

Original Article

# Engineering of multifunctional nanocarriers based on biopolymers for siRNA delivery, selective targeting, and enhanced biostability in MCF-7 cell lines

Hashem Yaghoubi<sup>1\*</sup>, Mehran Noruzpour<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Department of Biotechnology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

## ARTICLE INFO

### Article History:

Received: 4 Apr 2026

Revised: 23 May 2026

Accepted: 25 May 2026

ePublished: 20 Jul 2026

### Keywords:

- Breast cancer
- Chitosan
- Hyaluronic acid
- Nanotechnology
- MCF-7
- Targeted gene therapy

## Abstract

**Background.** Nanotechnology addresses the challenge of targeted drug and nucleic acid delivery to cancer cells through the design of intelligent carriers. This study was conducted to design a smart nanocarrier based on PCL/Chitosan/PEG functionalized with hyaluronic acid (HA) for the delivery of siRNA to breast cancer cells (MCF-7).

**Methods.** The physicochemical properties of the synthesized nanoparticles were analyzed using <sup>1</sup>H-NMR and TGA. Zeta potential and nanoparticle size were assessed using dynamic light scattering (DLS), confirming successful synthesis.

**Results.** DLS analysis revealed that after loading siRNA-FAM, the size of PCPH nanoparticles increased from 201±7 nm to 294±9 nm, and that of PEI nanoparticles from 186±11 nm to 220±6 nm. Meanwhile, siRNA loading reduced the zeta potential of PCPH nanoparticles from +1.72±0.52 mV to -2.5±0.50 mV. The results showed that at neutral pH, PEI/siRNA-FAM exhibited significantly higher release than PCPH after 480 minutes, whereas in an acidic environment, both nanoparticles released siRNA-FAM at a similar rate. Cytotoxicity assessment indicated that PCPH nanoparticles carrying siRNA had significant inhibitory effects on the growth of MCF-7 cells. The results of gel electrophoresis confirmed that PCPH nanoparticles effectively interacted electrostatically with siRNA-FAM, neutralizing its negative charge and halting its migration in the gel.

**Conclusion.** PCL-Chitosan-PEG-HA nanoparticles serve as a biocompatible and targeted system for siRNA delivery to cancer cells, demonstrating high efficiency in targeted gene therapy.

**Practical Implications.** The findings of this study represent a significant step toward more personalized and effective cancer treatments using nanotechnology.

**How to cite this article:** Yaghoubi H, Noruzpour M. Engineering of multifunctional nanocarriers based on biopolymers for siRNA delivery, selective targeting, and enhanced biostability in MCF-7 cell lines. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2026;48(3): . doi: 10.34172/mj.026.35311. Persian.

## Extended Abstract

### Background

Breast cancer is a major global health challenge, and conventional treatments such as chemotherapy, radiotherapy, surgery, and hormone therapy are limited by severe side effects, damage to healthy tissues, and drug resistance. Therefore, safer and more targeted therapeutic approaches are required.

Nanotechnology provides an effective and safe platform for selective drug and gene delivery. In this study, PCL-Chitosan-PEG-HA nanoparticles were designed for targeted siRNA delivery into MCF-7 breast cancer cells. PCL enabled sustained release, chitosan improved siRNA loading and protection, PEG enhanced stability and circulation time, and

\*Corresponding author; Email: [yaghoubi\\_h@iau.ac.ir](mailto:yaghoubi_h@iau.ac.ir)

© 2026 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

hyaluronic acid facilitated CD<sub>44</sub> receptor-mediated targeting. The nanoparticles were evaluated for physicochemical properties, biocompatibility, cytotoxicity, and gene delivery efficiency, demonstrating their potential for effective and targeted breast cancer therapy.

## Methods

All chemicals and culture media were obtained from standard commercial suppliers, including Merck, Sigma-Aldrich, and Biowest. The MCF-7 breast cancer cell line was provided by the Pasteur Institute of Iran.

Chitosan was dissolved in acetic acid, while PEG-HA was activated using EDC/NHS chemistry. The activated PEG-HA was added to the chitosan solution, followed by pH adjustment and continuous stirring. The product was precipitated, dialyzed, and freeze-dried. For the preparation of PCPH nanoparticles, PCL and Chitosan-PEG-HA were dissolved in chloroform, mixed dropwise, stirred for 24 hours, purified by dialysis, and freeze-dried.

PCPH or PEI polymers were mixed with siRNA-FAM solution using solvent diffusion and sonication methods. PVA and PVP solutions were added to stabilize the nanocapsules. Excess solvent was removed by centrifugation, and nanoparticles were collected and freeze-dried.

A *survivin* (BIRC5)-targeting siRNA-FAM sequence was designed and synthesized by Santa Cruz Biotechnology.

Sense strand: 5'-GCAUUCGUCUCCACUUGCATT-3'  
Antisense strand: 5'-UGCAAGUGGAGACGAAUGCTT-3'

Structural characterization was performed using <sup>1</sup>H-NMR. Particle size and zeta potential were analyzed by DLS, while magnetic properties were evaluated using VSM.

siRNA release profiles were studied under physiological and acidic pH conditions to simulate healthy and tumor microenvironments. Released siRNA was quantified at scheduled intervals.

MCF-7 cells were treated with different concentrations of nanocapsules. Cell viability and IC<sub>50</sub> values were determined using the MTT assay.

Protection against plasma degradation was assessed by agarose gel electrophoresis. Gene delivery efficiency was evaluated in MCF-7 cells using flow cytometry and fluorescence microscopy.

Experiments were performed in triplicate. Data were analyzed using one-way ANOVA and Duncan's test in SPSS version 22 at a significance level of  $P < 0.05$ .

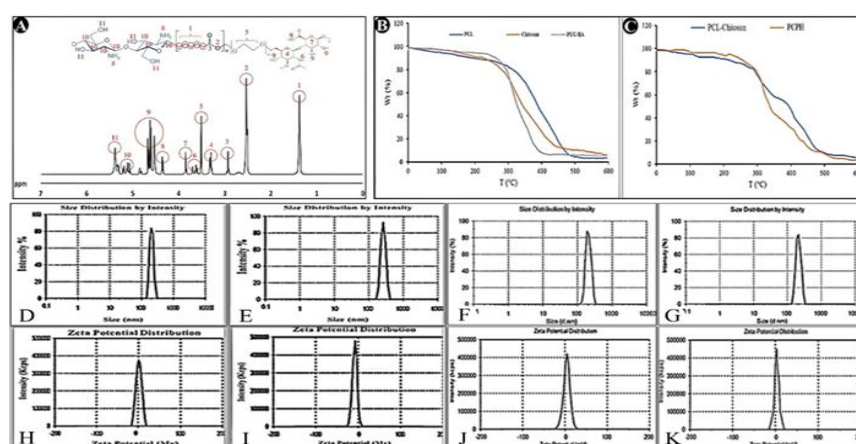
## Results

The <sup>1</sup>H-NMR spectrum confirmed the successful synthesis of PCPH nanoparticles and the presence of all structural components (Figure 1A), with characteristic PEG, hyaluronic acid, and chitosan peaks indicating effective conjugation. TGA analysis showed two-step thermal degradation for PCL and chitosan, while PEG-HA and PEI exhibited multi-step degradation patterns (Figures 1B and C), supporting successful nanostructure formation. PCPH nanoparticles displayed multiple degradation stages and reduced thermal stability compared to individual polymers.

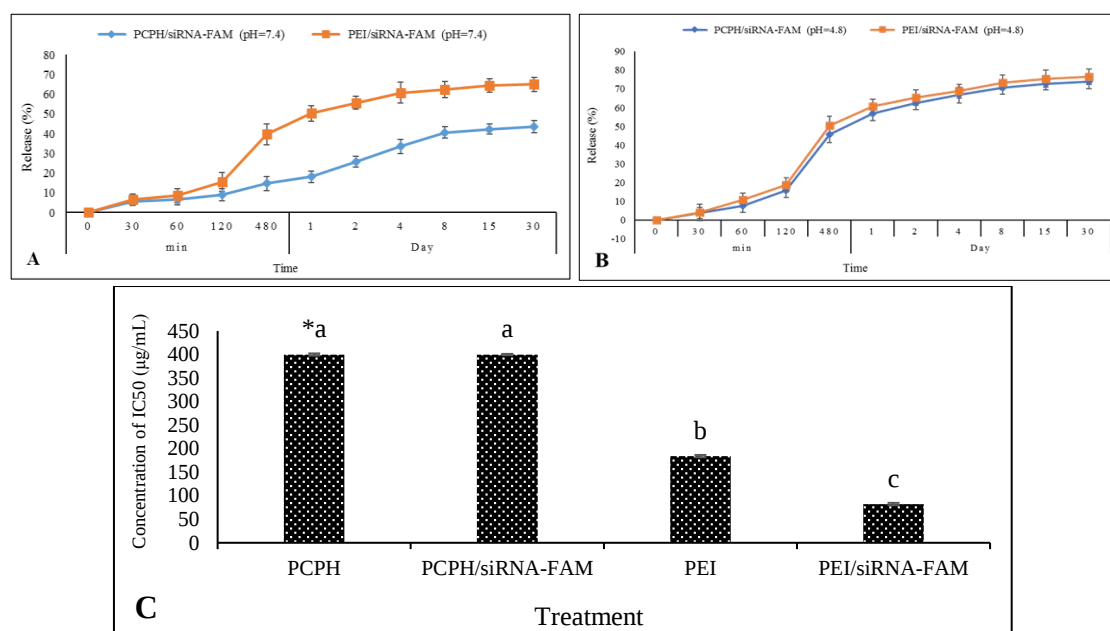
DLS results revealed that siRNA-FAM loading increased particle size from 201±7 nm to 294±9 nm and shifted zeta potential from +1.72±0.52 mV to -2.50±0.50 mV, confirming successful siRNA complexation. Similar trends were observed for PEI nanoparticles, validating efficient siRNA loading and stable nanocomplex formation.

The release behavior of siRNA-FAM from PCPH/siRNA-FAM and PEI/siRNA-FAM nanocapsules showed time-dependent release at pH 7.4, with higher release from PEI after 480 minutes, while similar release was observed at pH 4.8 (Figures 2A and 2B).

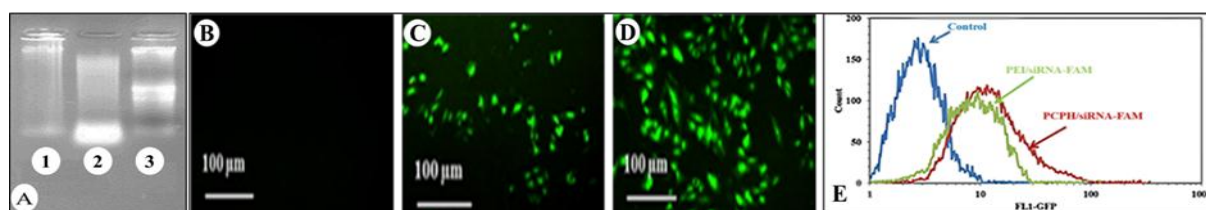
PCPH nanoparticles, with or without siRNA-FAM, exhibited significantly lower cytotoxicity compared with PEI-based formulations (Figure 2C). The IC<sub>50</sub> values of PCPH formulations were higher than the maximum tested concentration (400 µg/mL), indicating favorable biocompatibility. In contrast, PEI/siRNA-FAM showed the lowest IC<sub>50</sub> value, reflecting higher toxicity toward MCF-7 cells.



**Figure 1.** (A)  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of PCPH nanoparticles; TGA thermograms of (B) PCL, chitosan, and PEG-HA polymers, and (C) PEI and PCPH nanoparticles; DLS analysis of nanoparticle size and zeta potential: (D–G) particle size distribution of PCPH, PCPH/siRNA-FAM, PEI, and PEI/siRNA-FAM nanoparticles, respectively; (H–K) zeta potential of PCPH, PCPH/siRNA-FAM, PEI, and PEI/siRNA-FAM nanoparticles, respectively



**Figure 2.** Release profile of siRNA-FAM from PCPH/siRNA-FAM and PEI/siRNA-FAM nanocapsules in PBS buffer at (A) pH 7.4 and (B) pH 4.8; and (C)  $\text{IC}_{50}$  values of PCPH and PEI nanoparticles, either alone or loaded with siRNA-FAM



**Figure 3.** (A) Effect of PCPH and PEI nanoparticles on neutralization of the negative charge of siRNA; (1) PCPH/siRNA-FAM, (2) free siRNA-FAM, and (3) PEI/siRNA-FAM. (B–D) Fluorescence microscopy images of MCF-7 cells treated with (B) free siRNA-FAM, (C) PEI/siRNA-FAM nanocapsules, and (D) PCPH/siRNA-FAM nanocapsules. (E) Flow cytometry analysis of MCF-7 cells treated with free siRNA-FAM, PEI/siRNA-FAM, and PCPH/siRNA-FAM formulations

The results of gel electrophoresis demonstrated that PCPH nanoparticles effectively inhibited siRNA migration, confirming strong electrostatic interactions between chitosan amino groups and siRNA phosphate groups (Figure 3A). Flow cytometry and fluorescence microscopy further confirmed efficient cellular uptake and intracellular delivery of siRNA-FAM into MCF-7 cells by PCPH nanocapsules (Figures 3B–E).

### Discussion

A PCL–Chitosan–PEG–HA nanocarrier was developed in this study for targeted siRNA delivery in breast cancer therapy to overcome limitations of conventional treatments, including low selectivity, toxicity, and drug resistance. Physicochemical

analyses confirmed successful nanoparticle formation, structural stability, and efficient siRNA loading, indicated by changes in particle size and zeta potential. PEG improved stability and circulation time, while chitosan enhanced siRNA binding and protection. The system showed pH-responsive release with higher siRNA release in acidic tumor environments. Biocompatibility tests indicated low cytotoxicity. Enhanced cellular uptake and enzymatic protection were observed due to electrostatic interactions. Hyaluronic acid enabled CD<sub>44</sub> targeting in MCF-7 cells, ensuring selective internalization. Overall, the nanoplatform demonstrated efficient delivery, controlled release, and strong potential for breast cancer gene therapy applications.

## مهندسی نانوحامل چندکاره بر پایه پلیمرهای زیستی برای رهایش siRNA، هدفگیری انتخابی و افزایش پایداری زیستی در رده سلولی MCF-7

هاشم یعقوبی<sup>۱\*</sup>، مهران نوروزپور<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه زیست‌شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

<sup>۲</sup>گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

### چکیده

**زمینه.** نانوتکنولوژی با طراحی حامل‌های هوشمند، چالش انتقال هدفمند داروها و اسیدهای نوکلئیک به سلول‌های سرطانی را مرتفع می‌کند. این مطالعه به طراحی نانوحامل هوشمند مبتنی بر PCL/Chitosan/PEG عامل‌دار شده با هیالورونیک اسید (HA) برای رهایش siRNA به رده سلول‌های سرطان پستان (MCF-7) می‌پردازد.

**روش کار.** ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات سنتز شده از طریق <sup>1</sup>H-NMR، TGA بررسی شد. پتانسیل زتا و اندازه نانوذرات به کمک DLS بررسی و سنتز موفقیت‌آمیز نانوذرات تأیید شدند.

**یافته‌ها.** بررسی‌های DLS نشان داد که پس از بارگذاری siRNA-FAM، اندازه نانوذرات PCPH از  $201 \pm 7$  نانومتر به  $294 \pm 9$  نانومتر و نانوذرات PEI از  $186 \pm 11$  به  $220 \pm 6$  نانومتر افزایش یافت. این در حالی‌ست که بارگذاری این قطعه ژنی پتانسیل زتای نانوذرات PCPH را از  $+1/72 \pm 0/52$  میلی‌ولت به  $-2/5 \pm 0/50$  میلی‌ولت کاهش داد. الگوی آزادسازی نشان داد که در pH خنثی، siRNA-FAM/PEI پس از ۴۸۰ دقیقه آزادسازی بسیار بیشتری نسبت به PCPH داشت، در حالی که در محیط اسیدی هر دو نانوذره با سرعت یکسانی siRNA-FAM را آزاد کردند. نتایج ارزیابی سمیت سلولی مشخص شد که نانوذرات PCPH حامل siRNA اثرات مهارکنندگی رشد سلولی قابل توجهی بر روی رده سلولی MCF-7 نداشته‌اند. نتایج الکتروفورز ژل تأیید کرد که نانوذرات PCPH به‌طور مؤثر با siRNA-FAM برهم‌کنش الکترواستاتیک داشته و قادر به خنثی‌سازی بار منفی و توقف حرکت آن در ژل هستند.

**نتیجه‌گیری.** نانوذرات PCL-Chitosan-PEG-HA به‌عنوان یک سامانه زیست‌سازگار و هدفمند جهت انتقال siRNA علیه سرطان، از کارایی بالایی در ژن‌درمانی هدفمند برخوردارند.

**پیامدهای عملی.** نتایج حاصل از این پژوهش گامی مهم در جهت درمان‌های ژنتیکی شخصی‌شده و مؤثرتر سرطان با استفاده از نانوتکنولوژی است.

### اطلاعات مقاله

#### سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۵/۱۱/۱۵  
اصلاح نهایی: ۱۴۰۵/۳/۲  
پذیرش: ۱۴۰۵/۳/۴  
انتشار برخط: ۱۴۰۵/۴/۲۹

#### کلیدواژه‌ها:

- ژن‌درمانی هدفمند
- سرطان پستان
- کیتوسان
- نانوتکنولوژی
- هیالورونیک اسید و رده سلولی MCF-7

### مقدمه

مقاومت دارویی مواجه هستند.<sup>۳</sup> در این میان، نانوتکنولوژی به-عنوان یک راهبرد تحول‌آفرین، پتانسیل فوق‌العاده‌ای بر 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، به ویژه برای تحویل عوامل درمانی نوین نظیر siRNA (که قادر به خاموش کردن ژن‌های کلیدی درگیر در پیشرفت سرطان هستند)، امیدبخش بوده و افق جدیدی را در نبرد با سرطان پستان، به ویژه زیرگروه‌های مهاجم،

سرطان به‌عنوان یکی از تهدیدکننده‌ترین چالش‌های نظام سلامت جهانی و دومین عامل اصلی مرگ‌ومیر محسوب می‌شود. در این میان، سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در میان زنان در سراسر جهان است.<sup>۱</sup> در حال حاضر، پرکاربردترین راهبردهای درمانی جهت درمان بیماری سرطان به ویژه سرطان پستان شامل جراحی، پرتودرمانی، شیمی‌درمانی و هورمون‌درمانی می‌باشد.<sup>۲</sup> اگرچه این روش‌ها تا حدی موفق بوده‌اند، اما با محدودیت‌های جدی از جمله عوارض جانبی گسترده، آسیب به بافت‌های سالم و به ویژه، توسعه

\*نویسنده مسئول؛ ایمیل: yaghoobi\_h@iau.ac.ir

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

siRNA به رده سلول های MCF-7 طراحی شدند. هسته siRNA، PLC را محصور می کند، پوسته کیتوسان بارگذاری و محافظت را فراهم کرده و لیگاند HA با هدف گیری گیرنده  $CD_{44}$ ، فرآیند اندوسیتوز را تسهیل می نماید. همچنین ویژگی های فیزیکیوشیمیایی، زیست سازگاری، سمیت و کارایی انتقال ژن نانوذرات سنتز شده به طور جامع ارزیابی شدند.

### روش کار

کلرید پتاسیم (KCl)، متیل سولفوکسید (DMSO)، اتانول، کیتوسان، هیدروکلرید اسید (HCL)، دی پتاسیم فسفات ( $KH_2PO_4$ )، نمک MTT، برماید کلروفرم،  $NH_2$ -PEG-HA و هیدروکسید سدیم (NaOH) از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. همچنین، پارافرمالدهید از آزمایشگاه شیمی دکتر موال (ایران) تهیه شد. سرم جنین گاوی (FBS)، محیط کشت DMEM/F12 و تربیسین-EDTA از شرکت Biowest (ایالات متحده آمریکا) خریداری شدند. نانوذرات PEI (با وزن مولکولی ۲۵ کیلودالتون) از شرکت Sigma-Aldrich و رده سلولی های MCF-7 با کد (ATCC HTB-22) از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند.

برای سنتز نانوذرات PCL-Chitosan-PEG-HA (PCPH) ابتدا ۱۰۰ mg کیتوسان (جرم مولی ۵۰۰۰۰ Da و درجه داستیل شده ۹۰ درصد) در ۲۰ mL محلول اسیداستیک ۱ درصد (جرمی/حجمی) حل شد. به طور همزمان، ۵۰ mg PEG (۲۰۰۰ Da) عامل دار شده با هیالورونیک اسید در حضور ۲۵ mg EDC و ۱۵ mg NHS در ۱۰ mL DMSO فعال سازی گردید. پس از ۲ ساعت و فعال سازی در دمای  $25^{\circ}C$ ، محلول PEG-HA فعال به آرامی به محلول کیتوسان اضافه شده و pH محیط با NaOH (یک mol) به ۵/۵ تنظیم شد. واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $40^{\circ}C$  تحت هم زدن مداوم با سرعت ۵۰۰ rpm ادامه یافت. محصول خام ابتدا با اتانول سرد رسوب دهی شده و سپس به مدت ۴۸ ساعت در مقابل آب دیونیزه (با استفاده از غشای دیالیز) دیالیز شد. در نهایت، محصول نهایی به کمک دستگاه (LMC-2, Rubarth, Germany) انجماد خشک شد. جهت سنتز نانوذرات PCPH ابتدا  $30 \mu\text{mol}$  Chitosan-PEG-H و  $10 \mu\text{mol}$  PCL به صورت جداگانه در ۳ mL کلروفرم حل شدند. سپس محلول کلروفرم حاوی Chitosan-PEG-HA به صورت قطره ای به محلول کلروفرم PCL اضافه شد (این فرایند در دمای  $40^{\circ}C$  الی  $45^{\circ}C$  انجام گرفت) و به مدت ۲۴ ساعت تحت هم زدن مکانیکی قرار گرفتند. خالص سازی نانوذرات PCPH نیز از طریق فرآیند دیالیز در برابر آب دیونیزه به مدت ۲ روز با جایگزین کردن آب در هر ۶ ساعت

گشوده است.<sup>۴</sup> پلی کاپرولاکتون (PCL) یک پلیمر مصنوعی، زیست تخریب پذیر و آب گریز از خانواده پلی استرهای آلیفاتیک است. در سیستم های دارورسانی و ژن درمانی هدفمند، PCL عمدتاً نقش هسته ساختاری نانوذرات را ایفا می کند.<sup>۵</sup> کلیدی ترین مزیت PCL در دارورسانی و ژن درمانی هدفمند، نیمه عمر طولانی و تخریب کند آن در محیط فیزیولوژیک است که منجر به رهایش کنترل شده و پایدار دارو و یا ژن در بازه های زمانی طولانی مدت می گردد.<sup>۶</sup> از سویی دیگر، کیتوسان یک پلی ساکارید کاتیونی طبیعی، زیست تخریب پذیر و زیست سازگار است که از داستیل شدن کیتین به دست می آید. کلیدی ترین ویژگی کیتوسان در انتقال قطعات ژنی، بار مثبت ذاتی آن در pH فیزیولوژیک است که امکان تشکیل کمپلکس های پایدار (پلی پلکس) با اسیدهای نوکلئید دارای بار منفی مانند siRNA را از طریق برهم کنش های الکترواستاتیک فراهم می کند.<sup>۷</sup> این پلی پلکس نه تنها قطعات ژنی را در برابر تخریب توسط نوکلئازها در جریان خون محافظت می کنند، بلکه به دلیل شباهت با کاتیون های سطحی غشای سلول، جذب سلولی را به طور موثر افزایش می دهند. علاوه بر این، کیتوسان دارای خاصیت نفوذ پذیری موکوسی است که عبور از سد های بیولوژیک مانند مخاط را تسهیل می کند.<sup>۸</sup> همچنین، پلی اتیلن گلیکول (PEG) یک پلیمر مصنوعی، آب دوست و زیست سازگار است که با ایجاد اثر استیلنت نقش کلیدی در بهبود عملکرد نانوذرات ایفا می کند.<sup>۹</sup> این پلیمر با تشکیل یک لایه هیدراته و متحرک بر سطح نانوذره، از اتصال پروتئین های پلاسما (اپسونین ها) جلوگیری نموده و شناسایی توسط سیستم رتیولو آندوتلیال را به تأخیر می اندازد. این مکانیسم منجر به افزایش چشم گیر زمان گردش خون و بهبود پایداری کلوئیدی سیستم می شود.<sup>۱۰</sup> همچنین هیالورونیک اسید به عنوان یک لیگاند زیست سازگار، نقش تعیین کننده ای در هدفمندی سلولی نانوذره ایفا می کند.<sup>۱۱</sup> این گلیکوز آمینو گلیکان با اتصال اختصاصی به گیرنده  $CD_{44}$  که در سلول های سرطانی پستان به طور مستمر و فوق بیانی تولید می شوند، مکانیسم آندوسیتوز واسطه شده توسط گیرنده را فعال می نماید. این برهم کنش نه تنها تجمع ترجیحی نانوذره در بافت توموری را افزایش می دهد، بلکه کارایی انتقال به درون سلولی را نیز به طور قابل توجهی بهبود می بخشد.<sup>۱۲</sup> از آنجایی که گیرنده های  $CD_{44}$  یک نشانگر کلیدی در سلول های بنیادی سرطانی محسوب می شود، این هدفمندی امکان مقابله موثر با تهاجمی ترین زیرجمعیت سلولی را فراهم می سازد. علاوه بر این، زیست تخریب پذیری و سمیت پایین هیالورونیک اسید، ایمنی زیستی سیستم دارو رسانی را تضمین می کند.<sup>۱۳</sup> در این پژوهش، نانوذرات هوشمند PCL-Chitosan-PEG-HA جهت انتقال هدفمند

انجام شد. سرانجام، محصول با استفاده از دستگاه انجماد خشک (LMC-2, Rubarth, Germany) جمع‌آوری شد.<sup>۱۴</sup>

برای سنتز نانوکپسول‌های PCPH/siRNA-FAM و PEI/siRNA-FAM که به کمک تکنیک انتشار حلال تهیه شدند، ابتدا به ۴ mL محلول کلروفرم، ۲۰ mg کوپلیمر PCPH یا PEI و ۵/۵ mL محلول آبی حاوی ۲۵۰ μg siRNA-FAM اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه سونیکه (۳۰ KH و بازه زمانی ۵ ثانیه) گردید. سپس ۶ mL محلول PVA یک درصد به سوسپانسیون حاصل اضافه و به مدت دو دقیقه دیگر سونیکه شد. سپس ۳۰ mL محلول PVP ۳/۳ درصد اضافه شد. پس از ۵ ساعت، کلروفرم اضافی به کمک سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه) جدا شد. نانوکپسول‌های حاصل با استفاده از سانتریفیوژ (۱۵۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه) جمع‌آوری شدند. در انتها نانوکپسول‌های حاصل به کمک انجماد خشک، خشک شده و برای استفاده در آزمایش‌های مختلف در دمای -۲۰°C نگهداری شدند.<sup>۱۵</sup>

جهت بارگذاری siRNA-FAM، از siRNA اختصاصی علیه ژن *Survivin (BIRC5)* استفاده شد. توالی‌های siRNA بر اساس توالی mRNA هدف و با استفاده از الگوریتم‌های اختصاصی طراحی siRNA توسط شرکت Santa Cruz Biotechnology (به شماره sc-29499) طراحی و سنتز گردید.<sup>۱۶</sup> توالی siRNA مورد استفاده به شرح زیر بود:

توالی سنس: ۵'-GCAUUCGUCUCCACUUGCATT-۳'

توالی آنتی‌سنس: ۵'-UGCAAGUGGAGACGAAUGCTT-۳'

ویژگی‌های ساختاری و تأیید ترکیبات موجود در نانوذرات سنتز شده PCPH و PEI (خریداری شده) توسط طیف‌سنجی تشدید مغناطیسی هسته‌ای هیدروژن (<sup>1</sup>H-NMR) استفاده شد. همچنین ویژگی‌های مغناطیسی (VSM) نمونه‌ها با استفاده از مغناطیس‌سنج نمونه ارتعاشی ارزیابی شد (VSM; Lake Shore Model 7400, Tokyo, Japan). از سویی دیگر، اندازه متوسط نانوذرات و نانوکپسول‌ها و پتانسیل زتا آن‌ها با استفاده از پراکندگی نور پویا (DLS, Malvern Instruments, Westborough, USA) تعیین شد.

برای مقایسه سینتیک انتشار siRNA-FAM در محیط اطراف سلول‌های سالم و سرطانی، از دو محیط مختلف با pH متفاوت (pH=۷/۴ محیط اطراف سلول‌های سالم) و (pH=۴/۸ محیط اطراف سلول‌های سرطانی) استفاده شد. برای تعیین سینتیک آزادسازی، نانوکپسول‌ها به‌طور جداگانه در ۱۰ میلی‌لیتر بافر استات سدیم (pH=۵) و محلول گلوکز ۵ درصد (pH=۷/۴) در ۳۷ °C 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. پس از آن، تا بازه زمانی بعدی، نانوکپسول‌ها در ۱۰ mL محیط کشت تازه، مجدداً به حالت سوسپانسیون درآمدند. سرانجام، مقدار siRNA-FAM آزاد شده در مایع رویی نانوذرات، اندازه‌گیری و با میزان siRNA-FAM مورد استفاده در فرآیند بارگیری مقایسه گردید.<sup>۱۷</sup> از معادله زیر جهت محاسبه سینتیک آزادسازی siRNA-FAM استفاده شد:

$$\times 100 = \frac{\text{موجود در محلول رویی siRNA}}{\text{بارگذاری شده siRNA}} \text{ سینتیک آزادسازی}$$

برای آزمون MTT (IC50) رده سلول‌های MCF-7 به پلیت‌های ۹۶ چاهکی با تراکم سلول  $7 \times 10^3$  سلول در هر چاهک در ۲۰۰ μL محیط کشت کامل (محیط DMEM/F12 با ۱۰ درصد FBS) منتقل و سپس انکوبه شدند (دمای ۳۷ °C و ۵ درصد CO<sub>2</sub>). پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف نانوکپسول‌های (صفر (شاهد)، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ μg.mL<sup>-1</sup>) حاوی داروی siRNA-FAM و همچنین نانوذرات فاقد ژن (نمونه شاهد) تیمار شده و دوباره انکوبه شدند. همچنین از PEI حاوی siRNA-FAM و فاقد آن در غلظت‌های (صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ μg.mL<sup>-1</sup>) به‌عنوان نمونه شاهد منفی استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت، ۲۰ μL محلول MTT (۵ μg.mL<sup>-1</sup>) به هر چاهک اضافه شده و پس از انکوباسیون (۵ ساعت و دمای ۳۷ °C)، مایع رویی برداشته و بلورهای فورمازان توسط DMSO (۲۰۰ μL) حل شد. پس از انکوباسیون (۳۰ دقیقه و دمای ۳۷ °C)، جذب نوری در ۵۷۰ nm توسط دستگاه میکروپلیت ریدر (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) اندازه‌گیری شد.<sup>۱۸</sup>

برای سنجش محافظت از siRNA-FAM، ابتدا نانوکپسول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با ۵۰ μL پلاسمای انسانی ۲۰ درصد در دمای ۳۷ °C، به همراه siRNA-FAM بدون پوشش (حاوی مقدار ثابت ۲ μg siRNA-FAM در هر نمونه) انکوبه شدند تا توانایی آن‌ها در محافظت در برابر تخریب پلازما ارزیابی شود. پس از غیرفعال کردن نوکلئازها با ۵ μL محلول EDTA (۵/۵ مولار و pH=۸)، هپارین (۱ درصد وزنی/حجمی) اضافه شد و ۴ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شد. از ژل آگارز ۲ درصد برای تجزیه و تحلیل الکتروفورز ژل نمونه‌ها استفاده شد.<sup>۱۹</sup>

در این مطالعه کارایی انتقال کمپلکس‌های نانوکپسول‌های siRNA-FAM و PCPH/siRNA-FAM فاقد پوشش (به عنوان تیمار شاهد منفی) با استفاده از رده سلولی MCF-7 ارزیابی شد. پس از انجام تیمار سلول‌ها با ترکیبات ذکر شده (غلظت نمونه‌ها بر حسب ۲ میکروگرم siRNA-FAM)، نمونه‌ها به مدت ۸ ساعت انکوبه شدند (۵ درصد CO<sub>2</sub> در دمای ۳۷ °C). پس از این مدت محیط رویی با محیط کشت جدید جایگزین شد و سپس سلول‌ها به مدت ۲۴

ساعت دیگر انکوبه شدند. کارایی انتقال ژن با استفاده از فلوسیتومتری (CyFlow Space، آلمان) و میکروسکوپ فلورسنت معکوس (Nikon TE200) ارزیابی شد.<sup>۱۷</sup>

هر پارامتر اندازه‌گیری شده در این مطالعه در سه تکرار ارزیابی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن 22 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 شدند.

### یافته‌ها

نتایج حاصل از طیف  $^1\text{H-NMR}$  نانوذرات PCPH حضور هم‌زمان تمامی اجزای سازنده این نانوذره را به وضوح نشان داد. پیک شدید در محدوده ppm ۳/۶ مربوط به پروتون‌های متیلن در واحد تکراری PEG است (شکل ۱-بالانوش ۵). این در حالی است که پیک مشاهده شده در محدوده ppm ۳/۳ و ppm ۳/۹ به ترتیب مربوط به پروتون‌های حلقه قندی گلوکزآمین و اسید گلوکورونیک موجود در ساختار هیالورونیک اسید است (شکل ۱-بالانوش‌های ۴ و ۷). پیک‌های مشاهده شده در محدوده ppm ۳/۷ الی ۳/۸ به متیل گروه استامید ( $-\text{NHCOCH}_3$ ) موجود در ساختار هیالورونیک‌اسید نسبت داده می‌شود (شکل ۱-بالانوش ۶). همچنین پیک‌های متعدد در محدوده ppm ۴/۶ الی ۴/۸ به گروه هیدروکسیل این لیگاند اشاره دارد (شکل ۱-بالانوش ۹). علاوه بر این، طبق نتایج حاصل از  $^1\text{H-NMR}$  نانوذره PCPH، وجود کیتوسان در این نانوذره تأیید شد؛ به‌طوری‌که پیک‌های مشاهده شده در محدوده ppm ۵/۲ الی ۵/۴ به پروتون‌های حلقه گلوکزآمین ترکیب نسبت داده شد (شکل ۱-بالانوش ۱۰). از سویی دیگر، پیک متیل گروه استامید باقیمانده ( $-\text{NHCOCH}_3$ ) در ساختار کیتوسان در محدوده ppm ۴/۴ مشاهده شد (شکل ۱-بالانوش ۸). همانند گروه هیالورونیک‌اسید، هیدروکسیل‌های موجود در کیتوسان نیز در پیک‌های موجود در محدوده ppm ۵/۵ الی ۵/۶ مشاهده شد که به دلیل قدرت الکترونگاتیوی بالاتر نسبت به سایر ترکیبات موجود در کیتوسان در محدوده‌های بالاتری ظاهر شد (شکل ۱-بالانوش ۱۱). همچنین، مطابق با نتایج حاصل از TGA نانوذرات سنتز شده مشخص شد که PCL و کیتوسان تخریب دو مرحله‌ای داشتند (شکل ۱-B). کاهش وزن اولیه در دمای  $100^\circ\text{C}$  ناشی از حذف رطوبت بود و مرحله اصلی تخریب در محدوده دمایی  $350^\circ\text{C}$  الی  $480^\circ\text{C}$  رخ داد. کوپلیمر PEG-HA و PEI نیز روند چندمرحله‌ای تخریب را نشان

دادند (شکل ۱-B و C). همچنین نانوذره PCPH بیشترین مراحل کاهش وزن را داشت (شکل ۱-C). مقایسه منحنی‌ها نشان داد که اتصال PEG-HA به PCL-Chitosan، مقاومت حرارتی کوپلیمر را در محدوده دمایی  $380^\circ\text{C}$  الی  $420^\circ\text{C}$  کاهش داده که تأییدی بر سنتز موفقیت‌آمیز نانوذره مذکور است.

مطابق با نتایج ارایه شده در جدول ۱، اندازه نانوذرات PCPH فاقد siRNA-FAM برابر با  $201 \pm 7$  نانومتر بود که پس از بارگذاری  $294 \pm 9$  نانومتر افزایش یافت (شکل ۱-D و E). همچنین، پتانسیل زتای این نانوذرات نیز از  $1/72 \pm 0/52$  به  $2/50 \pm 0/50$  میلی‌ولت کاهش یافت (شکل ۱-H و I). برای نانوذرات PEI، بارگذاری siRNA-FAM اندازه نانوذرات را از  $186 \pm 11$  به  $220 \pm 6$  نانومتر افزایش و پتانسیل زتا را از  $4/11 \pm 0/77$  به  $2/09 \pm 0/60$  میلی‌ولت کاهش داد (جدول ۱ و شکل ۱-J و K). این تغییرات، بارگذاری موفق-siRNA FAM را تأیید می‌کند.

الگوی آزادسازی siRNA-FAM از نانوکپسول‌های PCPH/siRNA-FAM و PEI/siRNA-FAM در شرایط خنثی ( $\text{pH}=7/4$ ) و اسیدی ( $\text{pH}=4/8$ ) نشان داد که آزادسازی siRNA-FAM در محیط با  $\text{pH}=7/4$ ، به نوع نانوذره مورد استفاده و مدت زمان آزادسازی وابستگی بالایی دارد؛ به طوری‌که میزان آزادسازی این ترکیب از نانوکپسول‌های PCPH/siRNA-FAM و PEI/siRNA-FAM در ۶۰ دقیقه ابتدایی مشابه با هم افزایش داشت، اما با گذشت زمان و به خصوص پس از ۴۸۰ دقیقه پس از بررسی آزادسازی، میزان آزادسازی siRNA-FAM از نانوکپسول‌های PCPH/siRNA-FAM به‌طور معنی‌داری بیشتر از PEI/siRNA-FAM بود (شکل ۲-A). اما در محیط اسیدی ( $\text{pH}=4/8$ )، آزادسازی siRNA-FAM تنها تحت تأثیر مدت زمان آزمایش بوده و نوع نانوذره تأثیری بر تفاوت آزادسازی محموله نداشت و هر دو نانوذره (PCPH و PEI) آزادسازی یکسانی در طول زمان‌های مختلف از خود نشان دادند (شکل ۲-B).

طبق نتایج به‌دست آمده از میزان غلظت  $\text{IC}_{50}$  ترکیبات سنتز شده، مشخص شد که نانوذرات PCPH و siRNA-FAM بارگذاری شده در آن‌ها به‌طور معنی‌دار و در سطح احتمال ۵ درصد میزان  $\text{IC}_{50}$  بالاتری نسبت به PEI و siRNA-FAM بارگذاری شده در آن‌ها دارد (شکل ۲-C)، که بیانگر تأثیر این نانوذره و siRNA-FAM بارگذاری شده در آن بر روی گسترش و تکثیر رده سلولی MCF-7 است. استفاده از این کوپلیمر در دارورسانی یا ژن‌رسانی هدفمند را با چالش بسیاری روبه‌رو می‌کند. مطابق با نتایج حاصل از مطالعه، چنین استنباط می‌شود که وجود siRNA-FAM در نانوکپسول‌های PCPH برخلاف PEI تأثیر معنی‌داری در سطح ۵ درصد بر میزان  $\text{IC}_{50}$

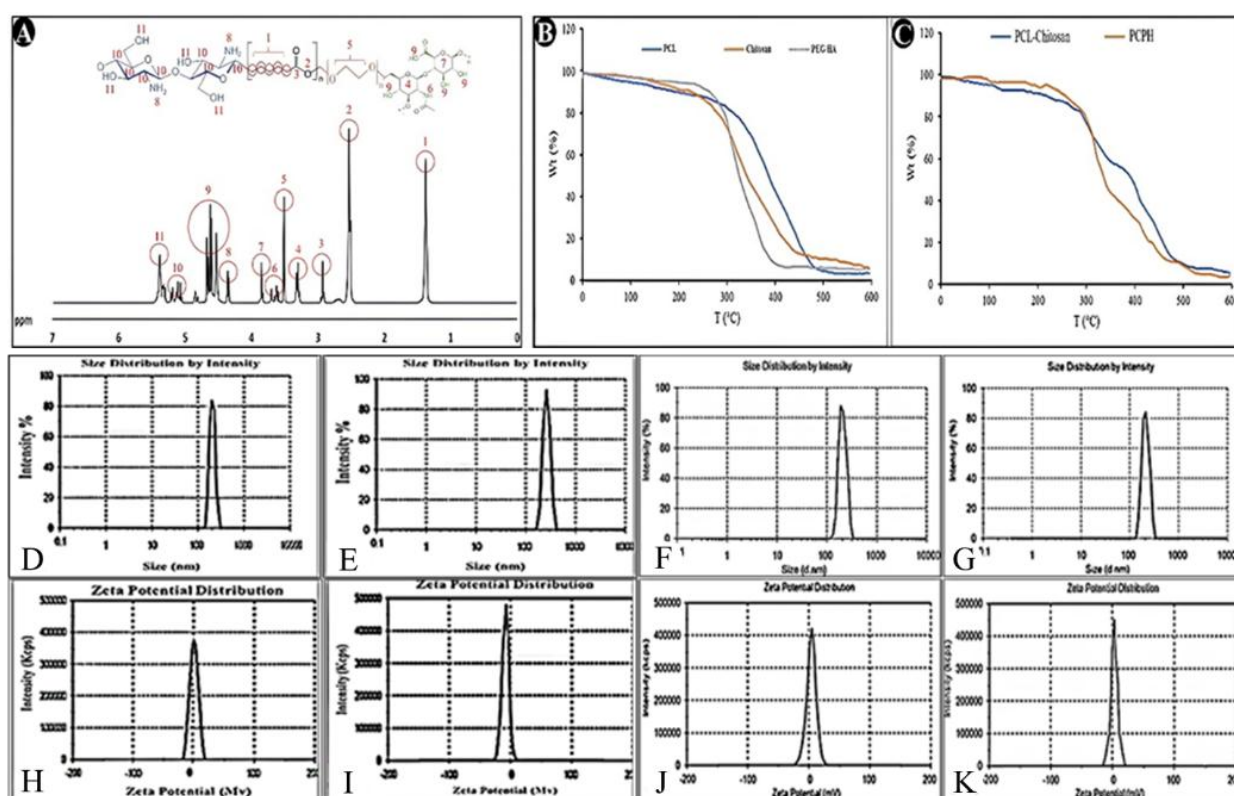
طریق ژل آگارز به دلیل برهم کنش آن با نانوذرات PCPH متوقف شده است (شکل ۳-ا). بر هم کنش های الکترواستاتیک بین گروه های آمین کیتوسان در کوپلیمر PCPH و گروه های فسفات در siRNA ممکن است دلیل خنثی سازی بار منفی siRNA-FAM باشد. قابلیت انتقال siRNA توسط نانوکپسول های PCPH به رده سلول های MCF-7 با استفاده از دستگاه فلو سابتومتری و میکروسکوپ فلورسانسی ارزیابی شد. نتایج حاصل به وضوح آزاد سازی مؤثر و جذب سلولی siRNA توسط این نانوکپسول ها را نشان می دهد (شکل ۳-ب، ج، د، و E).

نمونه ها نداشت. همچنین، مشخص شد که میزان IC<sub>50</sub> نانوذرات PCPH و siRNA-FAM بیشتر از بالاترین غلظت مورد استفاده (۴۰۰ μg.mL<sup>-1</sup>) بود. علاوه بر این، کمترین میزان IC<sub>50</sub> (۸۲/۳۳±۴/۱۲) مربوط به PEI/siRNA-FAM بود.

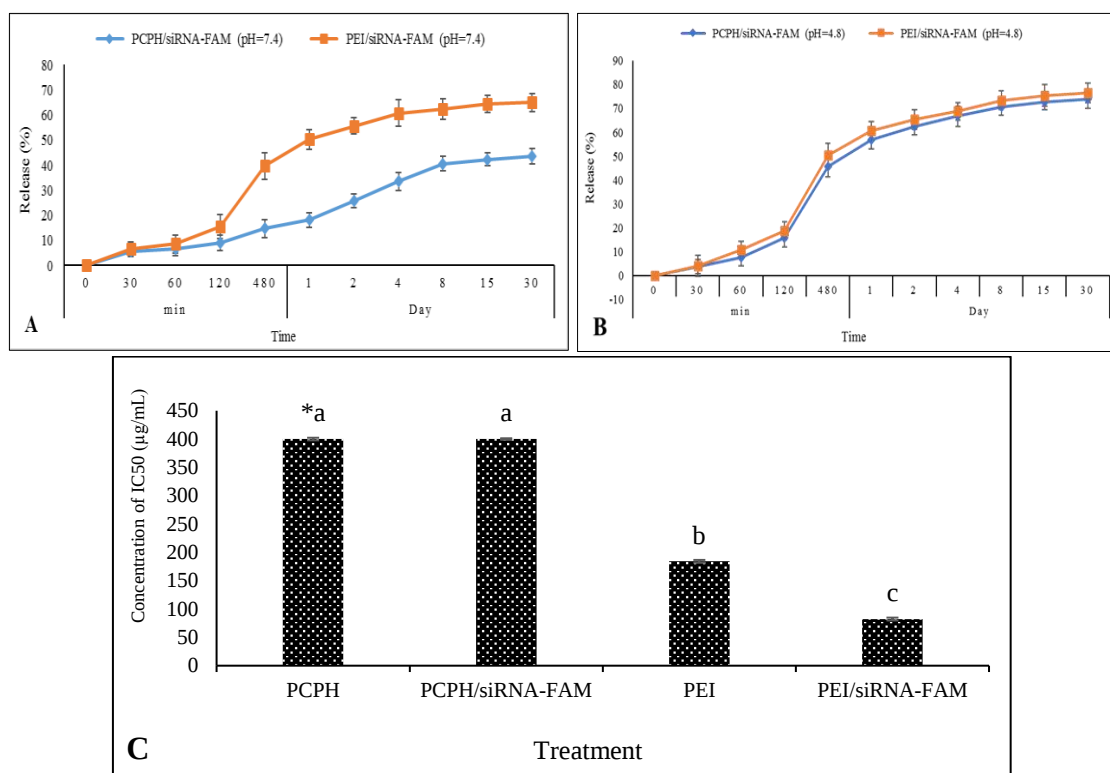
پتانسیل نانوذرات برای خنثی کردن بار منفی siRNA برای انتقال آن به سلول های سرطانی ضروری است. الکتروفورز ژل آگارز برای بررسی اینکه آیا نانوذرات توانایی بر هم کنش و خنثی کردن بار منفی siRNA را دارند یا خیر، انجام شد. در مطالعه حاضر، از کیتوسان موجود در ساختار نانوذره برای بر هم کنش و خنثی کردن بار منفی siRNA-FAM استفاده شد. نتایج نشان داد که حرکت siRNA از

جدول ۱. اندازه، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی ذرات (PDI) نانوذرات PCPH و PEI حاوی siRNA-FAM یا فاقد آن

| نوع نانوکپسول  | اندازه ذرات (nm) | انحراف معیار | پتانسیل زتا (mV) | انحراف معیار | PDI  | انحراف معیار |
|----------------|------------------|--------------|------------------|--------------|------|--------------|
| PCPH           | ۲۰۱              | ±۷           | +۱/۷۲            | ±۰/۵۲        | ۰/۳۹ | ±۰/۰۵        |
| PCPH/siRNA-FAM | ۲۹۴              | ±۹           | -۲/۵۰            | ±۰/۵۰        | ۰/۴۲ | ±۰/۰۹        |
| PEI            | ۱۸۶              | ±۱۱          | +۴/۱۱            | ±۰/۷۷        | ۰/۳۳ | ±۰/۱۰        |
| PEI/siRNA-FAM  | ۲۲۰              | ±۶           | +۲/۰۹            | ±۰/۶۰        | ۰/۴۰ | ±۰/۰۸        |

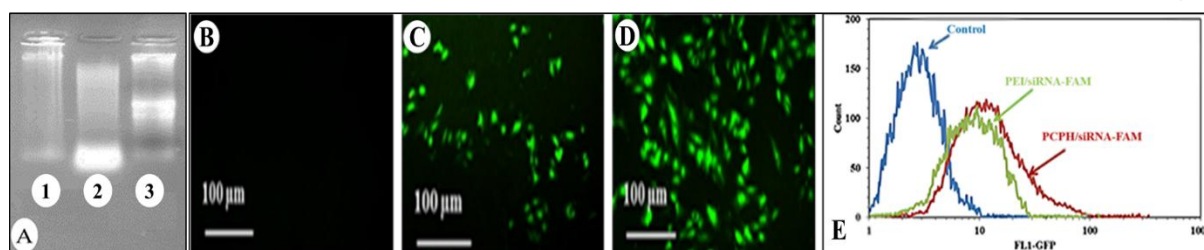


شکل ۱- (A) طیف <sup>1</sup>H-NMR نانوذره PCPH؛ نمودارهای TGA: (B) پلیمرهای PCL، کیتوسان و PEG-HA؛ (B) نانوذره PCPH؛ اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات (نتایج شکل ۳-ا، ب، ج، د، و E، F، G) اندازه نانوذرات PCPH، PCPH/siRNA-FAM، PEI و PEI/siRNA-FAM (به ترتیب: H، I، J و K) پتانسیل زتای نانوذرات PCPH، PCPH/siRNA-FAM، PEI و PEI/siRNA-FAM (به ترتیب: H، I، J و K) پتانسیل زتای نانوذرات PCPH، PCPH/siRNA-FAM، PEI و PEI/siRNA-FAM (به ترتیب: H، I، J و K)



شکل ۲. آزادسازی siRNA-FAM از نانوکپسول‌های PCPH/siRNA-FAM و PEI/siRNA-FAM در بافر PBS با pH=۷/۴ (A) و pH=۴/۸ (B) و مقدار IC<sub>50</sub> نانوذرات PCPH و PEI به تنهایی یا حاوی siRNA-FAM (C)

\* مقایسه گروه‌های مختلف. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارایه شده‌اند. آنالیز آماری با استفاده از آزمون ANOVA یک‌طرفه و آزمون دانکن در سطح معنی‌داری  $P < 0.05$  انجام شده است. حروف متفاوت (a, b, c) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد.



شکل ۳- (A) تأثیر نانوذرات PCPH و PEI بر ختنه‌سازی بار منفی siRNA (۱)؛ PCPH/siRNA-FAM (۲) و siRNA-FAM (۳) و (B، C، D) نتایج میکروسکوپ فلورسانسی به ترتیب سلول‌های MCF-7 تیمار شده با siRNA-FAM (فاقد پوشش)، نانوکپسول‌های PCPH/siRNA-FAM و PEI/siRNA-FAM و (D) نتایج فلوسایتومتری سلول‌های MCF-7 تیمار شده با siRNA-FAM (فاقد پوشش) نانوکپسول‌های PCPH/siRNA-FAM و PEI/siRNA-FAM

## بحث

شدند. این نانوحامل هوشمند با هدف قرار دادن گیرنده‌های هیالورونیک‌اسید نظیر CD<sub>44</sub>، که بر روی رده سلول‌های MCF-7 به وفور بیان می‌شوند، امکان انتقال هدفمند siRNA را فراهم می‌کند. siRNA با هدف قرار دادن ژن‌های خاص درگیر در مقاومت دارویی یا بقای سلول سرطانی، قادر به مهار بیان این ژن‌ها و القای مرگ سلولی است. این رویکرد انتقال ژن نه تنها عوارض جانبی سیستمیک را به حداقل می‌رساند، بلکه از مکانیسم‌های مقاومت چنددارویی نیز عبور می‌کند و امکان درمان هدفمندتر و مؤثرتر

در سال‌های اخیر، استفاده از سامانه‌های نانوحامل برای انتقال کارآمد و هدفمند عوامل درمانی نوین نظیر siRNA به یک راهبرد امیدوارکننده در درمان سرطان تبدیل شده است. اهمیت این فناوری در توانایی آن برای انتقال دقیق عوامل ژنتیکی به سلول‌های سرطانی و تنظیم بیان ژن‌های بیماری‌زاست.<sup>۱۹</sup> در این مطالعه، نانوذرات کوپلیمری سه‌جزئی متشکل از PCL، کیتوسان و PEG که با هیالورونیک‌اسید عامل‌دار شده‌اند، برای انتقال ژن طراحی و سنتز

توجه به رهایش تدریجی دارو، تعداد جلسات تزریق دارو را به حداقل برساند.<sup>۲۶</sup> بررسی‌های انجام شده توسط Mohajeri و همکاران (۲۰۲۵)، نشان داد که قطعات ژنی نظیر DNA و siRNA از نانوذرات مبتنی بر PLA-PEG، در شرایط با pH خنثی، رهایش آهسته و کنترل‌شده‌ای دارند، اما در محیط اسیدی (شبیه به اطراف سلول‌های سرطانی)، با تخریب سریع، موجب رهایش ناگهانی آن‌ها می‌شوند.<sup>۲۷</sup> بنابراین، مطالعه و بررسی دقیق تأثیر pH بر رفتار نانوذرات حامل قطعات ژنی و همچنین، درک مکانیسم‌های مرتبط با آزادسازی محموله می‌تواند به بهینه‌سازی سیستم‌های انتقال ژن و بهبود کارایی درمان‌های ژنتیکی کمک بسیاری کند. در حالی که سلول‌های سالم معمولاً در محدوده pH خنثی ( $pH=7/4$ ) فعالیت می‌کنند، سلول‌های سرطانی معمولاً محیط اسیدی‌تری دارند که می‌تواند به دلیل افزایش تولید اسیدهای متابولیک، کاهش مصرف اکسیژن و فعالیت‌های آنزیمی خاص باشد.<sup>۲۸</sup> طبق یافته‌های مطالعه ما، pH تأثیر بیشتری بر میزان آزادسازی siRNA-FAM، نسبت به نمونه شاهد (PEI) داشت (شکل ۲-A و B). از آنجایی که PCL یک پلیمر پاسخگو به pH است، تجزیه سریع آن در سطوح pH پایین، افزایش آزادسازی قطعات ژنی از نانوذرات مبتنی بر PCL-PEG را افزایش می‌دهد.<sup>۲۹</sup> درمان سرطان می‌تواند از تغییرات pH تومور و بافت سالم برای اطمینان از آزادسازی داروها یا قطعات ژنی در محل تومور استفاده کند.<sup>۳۰</sup> مطابق با یافته‌های این تحقیق، آزادسازی DNA و ستوکسیماب از نانوذرات PLGA در مقادیر ۴/۵ و  $pH=7/4$  بررسی شد و گزارش شد که آزادسازی بهینه دارو و ژن از نانوذرات در  $pH=4/5$  مشاهده شد.<sup>۳۱</sup>  $IC_{50}$  (حداقل غلظتی از یک ترکیب که موجب از بین رفتن حداقل ۵۰ درصد یک جمعیت سلولی می‌شود)، معیاری کمی برای سنجش اثربخشی یک ماده در مهار یک فرآیند زیستی خاص است. این پارامتر نشان می‌دهد که چه غلظتی از یک دارو، ترکیب یا ماده برای مهار ۵۰ درصد از فعالیت هدف (مانند رشد سلول‌های سرطانی) مورد نیاز است.<sup>۳۲</sup> هر مقدار  $IC_{50}$  پایین‌تر، نشان‌دهنده قدرت بازدارندگی بیشتر ماده است. نتایج حاصل از محاسبه  $IC_{50}$  نانوکپسول‌های سنتز شده نشان داد که پایین‌ترین مقدار ( $82/33 \mu g.mL^{-1}$ ) مربوط به PEI/siRNA-FAM بود (شکل ۲-C). همچنین، مطالعه ما نشان داد که نانوذرات PCPH و siRNA-FAM بارگذاری شده در آن بیشترین مقدار  $IC_{50}$  را دارد ( $1 \mu g.mL^{-1}$ ).<sup>۴۰۰</sup> این امر بیانگر سمیت بسیار پایین این نانوذرات است که می‌تواند به‌عنوان یک ناقل ایمن و زیست سازگار عملکرد مطلوبی داشته باشد. این ویژگی برتری سامانه نانویی حاضر را در کاربردهای انتقال ژن با حداقل اثرات سیتوتوکسیک غیراختصاصی به خوبی نشان می‌دهد. توالی‌های ژنی به دلیل اندازه بسیار بزرگتر نسبت به

سرطان را فراهم می‌سازد. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که نانوکپسول مبتنی بر PCL، کیتوسان و PEG از زیست‌سازگاری مناسبی بر رده سلول‌های MCF-7 برخوردار بودند. به‌طوری که هیچ‌گونه سمیت قابل ملاحظه‌ای در این نانوذرات مشاهده نشد (شکل ۲-C). نتایج به دست آمده در این پژوهش با نتایج تحقیقات پیشین هم‌راستا بود.<sup>۳۰</sup> ویژگی‌های مورفولوژیکی، به‌ویژه اندازه نانوذرات، نقش تعیین‌کننده‌ای در کارایی انتقال هدفمند دارو یا ژن به سلول‌های سرطانی دارد.<sup>۳۱</sup> نانوذرات با اندازه بهینه (در محدوده ۵۰ تا ۲۰۰ نانومتر) می‌توانند به‌طور مؤثر از بافت عروقی تومور عبور نموده و در بافت سرطانی تجمع یابند.<sup>۳۲</sup> علاوه‌براین، به دلیل سازگاری نانوذرات در این محدوده اندازه بهینه با اندازه حفره‌های غشای سلول و مکانیسم‌های درونی‌سازی، امکان آندوسیتوز کارآمد توسط سلول‌های سرطانی را فراهم می‌کند. در مقابل، ذرات بزرگ‌تر ممکن است توسط عوامل فاگوسیت هضم و حذف شوند و ذرات کوچک‌تر نیز فاقد تجمع مؤثر در تومور هستند.<sup>۳۳</sup> Zahed و همکاران، با بررسی اندازه نانوکپسول در انتقال هدفمند دارو و siRNA به رده سلول‌های MCF-7، گزارش دادند که نانوکپسول‌های کارآمد با بالاترین درصد انتقال و کمترین اثر منفی در انتقال، نانوکپسول‌هایی هستند که در محدوده ۲۲۰ الی ۲۶۰ نانومتر باشند.<sup>۳۴</sup> بر اساس نتایج حاصل در این پژوهش توسط DLS نیز مشخص شد که اندازه نانوذرات PCPH برابر با نانومتر ۲۰۱ بود که با بارگذاری siRNA-FAM به ۲۹۴ نانومتر افزایش یافت، که این افزایش اندازه، موفقیت در بارگذاری را تأیید می‌کند (جدول ۱). همچنین، طبق نتایج به دست آمده مشخص شد که نانوذرات سنتز شده از پتانسیل زتای مثبتی برخوردارند که این پتانسیل زتای مثبت، ناشی از حضور گروه‌های آنیونی در ساختار این نانوذرات بود (شکل ۱-H). اما پس از بارگذاری siRNA-FAM، پتانسیل زتای نانوذرات به  $-2/0 \pm 50/50$  میلی‌ولت کاهش یافت (شکل ۱-I)، که این امر را می‌توان به گروه‌های فسفات نسبت داد که بار منفی را در سطح این نانوذرات ایجاد کرد. همانطور که به‌خوبی مشخص شده است، بافت‌های سرطانی در مقایسه با بافت‌های نرمال از محیط اسیدی-تری برخوردار هستند، این خصوصیت PCL باعث می‌گردد تا رها سازی دارو یا قطعات ژنی در بافت‌های سرطانی به میزان قابل توجهی افزایش یابد. در حالی که میزان رهش دارو در بافت‌های نرمال در حداقل مقدار خود باشد.<sup>۳۵</sup> از خواص منحصر به فرد کوپلیمرهای آمفی‌پاتیک از قبیل PCL-PEG می‌توان به توانایی این نانوذرات در کنترل رهش دارو اشاره کرد. کنترل رهایش دارو یکی دیگر از مباحث کلیدی در دارورسانی هدفمند است که می‌تواند از عوارض ناشی از دوز بالای دارو جلوگیری نموده و در عین حال با

شد. علاوه بر این، بر اساس یافته‌های این پژوهش، نانوذرات هوشمند PCPH با موفقیت سنتز شدند و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مطلوبی از خود نشان دادند. این سامانه نوین مبتنی بر ساختار نانو توانست siRNA را با کارایی بالا در خود بارگذاری کند. مطالعات مکانیسم مرگ سلولی آشکار ساخت که نانوذرات طراحی شده تأثیر به‌سزایی بر زنده‌مانی سلولی نداشته و تنها به‌عنوان یک ناقل عمل کرد.

### 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 آزمایشات تکمیلی دارند.

### مشارکت پدیدآوران

بخش اصلی ایده‌پردازی و تدوین چهارچوب اصلی طرح، مکاتبات، مشارکت در نگارش پروپوزال، مشارکت در تجزیه و تحلیل داده‌ها و مشارکت در نگارش مقاله توسط هاشم یعقوبی (نویسنده مسئول) انجام شد. همچنین، مهران نوروزپور مشارکت در انجام مطالعات مقدماتی، مشارکت در تهیه پروپوزال و همکاری در انتخاب نمونه‌ها، جمع‌آوری و استخراج داده‌ها و تجزیه و تحلیل بخشی از داده‌ها را بر عهده داشت.

### منابع مالی

این تحقیق هیچ‌گونه حامی مالی نداشته است.

### دسترس‌پذیری داده‌ها

تمام داده‌های مطالعه شده در متن مقاله گنجانده شده است.

### ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با رعایت تمامی اصول امانت داری در استفاده از متون علمی انجام شده است. مطالعه حاضر توسط کارگروه کمیته اخلاق دانشگاه محقق اردبیلی (به شماره شناسه IR.UMA.REC.1402.054) تأیید شد.

### تعارض منافع

نویسندگان این مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافع مالی و غیرمالی در این پژوهش وجود ندارد.

اکثر داروهای شیمی‌درمانی، احتمال آسیب‌دیدگی در حین انتقال بیشتر است. سیستم ایمنی هر چیزی را که به سرعت آنزیم‌های نوکلئاز فلورسین را حذف کند، شناسایی می‌کند زیرا تا حدودی در برابر آنها مقاوم شده است. علاوه بر این، ارزیابی ویژگی‌های نانوذرات، مانند ظرفیت آن‌ها برای آزادسازی siRNA، برای ایجاد یک سیستم انتقال ژن موفق، بسیار مهم است. بار سطحی منفی توالی‌های ژنی توسط برهم‌کنش الکترواستاتیک بین آنها و پلیمر کاتیونی خنثی می‌شود.<sup>۳۳</sup> در نتیجه، توالی ژنی که به‌طور معمول بار منفی دارد و غشای سلولی، دافعه الکترواستاتیکی کمتری را تجربه می‌کنند. علاوه‌براین، برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک باعث می‌شوند که siRNA در یک ساختار کروی پایدار قرار گیرد. این واکنش‌ها نه تنها کارایی انتقال ژن به سلول را افزایش می‌دهند، بلکه siRNA را از آنزیم‌های محدودکننده و سایر عوامل آسیب‌رسان در سیستم گردش خون محافظت می‌کنند.<sup>۳۴</sup> نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که برهم‌کنش بین PCPH و siRNA-FAM، علاوه بر این که این قطعه ژنی را از هضم آنزیمی محافظت می‌کند، کارایی انتقال آن را نسبت به نمونه فاقد پوشش به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد (شکل ۳). بنابراین، با توجه به نتایج مطالعات مشابه، به نظر می‌رسد که فشرده‌سازی و کاهش سطح تماس siRNA-FAM توسط نانوذرات PCPH مانع از اتصال آنزیم‌های محدودکننده می‌شود، که علاوه بر محافظت موفق، انتقال و درج آن به سلول هدف را ممکن می‌کند.

### نتیجه‌گیری

توسعه سامانه‌های نوین دارورسانی مبتنی بر نانوذرات کوپلیمیری PCL-Chitosan-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 ارایه می‌دهد، بلکه با بهره‌گیری از اثر استتاری ناشی از PEG، زمان گردش خون را افزایش داده و از حذف پیش‌ازمعد توسط سیستم ایمنی جلوگیری می‌کند. ویژگی برجسته این سامانه، قابلیت رهایش کنترل‌شده و هوشمند siRNA در پاسخ به محرک‌های خاص ریزمحیط تومور، به‌ویژه اسیدیته بالاتر است که امکان انتقال حداکثری قطعات ژنی و دارو به بافت هدف و به‌دنبال آن، کاهش چشمگیر عوارض جانبی سیستمیک را فراهم می‌آورد. همچنین، در این پژوهش به‌وضوح تأثیر افزودن هیالورونیک‌اسید به‌عنوان لیگاند هدفمند، بر روی دقت و کارایی این نانوذرات در شناسایی و اتصال به سلول‌های سرطانی مشاهده

## References

1. Alsina M, Arrazubi V, Diez M. Current developments in gastric cancer: from molecular profiling to treatment strategy. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2023;20:155-70. doi: 10.1038/s41575-022-00703-w
2. 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):17. doi: 10.1186/s12645-025-00318-1
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. doi: 10.1007/s12668-025-01902-w
4. Mansuryar A, Bourang S, Noruzpour M, Ebrahimi HA, Amani A, Granados-Principal S, et al. The effect of Fe3O4 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. doi: 10.1007/s40199-025-00568-9
5. Idumah CI. Poly ( $\alpha$ -caprolactone)(PCL) biopolymeric bionanoarchitectures for tissue engineering applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 2025;74:733-62. doi: 10.1080/00914037.2024.2372795
6. Raza MA, Sharma MK, Nagori K, Jain P, Ghosh V, Gupta U. Recent trends on polycaprolactone as sustainable polymer-based drug delivery system in the treatment of cancer: Biomedical applications and nanomedicine. *International Journal of Pharmaceutics*. 2024;666:124734. doi: 10.1016/j.ijpharm.2024.124734
7. Khan IN, Navaid S, Waqar W, Hussein D, Ullah N, Khan MU, et al. Chitosan-based polymeric nanoparticles as an efficient gene delivery system to cross blood brain barrier: in vitro and in vivo evaluations. *Pharmaceutics*. 2024;17(2):169. doi: 10.3390/ph17020169
8. Hanafy NA. Chitosan nanoparticles as drug carriers and gene delivery systems: Advances and challenges. *Fundamentals and Biomedical Applications of Chitosan Nanoparticles*. 2025;1:267-308. doi: 10.1016/b978-0-443-14088-4.00015-0
9. Liu B, Sajiki Y, Littlefield N, et al. PBAE-PEG-based lipid nanoparticles for lung cell-specific gene delivery. *Molecular Therapy* 2025;33:1154-65. doi: 10.1016/j.ymthe.2025.01.037
10. Gong Y, Hu X, Chen M and Wang J. Recent progress of iron-based nanomaterials in gene delivery and tumor gene therapy. *Journal of Nanobiotechnology* 2024;22:309. doi: 10.1186/s12951-024-02550-0
11. Bokaty AN, Dubashynskaya NV. Chemical modification of hyaluronic acid as a strategy for the development of advanced drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers* 2024;337:122145. doi: 10.1016/j.carbpol.2024.122145
12. Iaconisi GN, Ahmed A, Lauria G, Gallo N, Fiermonte G, Cowman MK, et al. Targeting mitochondria in Cancer therapy: Machine learning analysis of hyaluronic acid-based drug delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024;283:137840. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.137840
13. Yang Y, Zhu X, Liu X, Chen K, Hu Y, Liu P, et al. Injectable and self-healing sulfated hyaluronic acid/gelatin hydrogel as dual drug delivery system for circumferential tracheal repair. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024;279:134978. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.134978
14. 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. doi: 10.1016/j.ejps.2021.106007
15. Yaghoubi H. Targeted Delivery of Curcumin to Hs-578T Cells Using Multifunctional PLA-PEG-Fe3O4 Nanoparticles Modified with Folic Acid and Glucose. *Cell and Tissue Journal*. 2026;17(1):33-58. Doi: 10.66224/JCT.17.1.33
16. Zhang C, Zhang S, Zhi D, Zhao Y, Cui S, Cui J. Co-delivery of paclitaxel and survivin siRNA with cationic liposome for lung cancer therapy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2020;585:124054. doi: 10.1016/j.colsurfa.2019.124054
17. 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. doi: 10.1007/s00210-025-04381-8
18. 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. doi: 10.1007/s42452-025-07458-4
19. Noruzpour M, Asghari ZR, Zare N. Investigating the anticancer properties of the essential oil and aqueous extract of *Moringa oleifera* and its biosynthesized metal nanoparticles on MCF-7 and BT-549 cell lines. 2024;17:59-83. doi: 10.61186/ijbd.17.1.59
  20. Mundel R, Thakur T, Chatterjee M. Emerging uses of PLA-PEG copolymer in cancer drug delivery. 3 *Biotech*. 2022 Feb;12(2):41. doi: 10.1007/s13205-021-03105-y
  21. Bourang S, Jahanbakhsh Godehkahriz 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. doi: 10.31219/osf.io/yqsk4
  22. Soltani M, Ahmadzadeh N, Nasiraei Haghighi H, *et al.* 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;25:29. doi: 10.1186/s12896-025-00962-w
  23. Xu X, Liu C, Wang Y, Koivisto O, Zhou J, Shu Y, Zhang H. Nanotechnology-based delivery of CRISPR/Cas9 for cancer treatment. *Advanced drug delivery reviews*. 2021;176:113891. doi: 10.1016/j.addr.2021.113891
  24. Zahed Z, Hadi R, Imanzadeh G, Ahmadian Z, Shafiei S, Zadeh AZ, *et al.* Recent advances in fluorescence nanoparticles “quantum dots” as gene delivery system: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024;254:127802. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.127802
  25. Mateti T, Aswath S, Vatti AK, Kamath A, Laha A. A review on allopathic and herbal nanofibrous drug delivery vehicles for cancer treatments. *Biotechnology reports*. 2021;31:e00663. doi: 10.1016/j.btre.2021.e00663
  26. Bairagi RD, Reon RR, Hasan MM, *et al.* Ocular drug delivery systems based on nanotechnology: a comprehensive review for the treatment of eye diseases. *Discover Nano* 2025; 20: 1-43. doi: 10.1186/s11671-025-04234-6
  27. Mohajeri S, Raei M, Bourang S, Noruzpour M, Yaghoubi H. Multifunctional PolySpermine-based Nanocapsules for Targeted Gene Delivery to Gastric Cancer Cells. *BioNanoScience*. 2025;15(4):544. doi: 10.1007/s12668-025-02167-z
  28. Hao G, Xu ZP, Li L. Manipulating extracellular tumour pH: an effective target for cancer therapy. *RSC advances*. 2018;8(39):22182-92. doi: 10.1039/c8ra02095g
  29. Zhao F, Wan X, Liang Y, Liu W, Liu J, Pan Y, *et al.* Prospects, advances, and applications of bioMOF-based platforms. *Topics in Current Chemistry*. 2025;383(3):34. doi: 10.1007/s41061-025-00512-0
  30. Sun H, Li X, Liu Q, Sheng H, Zhu L. pH-responsive self-assembled nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *Journal of Drug Targeting*. 2024;32(6):672-706. doi: 10.1080/1061186x.2024.2349124
  31. 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. doi:10.1016/j.ijpharm.2024.124819
  32. da Silva Feltrin F, Agner T, Sayer C, Lona LM. Curcumin encapsulation in functional PLGA nanoparticles: A promising strategy for cancer therapies. *Advances in colloid and interface science*. 2022;300:102582. doi: 10.1016/j.cis.2021.102582
  33. Jäck N, Nagel S, Hartmann L. Sequence-defined polymers for biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2025;167:101993. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2025.101993