوان یک معیار حیاتی در توسعه عوامل درمانی ضدسرطان محسوب می شود. این بررسی تعیین می کند که فرآیند مرگ سلولی به صورت برنامه ریزی شده و فاقد پاسخ التهابی (آپوپتوزیس) رخ می دهد یا با بروز نکروز همراه است که می تواند منجر به آسیب بافتی و مقاومت درمانی شود (۳۵). بنابراین، تحلیل کمی و کیفی آپوپتوزیس نه تنها مکانیسم عمل عامل درمانی را روشن می سازد، بلکه به عنوان پیش بینی کننده ای قوی برای پتانسیل ترجمه بالینی آن عمل می نماید. طبق نتایج به دست آمده در این پژوهش، مشخص شد که نانوکپسول BPCCP-HA حاوی ۵۰ mg نانوکریستال سلولزی نقش بسزایی در القای موثر آپوپتوزیس دارد (شکل های ۶ و ۷). این فرمولاسیون توانست بیشترین درصد سلول ها را در مراحل پیش آپوپتوتیک و پس آپوپتوتیک قرار دهد و از این نظر با تمامی گروه های تیماری دیگر تفاوت معنی داری داشت. این نتیجه حاکی از آن است که سیستم نانوحامل طراحی شده نه تنها سمیت سلولی ایجاد می کند، بلکه این سمیت عمدتاً از طریق فعال سازی مسیرهای تنظیم شده و تمیز آپوپتوز اعمال می شود. در مقابل، تیمار سلول ها با سیس پلاتین آزاد، الگوی کاملاً متفاوتی را نشان داد (شکل ۶). اگرچه داروی سیس پلاتین آزاد نیز سمیت قابل توجهی ایجاد کرد، اما مکانیسم غالب در این مورد نکروز بود، به طوری که بیشترین درصد سلول های نکروتیک (۳۳/۰۹ درصد) در این گروه مشاهده شد. این تفاوت معنادار بین فرم کپسوله شده و آزاد دارو، نقش حیاتی سیستم نانوحامل را در تغییر سرنوشت سلول و هدایت آن به سمت آپوپتوز اثبات می کند. دلایل احتمالی این امر را می توان به افزایش جذب درون سلولی هدفمند نانوکپسول ها از طریق گیرنده CD44 که منجر به تجمع غلظت مؤثر بالاتر دارو در اندامک های خاص می شود و رهایش کنترل شده و پایدار دارو درون سیتوپلاسم که ممکن است فعال سازی طولانی مدت و مؤثر مسیرهای سیگنالینگ آپوپتوتیک را سبب شود، نسبت داد.

۶- نتیجه گیری

این مطالعه نشان می دهد نانوکپسول های هوشمند BPCCP-HA مبتنی بر نانوکریستال های سلولزی و هیدروژل BSA-PVA راه کاری مؤثر برای رفع محدودیت های درمانی سیس پلاتین هستند. این سامانه با بهبود ویژگی های فیزیکوشیمیایی، پایداری ساختاری و رهایش وابسته به pH، انتقال هدفمند دارو به سلول های سرطانی AGS را افزایش می دهد. فرمولاسیون طراحی شده دارای زیست سازگاری مناسب بوده و سمیت کمی برای سلول های سالم نشان می دهد. هم چنین با هدایت مرگ سلولی به مسیر آپوپتوزیس برنامه ریزی شده، نسبت به داروی آزاد که عمدتاً نکروز ایجاد می کند عملکرد بهتری دارد. در نتیجه، این نانوحامل ضمن افزایش زیست فراهمی و اثر ضدسرطانی سیس پلاتین، می تواند عوارض جانبی و احتمال بروز مقاومت دارویی را کاهش داده و گامی مهم در توسعه درمان های هدفمند سرطان معده محسوب شود.

۷- تشکر و قدردانی

نویسندگان این اثر نهایت تشکر و قدردانی را از معاونت محترم امور پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل جهت همکاری در پروژه علمی حاضر و دانشگاه محقق اردبیل جهت انجام برخی از آزمایش های تکمیلی دارند.

۸- منابع

1. Bourang S, Noruzpour M, Jahanbakhsh Godekahriz S, Ebrahimi HAC, et al. Application of nanoparticles in breast cancer treatment: a systematic review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2024;397(9):6459-505.
2. Liu J, Li SM, Tang YJ, Cao JL, Hou WS, et al. Jaceosidin induces apoptosis and inhibits migration in AGS gastric cancer cells by regulating ROS-mediated signaling pathways. *Redox Report*. 2024;29(1):2313366.
3. Noruzpour M, Zakaria RA, Zare N, Bourang S, et al. Delivery of *Moringa oleifera* extract via PLA-PEG-FA/chitosan-PLA NPs into breast cancer cell lines. *BioNanoScience*. 2025;15(2):287.
4. Sugarbaker PH. Optimizing regional chemotherapy for epithelial ovarian cancer. *J Obstet Gynaecol Res*. 2022;48(6):1306-17.
5. Adylova A, Kapanova G, Datkhayeva Z, Raganina K, et al. Nanotechnology-based cancer chemoprevention in glioblastoma. *Folia Neuropathol*. 2023;61(3):235-41.
6. O'Donnell PH, Milowsky MI, Petrylak DP, Hoimes CJ, et al. Enfortumab vedotin with or without pembrolizumab in cisplatin-ineligible patients with previously untreated locally advanced or metastatic urothelial cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2023;41(25):4107-17.
7. Romani AM. Cisplatin in cancer treatment. *Biochemical pharmacology*. 2022;206:115323.
8. Hemraz UD, Lam E, Sunasee R. Recent advances in cellulose nanocrystals-based antimicrobial agents. *Carbohydr Polym*. 2023;315:120987.
9. Babaei-Ghazvini A, Vafakish B, Patel R, Falua KJ, et al. Cellulose nanocrystals in the development of biodegradable materials: A review on CNC resources, modification, and their hybridization. *Int J Biol Macromol*. 2024;258(Pt 1):128834.
10. Hayat M, Bukhari SAR, Irfan M. Electrospinning of bovine serum albumin-based nano-fibers: From synthesis to medical prospects; Challenges and future directions. *Biotechnol J*. 2023;18(12):e2300279.
11. Solanki R, Rostamabadi H, Patel S, Jafari SM. Anticancer nano-delivery systems based on bovine serum albumin nanoparticles: A critical review. *Int J Biol Macromol*. 2021;193(Pt A):528-40.
12. Sabbagh F, Khatir NM, Kiarostami K. Synthesis and Characterization of γ -Carrageenan/PVA Nanocomposite Hydrogels in Combination with MgZnO Nanoparticles to Evaluate the Catechin Release. *Polymers (Basel)*. 2023;15 (2).
13. Bourang S, Asadian S, Noruzpour M, Mansuryar A, et al. PLA-HA/Fe₃O₄ magnetic nanoparticles loaded with curcumin: physicochemical characterization and toxicity evaluation in HCT116 colorectal cancer cells. *Discover Applied Sciences*. 2024;6(4):186.
14. Chitgupi U, Qin Y, Ghosh S, Quinn B, et al. Folate-Targeted Nanoliposomal Chemophototherapy. *Pharmaceutics*. 2023;15 (10).
15. Yan S, Na J, Liu X, Wu P. Different Targeting Ligands-Mediated Drug Delivery Systems for Tumor Therapy. *Pharmaceutics*. 2024;16(2).

16. Pachua L, Nath R. Recent Developments in Shape-Controlled Synthesis of Cellulose Nanocrystals. *Mini Rev Med Chem.* 2023;23(13):1360-75.
17. Chen L, Xu W, Yang Z, McClements DJ, et al. Co-encapsulation of quercetin and resveratrol: Comparison in different layers of zein-carboxymethyl cellulose nanoparticles. *Int J Biol Macromol.* 2024;278(Pt 2):134827.
18. 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).
19. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci.* 2021;22 (23).
20. 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.
21. Elsayed N. Selective imaging, gene, and therapeutic delivery using PEGylated and pH-Sensitive nanoparticles for enhanced lung disorder treatment. *International Journal of Pharmaceutics.* 2024;666:124819.
22. Gong Y, Hu X, Chen M, Wang J. Recent progress of iron-based nanomaterials in gene delivery and tumor gene therapy. *Journal of Nanobiotechnology.* 2024;22(1):309.
23. Hamimed S, Jabberi M, Chatti A. Nanotechnology in drug and gene delivery. *Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 2022;395(7):769-87.
24. Mi X, Hu M, Dong M, Yang Z, et al. Folic Acid Decorated Zeolitic Imidazolate Framework (ZIF-8) Loaded with Baicalin as a Nano-Drug Delivery System for Breast Cancer Therapy. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:8337-52.
25. Sun C, Hu Y, Zhu Z, He Z, et al. Starch nanoparticles with predictable size prepared by alternate treatments of ball milling and ultrasonication. *Int J Biol Macromol.* 2024;272(Pt 2):132862.
26. Gaber DA, Alsubaiyel AM, Alabdulrahim AK, Alharbi HZ, et al. Nano-Emulsion Based Gel for Topical Delivery of an Anti-Inflammatory Drug: In vitro and in vivo Evaluation. *Drug Des Devel Ther.* 2023;17:1435-51.
27. Hajebe S, Yousefiasl S, Rahimmanesh I, Dahim A, et al. Genetically Engineered Viral Vectors and Organic-Based Non-Viral Nanocarriers for Drug Delivery Applications. *Advanced healthcare materials.* 2022;11(20):2201583.
28. Ighalo JO, Sagboye PA, Umenweke G, Ajala OJ, et al. CuO nanoparticles (CuO NPs) for water treatment: A review of recent advances. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management.* 2021;15:100443.
29. Tang Z, Lin X, Yu M, Mondal AK, Wu H. Recent advances in TEMPO-oxidized cellulose nanofibers: Oxidation mechanism, characterization, properties and applications. *Int J Biol Macromol.* 2024;259(Pt 1):129081.
30. Qureshi SS, Nizamuddin S, Xu J, Vancov T, Chen C. Cellulose nanocrystals from agriculture and forestry biomass: synthesis methods, characterization and industrial applications. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2024;31(49):58745-78.

31. Perez-Pacheco Y, Tylkowski B, Garcia-Valls R. Chitosan micro/nanocapsules in action: linking design, production, and therapeutic application. *Molecules*. 2025;30(2):252.
32. Nunziata G, Pollonio D, Lacroce E, Rossi F. Smart pH-Responsive polymers in biomedical Applications: Nanoparticles, hydrogels, and emerging hybrid platforms. *Materials Today Chemistry*. 2025;49:103063.
33. Singh S, Bhardwaj S, Tiwari P, Dev K, et al. Recent advances in cellulose nanocrystals-based sensors: a review. *Materials Advances*. 2024;5(7):2622-54.
34. 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;16(1):1-28.
35. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*. 2012;4(5):330-49.