

بهینه‌سازی نانو کامپوزیت‌های مس اکسید-زئولیت/گرافن اکسید برای رهایش کنترل شده دوکسوروبیسین جهت مقابله با سلول‌های سرطان پستان HS-578T

سحر مهاجرى^{۱*} و هاشم یعقوبی^۲

۱ گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، اردبیل، ایران.

۲ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، اردبیل، ایران.

اطلاعات مقاله

چکیده



واژه‌های کلیدی:

رده سلول سرطانی HS-578T،
دوکسوروبیسین، زئولیت،
گرافن اکسید، نانو کامپوزیت

Keywords:

HS-578T breast cancer,
Doxorubicin, Zeolite,
Graphene oxide,
Nanocomposite,

دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۱۰

پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۲۰

نوع مقاله: علمی - پژوهشی

در این پژوهش نانو کامپوزیت‌های زئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید به‌عنوان حامل داروی دوکسوروبیسین (DOX) سنتز و مشخصه‌یابی شدند. برای بررسی ریخت‌شناسی، بلوری و گروه‌های عاملی از روش‌های شناسایی نظیر SEM، TEM، XRD و FTIR استفاده گردید. طبق نتایج حاصل از آنالیز XRD و روش ویلیامسون-هال، اندازه بلورک‌های مس اکسید به‌طور مجزا ۳۰-۱۵ نانومتر و اندازه گرافن اکسید (GO) ۵-۱ نانومتر بود. در نانو کامپوزیت سه جزئی (زئولیت/مس اکسید/گرافن اکسید)، اندازه بلورک‌های مس اکسید (CuO) به‌طور چشمگیری به ۱۵-۳ نانومتر کاهش یافت، که نشان‌دهنده اثر مهارکنندگی قوی بسترهای مرکب بر رشد نانوذرات و ایجاد ساختار مناسب برای رهایش کنترل‌شده دارو است. بارگذاری دارو بر اساس ظرفیت جذب تعیین و الگوی رهایش در شرایط pH=۷/۴ (فیزیولوژیک) و pH=۵/۵ (اسیدی) طی ۷۲ ساعت ارزیابی شد. بر اساس نتایج حاصل نانو کامپوزیت زئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید رهایش کنترل‌شده‌تری از داروی DOX در pH=۷/۴ نشان داد، اما در محیط اسیدی (pH=۵/۵) رهایش انفجاری و افزایش یافته‌ای داشت. بر اساس نتایج حاصل از سمیت سلولی، ترکیبات بدون دارو (زئولیت، نانو کامپوزیت‌ها و گرافن اکسید) سمیت بسیار پایینی بر روی سلول‌های HS-578T داشتند ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$)، اما پس از بارگذاری داروی DOX، سمیت همه نمونه‌ها به‌طور چشمگیری افزایش یافت، به‌طوری‌که نانو کامپوزیت زئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید حاوی DOX با کمترین مقدار ($IC_{50} = 37/12 \mu\text{g/ml}$)، بیشترین سمیت را جهت مهار رشد سلول‌های سرطانی داشتند. آزمون آپتوز نشان داد نانو کامپوزیت دارویی مرگ برنامه‌ریزی‌شده را به‌طور معنی‌دار القا می‌کند. این نتایج کارایی بالای نانو کامپوزیت را در دارورسانی هدفمند و کاهش عوارض جانبی تأیید می‌نماید.

*عهده‌دار مکاتبات

+E-mail: sahar.mohajeri@iaau.ac.ir

رجاع: سحر مهاجرى، هاشم یعقوبی، بهینه‌سازی نانو کامپوزیت‌های مس اکسید-زئولیت/گرافن اکسید برای رهایش کنترل‌شده دوکسوروبیسین جهت مقابله با سلول‌های سرطان پستان HS-578T.

نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۱) ۴۵: ۱۷ تا ۳۸ (۱۴۰۵).

مقدمه

در سال‌های اخیر، سرطان پستان به عنوان شایع‌ترین سرطان در زنان، یکی از چالش‌های عمده سلامت جهانی شناخته شده است [۱، ۲]. روش‌های متداول درمانی مانند شیمی‌درمانی اغلب با عوارض جانبی قابل توجهی همراه هستند [۳]. در این راستا، پیشرفت‌های نانوفناوری با تمرکز بر توسعه سامانه‌های دارورسانی هدفمند و کنترل‌شده، امید به بهبود اثربخشی درمان و کاهش عوارض را افزایش داده‌اند [۴]. یکی از داروهای ضدسرطان پرکاربرد در درمان انواع مختلف سرطان‌ها، به‌ویژه سرطان پستان، دارویی به‌نام دوکسوروبیسین (DOX) است [۵]. دوکسوروبیسین با وارد شدن بین بازهای آلی DNA، مانع فرآیند رونویسی و تکثیر سلولی می‌شود و با مهار آنزیم توپوایزومراز II، شکست‌های DNA را پایدار نموده و آپوپتوز را القا می‌کند [۶]. همچنین این داروی ضدسرطان با تأثیر بر غشای سلولی، نفوذپذیری آن را تغییر می‌دهد. با وجود کارایی بالای دوکسوروبیسین، مصرف آن با محدودیت‌های عمده‌ای نظیر عارضه قلبی-عروقی، ایجاد مقاومت دارویی و اثرات جانبی گسترده همراه است [۹]. نانوکامپوزیت‌ها به‌عنوان بسترهایی نوظهور برای سیستم‌های دارورسانی هدفمند به شمار می‌آیند که با ترکیب خواص منحصر به فرد چند ماده با خواص نانو، قابلیت‌های چشم‌گیری در بهبود راندمان درمانی فراهم می‌کنند [۱۲]. در این میان، استفاده از ترکیبات مبتنی بر اکسیدهای فلزی، زئولیت‌ها و مشتقات کربنی مانند گرافن اکسید، راهکاری چندمنظوره برای ایجاد یک نانو ساختار چندجزئی با خواص فیزیکی و شیمیایی برتر محسوب می‌شود [۱۳]. مس اکسید به‌عنوان یک نانوذره فلزی با خواص ضدباکتری و ضدسرطانی ذاتی، در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است [۱۴]. توانایی مس اکسید در تولید ROSها و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی، آن را به یک گزینه‌ی جذاب برای استفاده در سیستم‌های دارورسانی هدفمند تبدیل کرده است [۱۵]. از سوی دیگر، زئولیت به‌عنوان یک ماده‌ی معدنی با ساختار بلوری متخلخل، به دلیل پایداری شیمیایی بالا، ظرفیت تبادل یونی و توان جذب مولکولی قابلت خوبی در بارگذاری داروها دارد [۱۶]. همچنین ساختار شبکه‌ای و منظم زئولیت، امکان رهایش آهسته و تنظیم‌شده‌ی داروها را فراهم می‌آورد [۱۷]. با توجه به ویژگی‌های ساختاری و عملکردی مس اکسید و زئولیت ترکیب این مواد نانوذره فلزی-معدنی با گرافن اکسید، که دارای سطح ویژه‌ی بالا، گروه‌های عاملی متنوع و قابلیت برهم‌کنش با مولکول‌های دارویی و بیولوژیکی است، می‌توان نانوکامپوزیتی با عملکرد پیشرفته در زمینه‌ی دارورسانی ساخت [۱۸]. گرافن اکسید علاوه بر سازگاری زیستی مطلوب، می‌تواند با اصلاحات سطحی، خواص نوری، الکتریکی و شیمیایی قابل تنظیمی از خود نشان دهد که در فرآیندهای هدف‌گیری سلول‌های سرطانی نقش اساسی ایفا می‌کند [۱۹]. همچنین با در نظر گرفتن این ویژگی‌ها، ترکیب سه‌جزئی مس اکسید، زئولیت

و گرافن اکسید می‌تواند نانوکامپوزیتی چندمنظوره و کارآمد برای رهایش هدفمند دوکسوروبیسین فراهم آورد [۲۰]. چنین نانو ساختاری نه تنها قادر است دارو را با راندمان بالا بارگذاری کند، بلکه به واسطه‌ی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ویژه، می‌تواند رهایش آهسته، تنظیم‌شده و وابسته به شرایط محیطی مانند (pH) که در محیط توموری اسیدی‌تر است) ارائه دهد. این خصوصیت بسیار مهم است، زیرا می‌تواند از رهایش ناخواسته دارو در بافت‌های سالم جلوگیری کرده و بیشترین اثر دارویی را در ناحیه‌ی توموری ایجاد کند [۲۱]. مطالعه حاضر بر آن است تا با طراحی، سنتز و بهینه‌سازی نانوکامپوزیت‌های مس اکسید-زئولیت/گرافن اکسید، گامی مؤثر در توسعه‌ی سامانه‌های دارورسانی هوشمند و هدفمند بردارد. بخش دیگر تحقیق به بررسی اثرات سمی و سمیت سلولی نانوکامپوزیت سنتز شده بر روی رده سلولی HS-578T، که یکی از رده‌های سلولی مهم سرطان پستان سه‌گانه منفی (TNBC) است، می‌پردازد. این نوع سرطان به دلیل فقدان گیرنده‌های هورمونی و HER2، مقاومت بالایی نسبت به بسیاری از درمان‌های رایج دارد [۲۲]. بنابراین توسعه‌ی راهکارهای جدید برای هدف‌گیری مؤثر این نوع سرطان، اهمیت ویژه‌ی دارد. در این مطالعه از آزمون‌های سنجش زیستی مانند MTT جهت ارزیابی بقای سلول‌ها و نیز آنالیزهای ریخت‌شناسی برای تشخیص اثرات آپوپتوتیک استفاده خواهد شد. هدف اصلی این تحقیق، طراحی و بهینه‌سازی یک نانوکامپوزیت سه‌جزئی از مس اکسید، زئولیت و گرافن اکسید به‌عنوان یک سامانه‌ی هوشمند برای رهایش کنترل‌شده و هدفمند داروی دوکسوروبیسین است. فرضیه‌ی پژوهش بر این اصل استوار است که هم‌افزایی بین ویژگی‌های مکمل این نانومواد (ظرفیت جذب بالای زئولیت، خاصیت سیتوتوکسیک ذاتی نانوذرات مس اکسید و سطح گسترده و قابلیت بارگذاری بالای گرافن اکسید) می‌تواند منجر به افزایش کارایی بارگذاری و رهایش دارو، کاهش دز مؤثر مورد نیاز و در نتیجه، کاهش عوارض جانبی شود، و در عین حال اثربخشی درمانی بیشتری را علیه رده‌ی سلولی مقاوم سرطان پستان HS-578T ایجاد نماید.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده

در این پژوهش از ترکیبات مختلفی که توسط شرکت‌های معتبر تهیه شده‌اند استفاده شده است. زئولیت کلینوپتیلولیت توسط شرکت آذر کیمیا خاتم تأمین شده و به‌عنوان پایه معدنی در ساخت نانوکامپوزیت استفاده شد. گرافن اکسید از شرکت فناوران افشار شیمی تهیه شد. سولفات مس (II)، پتاسیم کلراید (KCl)، دی‌متیل سولفو کسید (DMSO)، MTT، گلوکز، سدیم تترابورات ۱۰ آبه ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)، اتانول، اسید کلریدریک (HCL)، کلرید سدیم (NaCl)، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)، کلروفورم و هیدروکسید سدیم (NaOH)

جدول ۱ - دستگاه‌ها و تجهیزات مورد استفاده

ردیف	نام دستگاه	نام تجاری و مدل دستگاه	کشور سازنده
۱	ترازوی دیجیتالی	A&D Weighing GR-200 lab balance	ژاپن
۲	سانتریفوژ	Hettich zentrifugen D-78532 Tuttlingen	آلمان
۳	اولتراسانتریفوژ	Hanil combi 514R	کره
۴	شیکر	Heidolph Unimax 1010 DT	آلمان
۵	هیتر	IKA RCT basic	آلمان
۶	فراصوت	Ultrasonic Cleaner Parsonic 7500s	ایران
۷	pH سنج	Jenway 3520	بریتانیا
۸	آون	Memmert UNB 400	آلمان
۹	اسپکتروفوتومتری UV-VIS	Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS spec	آمریکا

خشک شد [۲۳]. برای بررسی میزان تخلخل و سطوح کلینوپتیلولیت خام و اصلاح شده (ژئولیت) به ترتیب از میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (JEM-2100) استفاده شد. هم‌چنین جهت شناسایی فازهای بلوری موجود در ژئولیت کلینوپتیلولیت تهیه شده از دستگاه XRD (Bruker D8 DISCOVER, Germany) استفاده شد. شدت و موقعیت پیک‌های XRD اطلاعاتی درباره درجه بلورینگی و تغییرات ساختاری پس از ترکیب مواد ارائه می‌دهد. تغییر در پیک‌ها می‌تواند نشان‌دهنده ایجاد برهم‌کنش بین اجزا یا تشکیل فاز جدید باشد [۲۷].

سنتر نانوکامپوزیت ژئولیت-مس‌اکسید

ابتدا یک گرم از ژئولیت کلینوپتیلولیت اصلاح شده به همراه یک گرم پارچه پنبه‌ای (به عنوان ماتریکس تثبیت‌کننده ذرات)، ۵ mL محلول گلوکز ۵ درصد w/v (به عنوان عامل کاهنده) و ۵ mL محلول سولفات مس (II) ۵ (با $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ۳ درصد در ۱۴۰ mL محلول سود ۰/۲ mol/L (با pH=۹) حل شد. حجم نهایی محلول واکنش به کمک آب دیونیزه شده به ۱۵۰ mL رسانده شد. سپس مخلوط واکنش بر روی هیتر مغناطیسی در دمای 80°C به مدت یک ساعت تحت هم‌زدن مداوم (با استفاده از همزن مغناطیسی) قرار گرفت تا تشکیل نانوکامپوزیت ژئولیت-مس‌اکسید تسهیل گردد. پس از اتمام واکنش، محلول حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن فیلتر شد و رسوب به دست آمده دو بار با آب دیونیزه شست‌وشو داده شد تا ناخالصی‌های یونی حذف شوند. در نهایت، نمونه در آون در دمای 60°C به مدت ۱۲ ساعت خشک گردید [۲۴].

تهیه گرافن‌اکسید

برای اصلاح گرافن‌اکسید به روش هامر، ابتدا یک گرم گرافیت پودری ($83/3 \text{ mM}$) با ۰/۵ گرم نیترات سدیم ($5/9 \text{ mM}$) و ۲۳ mL اسیدسولفوریک غلیظ (۹۸ درصد) در حمام یخ با دمای 5°C مخلوط شد. سپس ۳ گرم پرمنگنات پتاسیم (19 mM) به آرامی و طی ۳۰ دقیقه به مخلوط اضافه شد تا از افزایش ناگهانی دما جلوگیری شود. پس از انتقال مخلوط به حمام آب با دمای 35°C به مدت ۲ ساعت هم‌زدن ادامه یافت. در مرحله بعد، ۴۶ mL آب دیونیزه به آرامی اضافه و دمای واکنش به 98°C افزایش یافت و به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شد. برای خاتمه واکنش، مخلوط با ۱۴۰ mL آب دیونیزه رقیق و ۱۰ mL پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد اضافه شد تا رنگ مخلوط از قهوه‌ای به زرد طلایی تغییر یافت. محصول نهایی با شستشوی متوالی توسط محلول HCl ۱۰ درصد و آب دیونیزه تا رسیدن به pH خنثی خالص‌سازی شد. در نهایت گرافن‌اکسید اصلاح شده توسط دستگاه امواج فراصوت مرطوب به مدت یک ساعت سونیکه شد و سپس گرافن‌اکسید حاصل تحت دمای پایین و خلاء و توسط دستگاه انجماد خشک (LMC-2, Rubarth, Germany)، خشک شد [۲۵].

از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. پارافرمالدهید از آزمایشگاه شیمی دکتر موجال (ایران) تهیه شد. سرم جنین گاوی (FBS)، محیط کشت DMEM و تریسین-EDTA از شرکت Biowest (ایالات متحده آمریکا) خریداری شدند. داروی ضدسرطان دوکسوروبیسین مورد استفاده در این تحقیق از شرکت EBEWE Pharma تأمین شد. در نهایت برای شبیه‌سازی محیط بدن و بررسی رهایش دارو، از محلول شبیه‌سازی مایعات بدن (SBF) تولید شرکت پردیس پژوهش فناوریان یزد استفاده شده است.

تجهیزات مورد استفاده

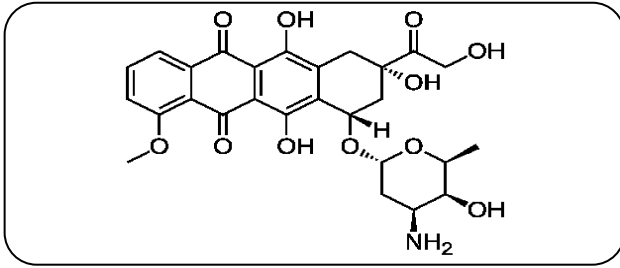
در این پژوهش از دستگاه‌های آزمایشی متنوعی استفاده شد که در جدول ۱ به آن‌ها اشاره شده است.

روش انجام کار

سنتر نانوکامپوزیت‌ها

اصلاح کلینوپتیلولیت جهت تولید ژئولیت

ابتدا یک گرم کلینوپتیلولیت ($1/2 \text{ mM}$)، با فرض جرم مولی (900 g/mol) در ۳۲ mL محلول سود 2 mol/L حل شد و به مدت ۷۰ دقیقه در دمای 70°C تحت هم‌زدن مداوم با سرعت 300 rpm قرار گرفت. برای اطمینان از یکنواختی محیط واکنش، از همزن مغناطیسی استفاده شد. پس از اتمام فرآیند، محلول حاصل از صافی عبور داده شد تا ژئولیت از محلول قلیایی جدا گردد. در مرحله بعد، پودر ژئولیت اصلاح‌شده سه بار با آب مقطر شست‌وشو داده شد و جهت جداسازی کامل ناخالصی‌ها، با سرعت 2000 rpm و برای مدت زمان ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس نمونه در آون در دمای 90°C به مدت یک ساعت



شکل ۱ - ساختار شیمیایی داروی دوکسوروبیسین

بررسی الگوی رهائش داروی دوکسوروبیسین از نانوحامل‌ها در شرایط درون آزمایشگاهی

میزان رهائش داروی DOX از نانوحامل‌های سنتز شده، در سه محیط مختلف آب مقطر، بافر PBS با pH=۷/۴ و بافر PBS با pH=۵/۵ اندازه‌گیری شد. به این صورت که هر نانوحامل بطور جداگانه در ۴۰ mL از هر محیط حل شد و به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر با ۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. در طی مدت ۷۲ ساعت (در بازه زمانی ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ ساعت پس از انتقال) از محلول رویی هر محیط حاوی نانوحامل، ۵ mL نمونه برداشته و در ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. سپس میزان جذب نوری هر نمونه در طول موج ۴۹۰ nm با دستگاه اسپکتروفتومتر (Bio-Rad SmartSpec™ Plus, USA) اندازه‌گیری و ثبت شد. داده‌های حاصل از این آزمایش به کمک مدل سینتیکی Korsmeyer-Peppas مورد تحلیل قرار گرفتند، تا مکانیسم آزادسازی دارو مشخص شود [۲۹].

منحنی‌های کالیبراسیون DOX به‌طور جداگانه در بافر PBS با pH=۷/۴ و بافر PBS با pH=۵/۵ رسم شدند. رقت‌های استاندارد با غلظت‌های دقیق ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ $\mu\text{g/mL}$ از یک محلول استوک و از طریق رقت‌سازی متوالی در بافر مربوطه تهیه شد و از نمونه بلانک (صفر $\mu\text{g/mL}$) برای تصحیح خط پایه استفاده گردید. جذب هر استاندارد در طول موج ۴۹۰ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis اندازه‌گیری شد. آنالیز رگرسیون خطی جذب بر حسب غلظت انجام شد و معادلات کالیبراسیون به دست آمد (شکل ۲). ضریب تعیین (R^2) برای هر دو محیط بیش‌تر از ۰/۹۹۹ بود که خطی بودن و قابلیت اطمینان روش کمی را در گستره غلظتی مورد مطالعه تأیید می‌کند.

بررسی سمیت نانوحامل‌های حاوی داروی DOX

کشت سلولی

رده‌های سلول سرطان سینه انسان HS-578T از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (NBRC) - جهاد دانشگاهی تهیه و در محیط کشت اصلاح‌شده (DMEM; Sigma-Aldrich, USA) Dulbecco's Modified Eagle's Medium حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو کشت داده شد. سلول‌ها در دمای 37°C در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد CO_2 و ۲۱ درصد O_2 نگهداری شدند [۳۰].

سنتز نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید

برای این منظور ابتدا ۰/۵ گرم نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید به همراه ۰/۰۵ گرم گرافن اکسید، در ۳۰ mL آب دیونیزه مخلوط شد. سپس به مدت یک ساعت تحت امواج فراصوت قرار گرفت. سپس ۱ mg سدیم‌تتراهیدروبورات (III) ($26/4 \mu\text{mol}$) به سوسپانسیون اضافه شد و به مدت ۸ ساعت در دمای 80°C انکوبه شد. در نهایت و پس از سانتریفیوژ (5000 rpm و برای مدت زمان ۲ دقیقه) پودر حاصل جمع‌آوری شد و پس از شستشو با آب مقطر، در دمای 60°C خشک گردید [۲۶].

برای بررسی ویژگی‌های ساختاری و فیزیکوشیمیایی زئولیت، نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید، گرافن اکسید و نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید سنتز شده، از مجموعه‌ای از روش‌های پیشرفته مشخصه‌یابی استفاده شد. برای بررسی ساختار لایه‌ای و سطح ریخت‌شناسی و همچنین توزیع یکنواخت نانورقه‌ها، ساختارهای چندلایه و اندازه‌های نانومتری گرافن اکسید به ترتیب از تصاویر SEM (Zeiss Sigma 300, Germany) و TEM (Philips EM208S, Netherlands) استفاده شد. برای شناسایی گروه‌های عاملی و ویژگی‌های ساختاری، ریخت‌شناسی و شیمیایی گرافن اکسید نیز به ترتیب از FTIR (FTIR-ABB Bomem-MB, Canada) و XRD استفاده شد.

بارگذاری دارو در نانوحامل‌ها

جهت بارگذاری داروی دوکسوروبیسین (DOX) در نانوحامل‌های زئولیت اصلاح شده، گرافن اکسید، نانوکامپوزیت‌های زئولیت-مس اکسید و زئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید ابتدا ۱۰۰ mg از هر کدام از این نانوحامل‌ها با $50 \mu\text{g/mL}$ از داروی DOX ($0/092 \text{ mM}$) مخلوط و بر روی شیکر با دور 50 rpm و در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت هم زده شد. سپس هر کدام از نمونه‌ها به‌طور مجزا سانتریفیوژ (1500 rpm و به مدت ۵ دقیقه) شده و فیلتر شدند [۲۸].

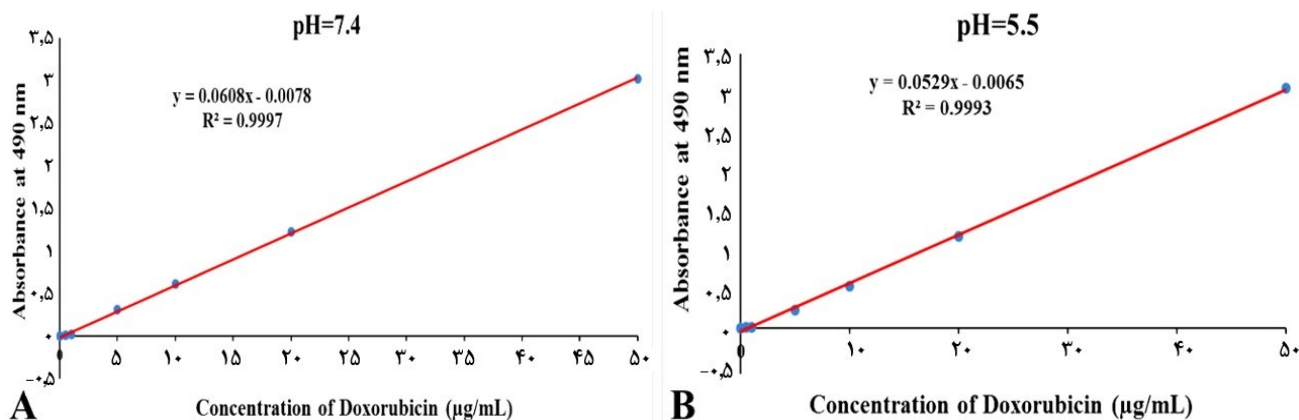
محاسبه درصد بارگذاری دوکسوروبیسین

برای این منظور راندمان کپسوله‌سازی DOX (شکل ۱)، در نانوحامل‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Bio-Rad SmartSpec™ Plus, USA) تعیین شد. پس از آماده‌سازی نانوحامل‌های حاوی DOX، سوسپانسیون سانتریفیوژ شده و جذب محلول رویی حاصل در طول موج ۴۹۰ nm (طول موج جذب DOX) اندازه‌گیری شد تا داروی کپسوله نشده تعیین شود [۲۹]. درصد بارگذاری با مقایسه غلظت داروی آزاد در محلول رویی با مقدار اولیه استفاده شده در فرآیند بارگذاری (50 ppm) با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

= درصد بارگذاری

$$\text{مقدار } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right) \text{ DOX مورد استفاده برای تهیه نانوذرات} - \text{مقدار } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right) \text{ DOX در مایع رویی} \times 100$$

$$\text{مقدار } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right) \text{ DOX مورد استفاده برای تهیه نانوذرات}$$



شکل ۲ - منحنی‌های کالیبراسیون دوکسوروبیسین در (A) بافر فسفات با pH=۷/۴ و (B) بافر فسفات با pH=۵/۵. معادله خط و ضریب تعیین مربوط به هر محیط در نمودار نمایش داده شده است.

و دوکسوروبیسین آزاد (به عنوان تیمار کنترل) از طریق آنالیز فلوسایتومتری با استفاده از کیت Annexin V-Dy634 (کیت تشخیص آپتوتوز Annexin V با PI، شرکت Immunostep) مطابق با دستورالعمل‌های سازنده بررسی شد. داده‌ها از طریق یک فلوسایتومتر (BD Bioscience، FACS Verse) و نرم‌افزار FlowJ (نسخه ۱۰؛ FlowJo LLC) جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل شدند [۳۲].

تحلیل آماری

تمامی فاکتورهای کمی مورد بررسی در این تحقیق با حداقل ۳ تکرار انجام گرفت. تجزیه تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS22 و از طریق تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) انجام گرفت. از آزمون چندمرحله‌ای دانکن در سطح ۵ درصد به منظور بررسی مقایسه میانگین استفاده گردید و سپس میانگین هر یک از تیمارها به همراه استاندارد دیویشن (Mean ± SE) بیان شد.

نتایج

اصلاح کلینوپتیلولیت و تولید ژئولیت SEM

نتایج آنالیز میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM) نشان داد که اصلاح ساختاری کلینوپتیلولیت خام (شکل ۳-۳A) منجر به ایجاد تغییرات قابل توجهی در ویژگی‌های سطحی ترکیب نهایی (ژئولیت) شده است. مقایسه تصاویر مربوط به نمونه خام و اصلاح‌شده (ژئولیت) حاکی از افزایش نسبی تخلخل در ساختار کلینوپتیلولیت اصلاح‌شده (شکل ۳-۳B) بود. همچنین بررسی‌های خاص از نتایج میکروسکوپ SEM مشخص کرد که فرآیند اصلاح موجب تغییر محسوس در بافت سطحی ماده گردیده است، به طوری که سطوح صاف و یکنواخت کلینوپتیلولیت خام (شکل ۳-۳C) به ساختاری متخلخل و ناهموار در نمونه اصلاح‌شده (ژئولیت) (شکل ۳-۳D) تبدیل شده است. این تغییرات ریخت‌شناسی نشان‌دهنده موفقیت آمیز بودن فرآیند اصلاح و ایجاد ساختار مطلوب در ژئولیت تولیدی می‌باشد.

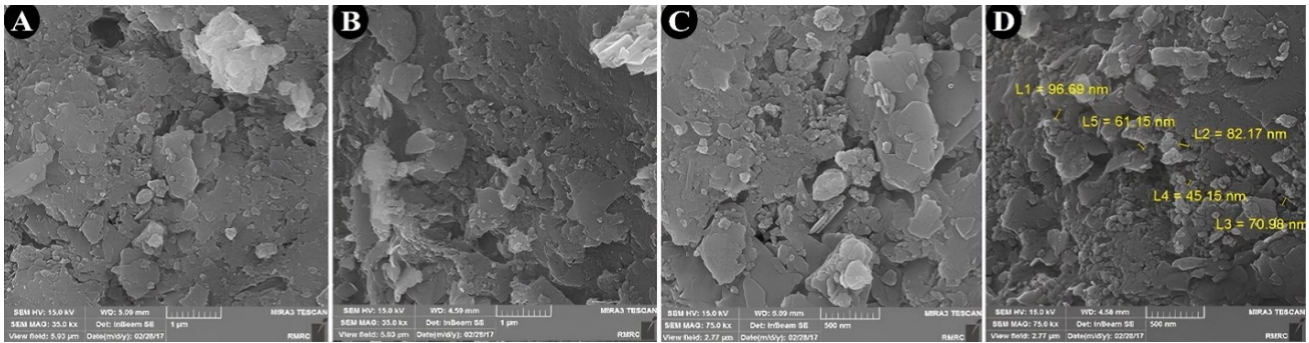
تست MTT (محاسبه IC₅₀)

سمیت سلولی و میزان IC₅₀ (غلظتی که موجب نابودی حداقل ۵۰ درصد جمعیت سلولی می‌شود) با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. زیست‌پذیری سلول‌های HS-578T با انتقال ۷۰۰۰ سلول به هر چاهک از یک پلیت ۹۶ چاهکی برای ارزیابی تأثیر نانوحامل‌های ژئولیت اصلاح شده، گرافن اکسید، نانوکامپوزیت‌های ژئولیت-مس‌اکسید و ژئولیت-مس‌اکسید/گرافن اکسید حاوی DOX و بدون آن (به عنوان شاهد مثبت) و DOX آزاد (به عنوان شاهد منفی) ارزیابی شد. پس از انتقال سلول‌ها، پلیت ۹۶ چاهکی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد CO₂ انکوبه شد تا سلول‌ها به فاز رشد اولیه برسند. سپس، مایع رویی دور ریخته شد و محیط‌های کشت تازه با غلظت‌های مختلف نانوحامل‌های دارای DOX و نانوحامل‌های فاقد DOX (۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ μg/mL) و DOX آزاد (۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ μL/mL) تیمار شدند. سپس محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C با ۵ درصد CO₂ نگهداری شد. زنده ماندن سلول‌ها در طول موج ۵۷۰ nm از طریق سنجش MTT (BioTek Instruments; Winooski, VT, USA) اندازه‌گیری شد [۳۱]. سپس درصد بقای سلول‌ها از طریق فرمول زیر تعیین شد:

$$\text{جذب نوری هر یک از سلول های تیمار شده} \times 100 = \frac{\text{جذب نوری سلول های شاهد}}{\text{درصد زنده مانی سلول ها}}$$

تحلیل آپتوتوز سلولی

حرکت فسفاتیدیل‌سرین از غشای پلاسمایی داخلی به غشای پلاسمایی خارجی یکی از نشانگرهای زیستی فرآیند آپتوتوز است. رنگ‌آمیزی فلورسانس که شامل اتصال به آنکسین است، می‌تواند وجود فسفاتیدیل‌سرین را روی سطح سلول شناسایی کند. پاسخ آپتوتوزی رده‌های سلولی HS-578T به غلظت‌های به دست آمده از آزمایش IC₅₀ ترکیباتی نظیر ژئولیت/DOX، نانوکامپوزیت ژئولیت-مس‌اکسید/DOX، گرافن اکسید/DOX، نانوکامپوزیت ژئولیت-مس‌اکسید-گرافن اکسید/DOX



شکل ۳ - تصاویر مربوط به A و B) میکروسکوپ FESEM کلینوپتیلولیت خام و اصلاح شده (زنولیت) (به ترتیب)؛
C و D) میکروسکوپ SEM کلینوپتیلولیت خام و اصلاح شده (زنولیت) (به ترتیب).

تأیید سنتز نانوکامپوزیت زنولیت-مس اکسید

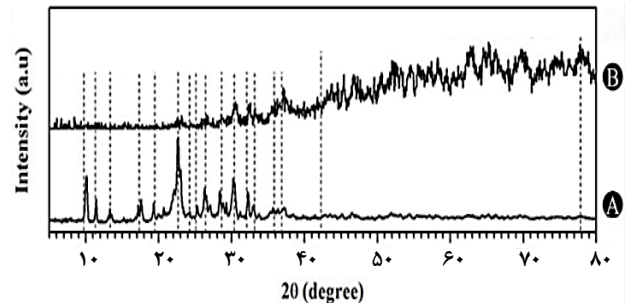
SEM

طبق نتایج به دست آمده از تصاویر SEM زنولیت، مس اکسید و نانوکامپوزیت زنولیت-مس اکسید (شکل ۵-A، B و C)، مس اکسید به صورت ذرات کروی و تقریباً توده‌ای شکل با اندازه متوسط ۷۹ نانومتر می‌باشد (شکل ۵-B). این درحالیست که پس از تشکیل اضافه شدن زنولیت به مس اکسید و تشکیل نانوکامپوزیت‌های زنولیت-مس اکسید شاهد افزایش اندازه نانوذرات هستیم، در حالی که تخلخل لازم جهت بارگیری دارو را حفظ کردند.

XRD

جهت شناسایی تغییرات ساختار بلوری نمونه‌های موجود از XRD استفاده شد. طبق نتایج به دست آمده از الگوی XRD مس اکسید مشخص شد که دو پیک مشخصه مطابق با صفحات بلوری (۱۱۱) و (۱۱۱) به ترتیب در زوایای $2\theta = 35^\circ$ و $2\theta = 38^\circ$ درجه می‌باشد که بیانگر فاز بلوری مس اکسید است (شکل ۶). در پایگاه داده JCPDS (شماره ۰۱-۰۸۰-۱۹۱۷) نیز این پیک‌ها برای مس اکسید گزارش شده‌اند. در الگوی XRD (شکل ۷)، نمونه A، پیک‌هایی با شدت نسبتاً پایین مشاهده می‌شود که مربوط به ساختار بلوری زنولیت هستند و نشان‌دهنده تخلخل‌های متعدد در این ترکیب است. در مقابل، نمونه B که مربوط به نانوکامپوزیت زنولیت-مس اکسید است، دارای پیک‌های تیزتر و با شدت بالاتر است. این افزایش شدت و ظهور پیک‌های جدید در نواحی حدود $32/5^\circ$ ، $35/5^\circ$ و $38/7^\circ$ درجه، نشان‌دهنده حضور موفق فاز CuO در ساختار زنولیت است. ورود CuO باعث بهبود بلورینگی کلی نمونه و افزایش نظم ساختاری آن شده است. بنابراین، نتایج الگوی XRD تأیید می‌کنند که نانوکامپوزیت به‌درستی سنتز شده و CuO به ساختار زنولیت اضافه شده است. همچنین پیک‌های زنولیت حفظ شده‌اند که نشان‌دهنده پایداری چارچوب زنولیتی در فرآیند ترکیب است.

بر اساس تحلیل‌های نتایج حاصل از الگوی XRD (شکل ۶ و ۷) و با به کارگیری روش ویلیامسون-هال، اندازه بلورک و تنش شبکه‌ای مرتبط با فاز مس اکسید در نمونه‌های مختلف تعیین گردید.

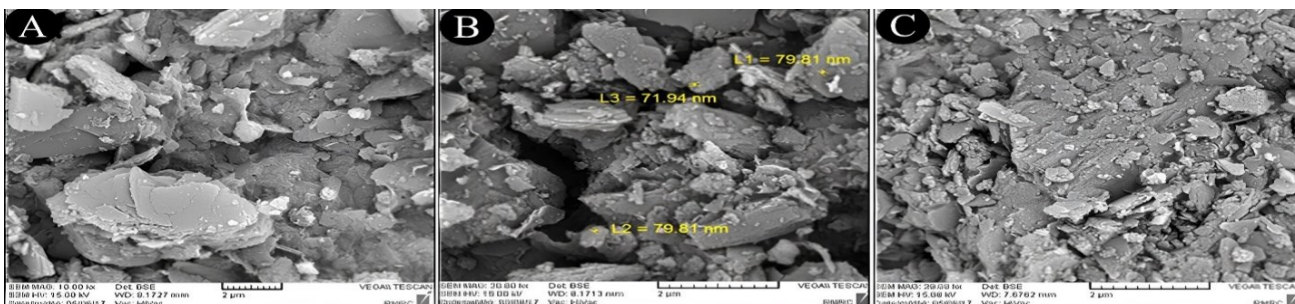


شکل ۴ - نتایج حاصل از الگوی XRD؛
A) پیک‌های مربوط به کلینوپتیلولیت خام و B) پیک‌های مربوط به زنولیت

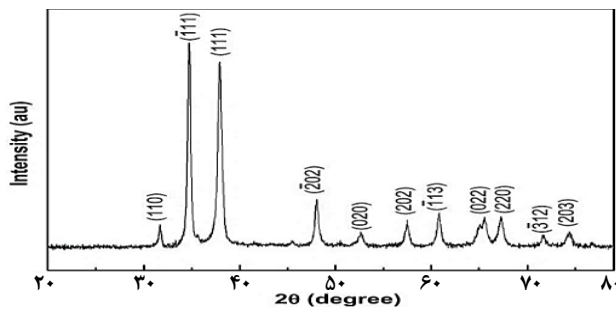
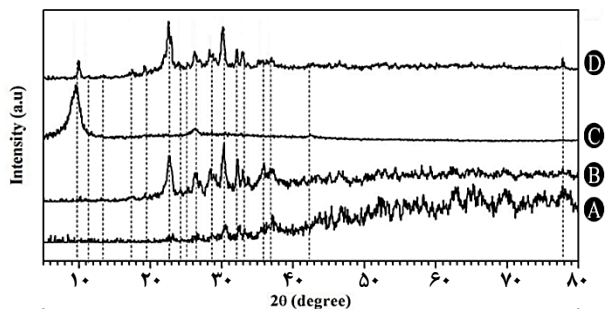
XRD

همچنین طبق نتایج به دست آمده از الگوی XRD کلینوپتیلولیت خام و اصلاح شده (زنولیت)، مشخص شد که کلینوپتیلولیت خام ساختار پلی کریستاله دارد که پیک‌های مشخصه آن در زوایای 5° تا 40° درجه (الی $5^\circ = 2\theta$) به خوبی مشاهده می‌شوند. پیک بارز این ساختار در زوایای $2\theta = 22^\circ$ ، $2\theta = 10^\circ$ و $2\theta = 3^\circ$ می‌باشد که با طیف استاندارد کلینوپتیلولیت به خوبی مطابقت دارد (شکل ۴-A). همچنین طبق نتایج مشخص شد که کلینوپتیلولیت اصلاح شده (زنولیت) مشخص شد که این ترکیب یک ساختار بلوری داشته و از پیک‌های بلوری بسیار زیادی تشکیل شده است که مطابقت بسیاری با نمونه استاندارد زنولیت نشان می‌دهد. پیک‌های حاصل از الگوی XRD زنولیت در زوایای پنج تا 35° درجه (الی $5^\circ = 2\theta$) قابل مشاهده است (شکل ۴-B).

بر اساس تحلیل الگوی XRD و با به کارگیری روش ویلیامسون-هال، اندازه‌های بلورک و تنش شبکه‌ای نمونه‌های زنولیت به تفکیک تعیین گردید. برای کلینوپتیلولیت خام، میانگین اندازه بلورک‌ها در محدوده 60 تا 90 نانومتر و تنش شبکه‌ای در محدوده $5/0000$ تا $10/0000$ میکرومتر برآورد شد. در مقابل، برای زنولیت حاصل نیز میانگین اندازه بلورک‌ها به محدوده کوچک‌تر 25 تا 50 نانومتر کاهش یافت و تنش شبکه‌ای به میزان قابل توجهی افزایش یافته و در محدوده $1/0000$ تا $3/0000$ میکرومتر محاسبه شد.



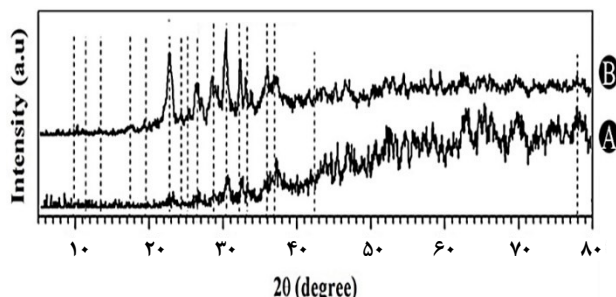
شکل ۵ - تصاویر SEM، (A) ژئولیت، (B) مس‌اکسید و (C) نانوکامپوزیت‌های ژئولیت-مس‌اکسید



شکل ۹ - نتایج حاصل از الگوی XRD: (A) پیک‌های مربوط به ژئولیت، (B) پیک‌های مربوط به نانوکامپوزیت‌های ژئولیت-مس‌اکسید، (C) پیک‌های مربوط به گرافن اکسید و (D) پیک‌های مربوط به نانوکامپوزیت‌های ژئولیت-مس‌اکسید/گرافن اکسید

شکل ۶ - نتایج حاصل از الگوی XRD: مس‌اکسید

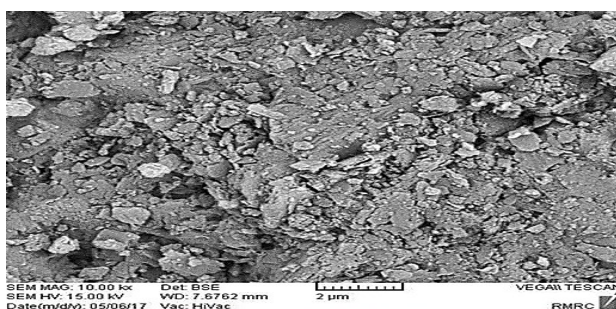
کاهش یافت و تنش شبکه‌ای به طور معناداری افزایش یافت (در محدوده ۰۰۰/۳ تا ۰۰۰/۶ میکرومتر). کاهش اندازه و افزایش همزمان تنش در نانوکامپوزیت، به وضوح مؤید نقش بستر ژئولیت در مهار رشد بلورک‌ها، جلوگیری از تجمع و ایجاد تنش در سطح مشترک قوی بین نانوذرات مس‌اکسید و شبکه متخلخل ژئولیت می‌باشد.



شکل ۷ - نتایج حاصل از الگوی XRD: (A) پیک‌های مربوط به ژئولیت و (B) پیک‌های مربوط به نانوکامپوزیت‌های ژئولیت-مس‌اکسید

تأیید سنتز نانوکامپوزیت ژئولیت-مس‌اکسید/گرافن اکسید SEM

تصویر SEM نانوکامپوزیت ژئولیت-مس‌اکسید/گرافن اکسید ساختاری ناهمگن و متشکل از ذراتی با اندازه و شکل نامنظم را نشان می‌دهد (شکل ۸). ذرات بزرگ‌تر به احتمال زیاد مربوط به ژئولیت هستند که به صورت توده‌های زاویه‌دار با سطحی زیر دیده می‌شوند. نانوذرات ریزتر که به صورت پراکنده یا خوشه‌ای روی این سطح قرار دارند متعلق به مس‌اکسید است. منافذ بین ذرات نشان‌دهنده تخلخل مناسب ژئولیت است که جهت بارگذاری دارو بسیار اهمیت دارد. به طور کلی ترکیب نانوساختاری مناسبی برای خواص سطحی بالا و فعالیت شیمیایی مطلوبی دارد.

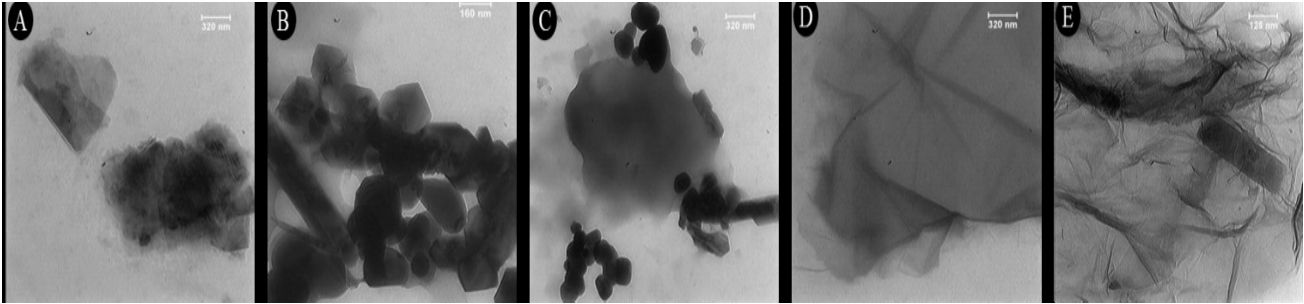


شکل ۸ - تصویر SEM نانوکامپوزیت‌های ژئولیت-مس‌اکسید/گرافن اکسید

XRD

طبق نتایج به دست آمده از الگوی XRD گرافن اکسید مشخص شد که این ترکیب دو پیک مشخص دارد، یکی از پیک‌ها با صفحات بلوری (۰۰۱) در زاویه تقریباً ۱۰ درجه ($2\theta=10$) و پیک دیگر در زاویه ۴۳ درجه ($2\theta=43$) مطابق با صفحه بلوری (۱۰۱) (شکل ۹-C). همچنین بر اساس پیک‌های حاصل از آزمایش XRD نانوکامپوزیت‌های ژئولیت-مس‌اکسید/گرافن اکسید، پیک‌های $2\theta=10$ مشاهده شده مربوط به گرافن اکسید بود (شکل ۹-D).

برای نانوذرات مس‌اکسید سنتز شده به صورت مجزا، میانگین اندازه بلورک‌ها در محدوده ۱۵ تا ۳۰ نانومتر و تنش شبکه‌ای در حدود ۰۰/۲ تا ۰۰/۴ میکرومتر محاسبه شد. این مقادیر نشان‌دهنده تشکیل نانوذرات ریزمقیاس با مقداری تنش داخلی ذاتی است. در مقابل، برای نانوکامپوزیت مس‌اکسید-ژئولیت، میانگین اندازه بلورک‌های مس‌اکسید به محدوده کوچک‌تر و یکنواخت‌تری عموماً بین ۵ تا ۲۰ نانومتر



شکل ۱۰ - تصاویر TEM؛ (A) ZnO، (B) ZnO/اسید، (C) ZnO/اسید/گرافن اکسید، (D) ZnO/اسید/گرافن اکسید، (E) ZnO/اسید/گرافن اکسید

وجود ذرات چندوجهی در کنار صفحه‌های هموار و صاف به وضوح قابل رویت است (شکل ۱۰-C) که بیانگر اتصال موفق ZnO/اسید/گرافن اکسید است. شکل ۸-D، مربوط به تصویر TEM ZnO/اسید است که نشانگر ورقه‌های نازک، شفاف و موج‌دار با لبه‌های چین‌خورده است. این ورقه‌ها به دلیل ضخامت کم، در TEM بسیار روشن دیده می‌شوند. این ساختار نشان‌دهنده طبیعت دوبعدی و غیربلوری ZnO/اسید است. پس از افزودن ZnO/اسید به ZnO/اسید/گرافن اکسید، تصویر TEM تغییرات چشم‌گیری نشان داد (شکل ۱۰-E). ورقه‌های نازک و موج‌دار ZnO/اسید به صورت ساختارهای شفاف و روشن با لبه‌های چین‌خورده ظاهر شدند. ذرات ZnO/اسید و ZnO/اسید/گرافن اکسید به شکل توده‌ای ظاهر نشدند، بلکه به‌طور یکنواخت‌تر روی سطح ZnO/اسید توزیع شده‌اند. این پراکندگی به دلیل ویژگی‌های سطحی و گروه‌های عاملی ZnO/اسید (مانند OH، COOH) است که با ذرات فلزی و ZnO/اسید پیوند برقرار می‌کنند.

تأیید بارگذاری داروی DOX در ZnO/اسید/گرافن اکسید

گرافن اکسید FTIR

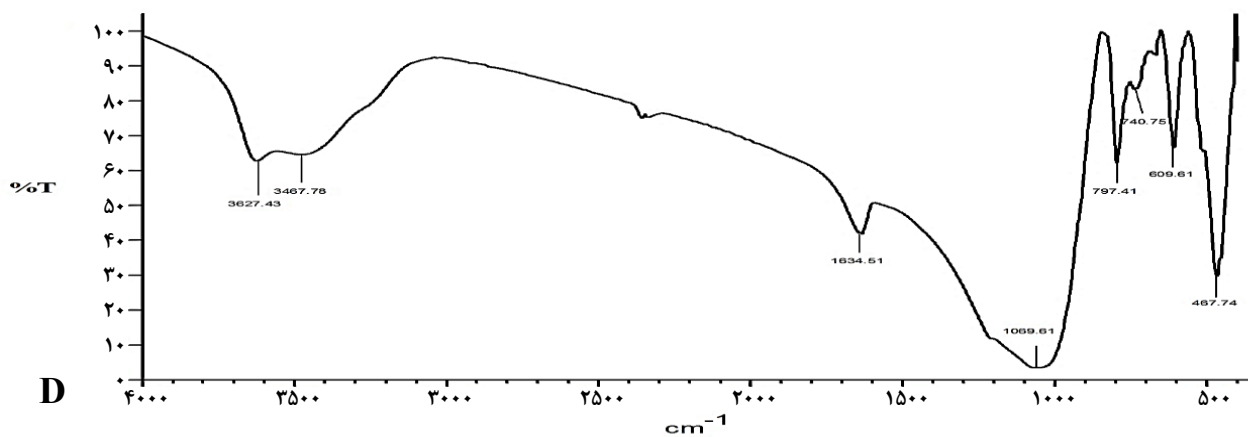
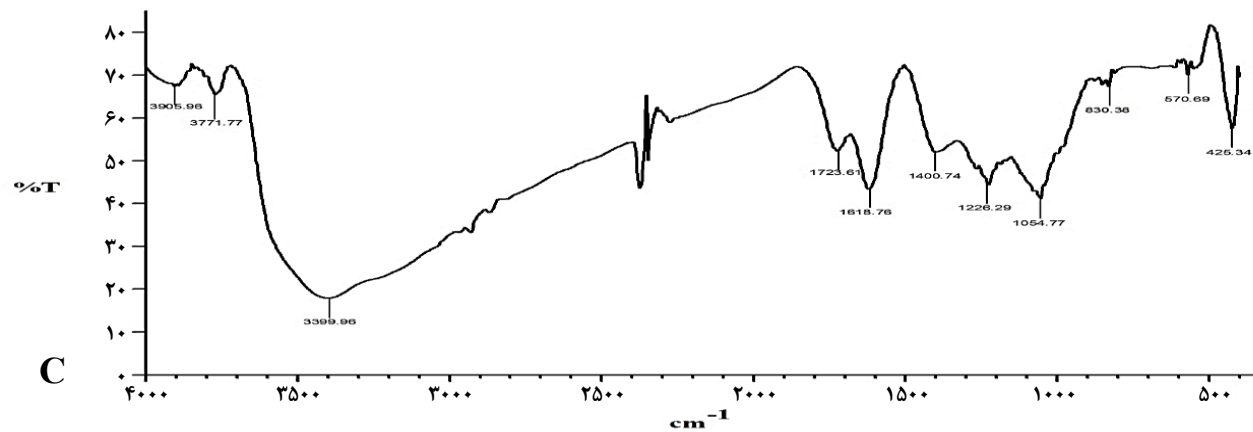
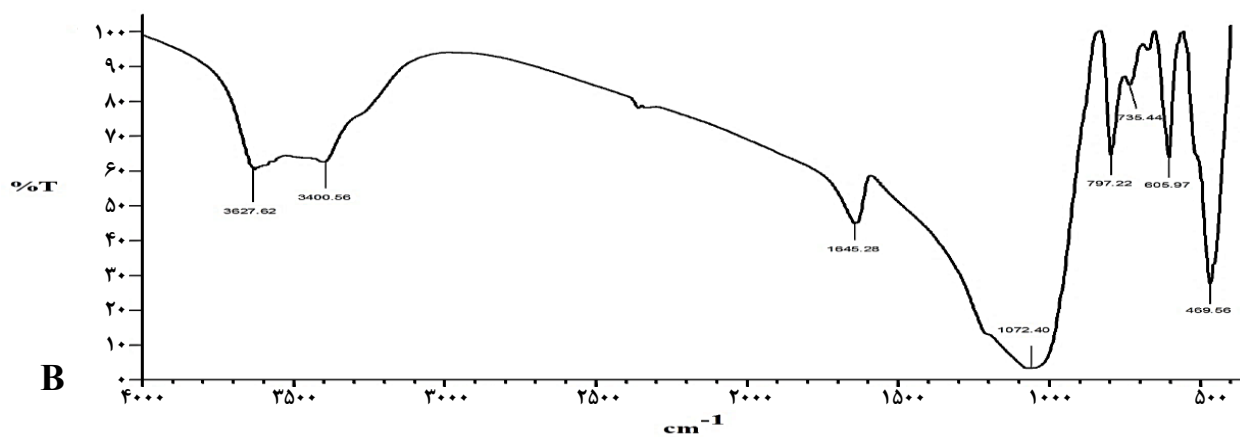
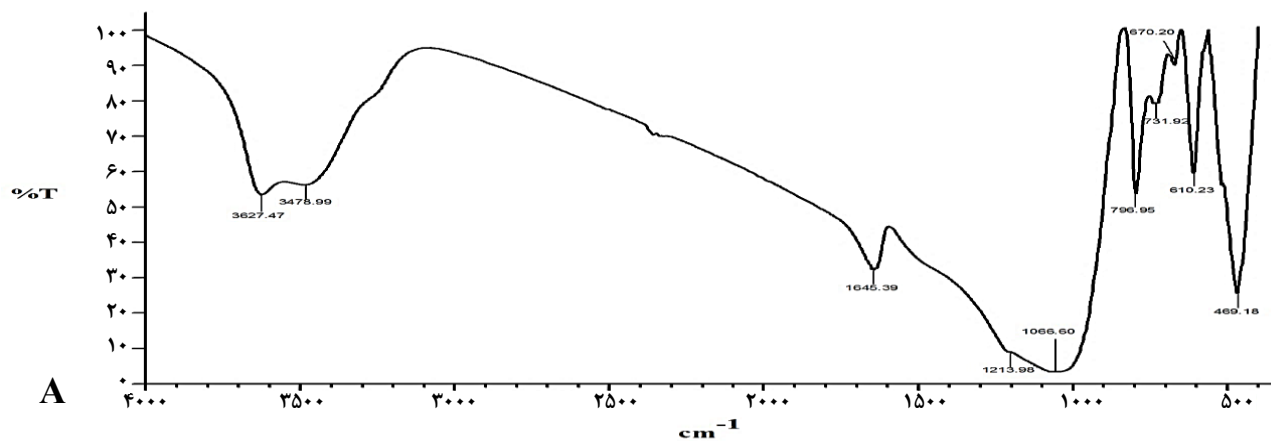
طبق نتایج به دست آمده از FTIR ZnO/اسید/گرافن اکسید (شکل ۱۱-A) مشخص شد که نوار جذب مشاهده شده در ناحیه 3627 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی پیوندهای O-H در ساختار مونومری و نوار جذب 3478 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی پیوندهای O-H در ساختار پلیمری می‌باشد و نوار جذب حاصل در ناحیه 1213 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات نامتقارن T-O است. همچنین نوار جذب ظاهر شده در 796 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی متقارن پیوند T-O-T، نوار جذب 731 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی متقارن با ماهیت تغییر شکل زاویه‌ای و کشش متقارن آزاد TO4، نوار جذب 670 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات نامتقارن TO4 و نوار جذب در 469 cm^{-1} مربوط به پیوندهای خمشی TO4 می‌باشد. نوار جذب ظاهر شده در ناحیه 3627 cm^{-1} در شکل ۱۱-B مربوط به ارتعاشات کششی پیوندهای O-H و 3400 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی پیوندهای O-H ZnO/اسید است. وجود در ساختار پلیمری ZnO/اسید/گرافن اکسید می‌باشد.

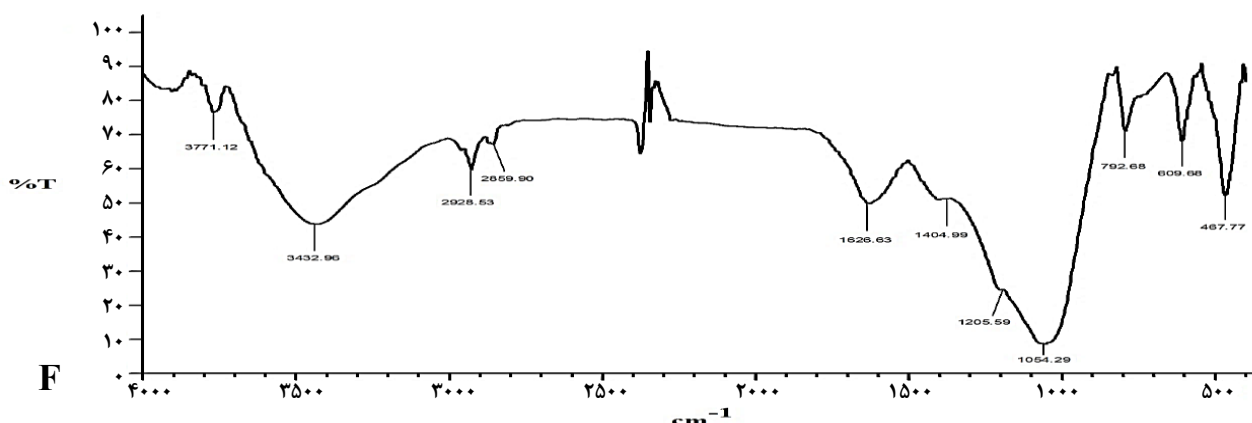
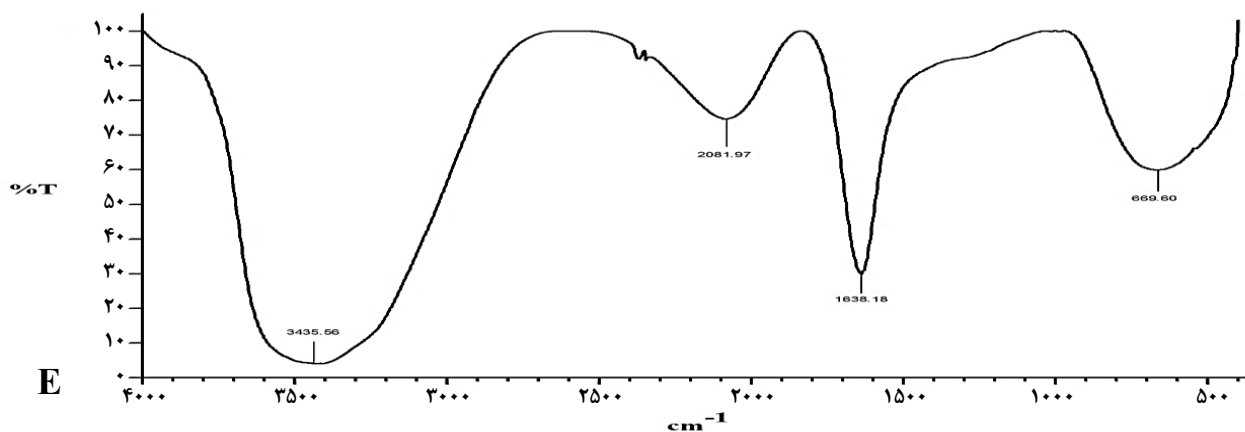
همچنین در این ZnO/اسید/گرافن اکسید پیک‌های موجود در $32/5$ و $35/5$ ($2\theta = 38/7$) مربوط به ZnO/اسید/گرافن اکسید است (شکل ۹-D)، که همه این موارد سنتز درست ZnO/اسید/گرافن اکسید را تأیید می‌کند.

همچنین اندازه برای ZnO/اسید سنتز شده، در محدوده ۱ تا ۵ نانومتر و تنش شبکه‌ای قابل توجه ناشی از حضور گروه‌های عاملی اکسیژن‌دار و نقص‌های ساختاری بود. در مورد ZnO/اسید/گرافن اکسید ZnO/اسید با روش ویلیامسون-هال نشان داد که میانگین اندازه بلورک‌های ZnO/اسید به محدوده بسیار ریز ۳ تا ۱۵ نانومتر کاهش و تنش شبکه‌ای به مقدار قابل توجه $4/000$ تا $8/000$ میکرومتر افزایش یافته است. این تغییرات چشم‌گیر در مقایسه با ZnO/اسید (سنتز شده به تنهایی) حاکی از اثر هم‌افزای بستر ترکیبی ZnO/اسید و گرافن اکسید است که از یک سو با پراکندگی فیزیکی و از سوی دیگر با برهمکنش‌های شیمیایی در سطح مشترک، به طور همزمان از رشد و تجمع نانوذرات ممانعت کرده و تنش شبکه‌ای شدیدی را القا می‌نماید. علاوه بر این، در الگوی ZnO/اسید/گرافن اکسید ZnO/اسید/گرافن اکسید، پیک وسیع گرافن اکسید اغلب به دلیل برهمکنش قوی با سایر اجزا و انباشتگی کمتر، به وضوح مشاهده می‌شود که خود مؤید توزیع یکنواخت آن در ساختار ZnO/اسید/گرافن اکسید است. این ویژگی‌های ریزساختاری به‌دست‌آمده شامل اندازه نانومتری بسیار ریز، تنش شبکه‌ای بالا و سطح مشترک گسترده به طور مستقیم ظرفیت بارگذاری دارو، پایداری ساختاری و کارایی رهایش کنترل‌شده ZnO/اسید/گرافن اکسید را افزایش می‌دهند.

TEM

طبق نتایج به دست آمده از میکروسکوپ TEM (شکل ۱۰)، مشخص شد که ساختار و ریخت شناسی ZnO/اسید/گرافن اکسید نسبتاً نامنظم با کنتراست متوسط است (شکل ۱۰-A). تصاویر مربوط به TEM ZnO/اسید نشانگر ذراتی با شکل پولی‌هدی (ذرات چندوجهی متصل شده به یکدیگر) در اندازه ۷۰ الی ۱۰۰ نانومتر را نشان می‌دهد. ذرات در تصویر به صورت نواحی تیره ظاهر شده‌اند و اغلب به صورت خوشه‌ای مجتمع هستند (شکل ۱۰-B). همچنین پس از تشکیل ZnO/اسید/گرافن اکسید





شکل ۱۱ - طیف FTIR؛ (A) زئولیت، (B) نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید، (C) گرافن اکسید، (D) نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید، (E) Dox و (F) نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید/DOX

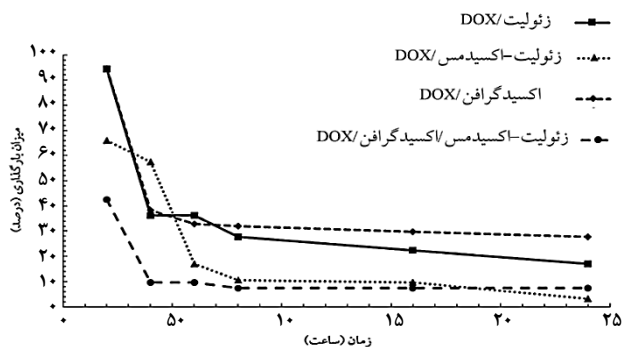
نوار جذبی پهن کوچک ظاهر شده در محدوده 2081 cm^{-1} مربوط به پیوند C=N-H بود. علاوه بر این نوار جذبی بسیار تیز در ناحیه 1638 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات پیوند دوگانه کربونیل (C=O) و نوار جذبی بسیار پهن در ناحیه 667 cm^{-1} مربوط به پیوند C-H در آلکین بود. از سویی دیگر با بررسی‌های انجام شده بر روی طیف FTIR نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید/DOX مشخص شد که نوار جذبی در ناحیه 3432 cm^{-1} مربوط به پیوندهای O-H در ساختار دارو می‌باشد. نوارهای جذبی بالاتر از این ناحیه نیز مربوط به دارو می‌باشد و نوار جذبی در ناحیه 2928 cm^{-1} مربوط به پیوند C-H آلیفاتیک موجود در دارو و 2859 cm^{-1} مربوط به پیوند C-H آروماتیک موجود در گرافن و دارو می‌باشد. نوارهای جذبی در محدوده 2230 cm^{-1} مربوط به پیوند C=NH در دارو است. از طرفی دیگر نوار جذبی مشاهده شده در ناحیه 1626 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات پیوند دوگانه کربونیل (C=O) موجود در دارو و 1404 cm^{-1} و 1205 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی پیوند دوگانه C=C موجود در گرافن و دارو می‌باشد. همچنین نوارهای جذبی 1054 cm^{-1} ، 792 cm^{-1} و 467 cm^{-1} پیوندهای Si-O-Al، Si-O-Al و Al-OH موجود در زئولیت می‌باشد و نوار جذبی در محدوده 467 cm^{-1} مربوط به پیوند Cu-O است (شکل ۱۱-F).

همچنین سایر نوارهای جذبی مشاهده شده در FTIR مربوط به زئولیت در این نانوکامپوزیت نیز مشاهده شد و نوار جذبی بسیار تیز در ناحیه 467 cm^{-1} مربوط به پیوند Cu-O می‌باشد. با بررسی نتایج حاصل از FTIR گرافن اکسید مشخص شد که یک نوار جذبی پهن و مشخص در ناحیه 3399 cm^{-1} وجود داشت که مربوط به ارتعاشات کششی پیوندهای O-H در سطح بود. همچنین یک نوار جذبی تیز در ناحیه 1723 cm^{-1} ظاهر شد که مربوط به ارتعاشات کششی پیوند C=O بود. از سویی دیگر چندین نوار جذبی تیز و مشخص در ناحیه 1618 cm^{-1} ، 1400 cm^{-1} ، 1226 cm^{-1} و 1054 cm^{-1} مشاهده شد که به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی پیوند C=C با هیبریداسیون sp^2 ، ارتعاشات خمشی پیوند C-OH و ارتعاشات کششی پیوند C-O و C-OH بود (شکل ۱۱-C). همچنین نواحی مشابه زئولیت، نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید و گرافن اکسید در طیف‌های FTIR نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید/DOX مطابقت کامل داشت، که بیانگر سنتز موفق این پلیمر بود (شکل ۱۱-D). با بررسی طیف حاصل از FTIR داروی DOX (شکل ۱۱-E)، مشخص شد که یک نوار جذبی بسیار مشخص و پهن در ناحیه 3435 cm^{-1} مربوط به پیوندهای O-H در ساختار دارو می‌باشد. همچنین

نانو کامپوزیت ژئولیت-مس اکسید و نانو کامپوزیت ژئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید می‌تواند مربوط به تخلخل بالا و منافذ بالای ژئولیت باشد که گرافن اکسید فاقد این ویژگی کاربردی است (شکل ۱۳-A). از سویی دیگر با تغییر محیط رهایش دارو به بافر فسفات (PBS) - شبیه‌ساز بدن - با $pH=7/4$ نیز رفتار مشابه با آب مقطر از حامل‌های دارو مشاهده شد با این تفاوت که با گذشت زمان (به غیر از گرافن اکسید) نانو حامل‌ها رهایش انفجاری نداشت و به نوعی کنترل شده بود (شکل ۱۳-B). اما با تغییر pH بافر PBS به $pH=5/5$ (pH اطراف بافت‌های سرطانی) میزان رهایش داروی DOX از نانو حامل‌ها به صورت انفجاری افزایش یافت (شکل ۱۳-C). که این امر می‌تواند به دلیل برهمکنش‌های بیشتر گروه آمین موجود در DOX با پروتون‌های آزاد بیشتر در این محیط باشد که امکان رهایش بیشتر دارو را از خلل و فوج ژئولیت و نانو کامپوزیت‌ها را فراهم می‌کند. با توجه به رفتار نانو کامپوزیت ژئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید در رهایش کنترل شده داروی بارگذاری شده در آن و رهایش بیشتر دارو در اطراف سلول‌های سرطانی و رهایش کنترل شده در اطراف سلول‌های سالم می‌توان نتیجه گرفت که این گونه از نانو کامپوزیت‌ها شرایط لازم جهت انتقال هدفمند دارو به سلول‌های سرطانی (بر اساس pH اطراف این سلول‌ها) را دارند.

سنجش زیست‌پذیری سلولی

به طور خاص، در درمان سرطان، مقدار IC_{50} نشان دهنده غلظت دارویی است که می‌تواند فعالیت نوع خاصی از سلول سرطانی را تا ۵۰ درصد کاهش دهد. این پارامتر برای ارزیابی اثربخشی داروهای ضدسرطان بسیار مهم است [۳۳]. بر اساس نتایج به دست آمده از سمیت سلولی ژئولیت، نانو کامپوزیت ژئولیت-مس اکسید، گرافن اکسید، نانو کامپوزیت ژئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید بر روی لاین‌های سلولی HS-578T مشخص شد که این ترکیبات در حالت بدون دارو سمیت سلولی بسیار پایینی دارد به طوری که حتی در بالاترین غلظت مورد استفاده ($100 \mu g/ml$) بیشترین درصد زنده‌مانی سلولی مشاهده شد (شکل ۱۴). هم چنین از نظر میزان IC_{50} این ترکیبات بیشترین مقدار IC_{50} را داشتند (IC_{50} ترکیبات بدون دارو بیشتر از بالاترین غلظت مورد استفاده ($100 \mu g/ml$) بود (شکل ۱۵ و شکل ۱۶-A تا D). این درحالیست که با بارگذاری داروی DOX در این ترکیبات میزان سمیت سلولی این ترکیبات افزایش چشم‌گیری نشان داد. علاوه بر این، این تغییر در برخی از نمونه‌ها بسیار بیشتر بود، برای مثال میزان IC_{50} گرافن اکسید در وضعیت فاقد دارو بالاتر از $100 \mu g/ml$ بود (شکل ۱۵ و شکل ۱۶-C)، در حالی که پس از افزودن داروی DOX میزان IC_{50} آن به $37/12 \mu g/ml$ کاهش یافت (شکل ۱۵ و شکل ۱۶-G). در مورد نانو کامپوزیت‌های سنتز شده نیز این مورد صادق بود، اما تفاوتی که در ساختار نانو کامپوزیت‌ها ایجاد شده بود عامل مهمی



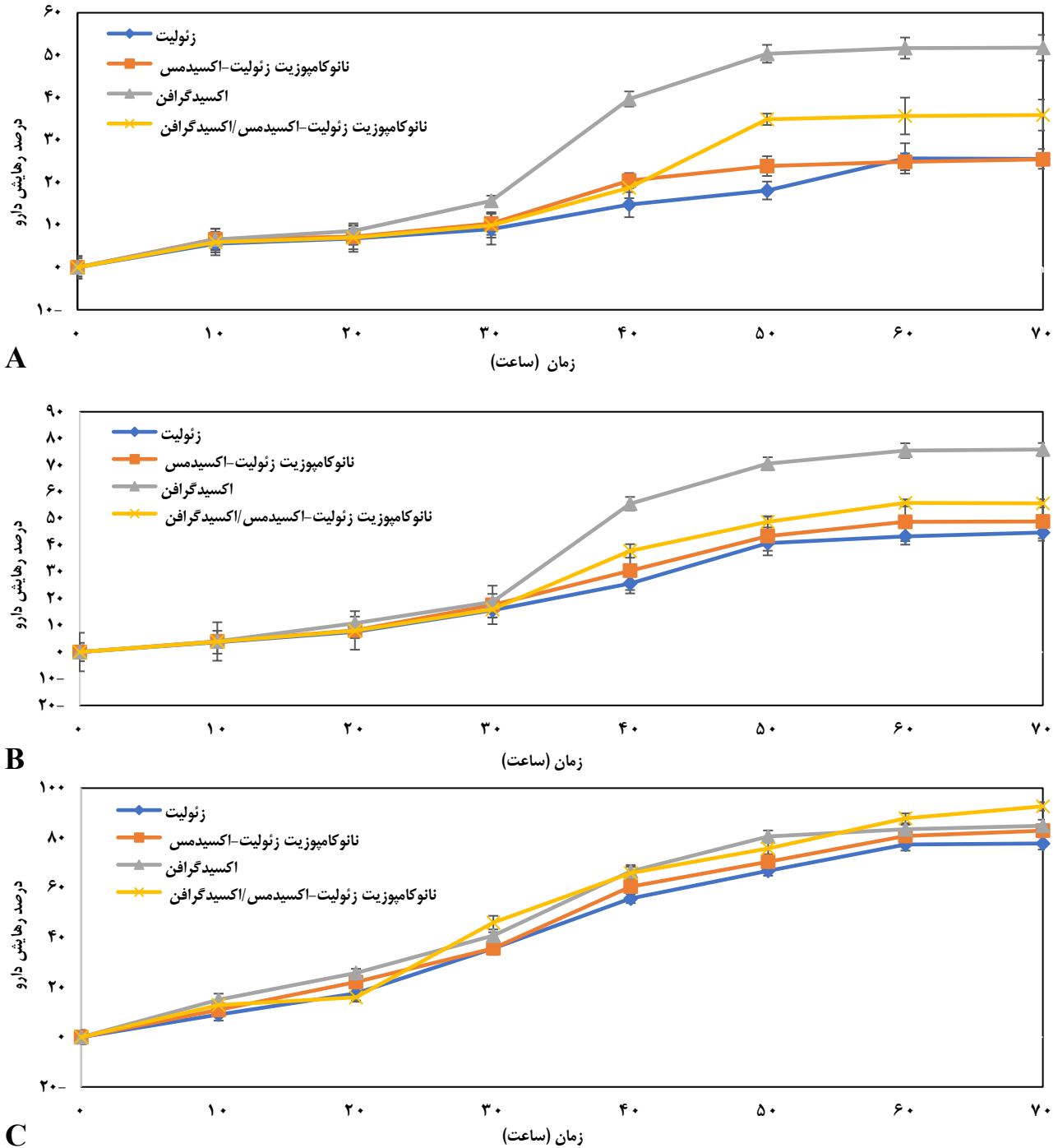
شکل ۱۲ - نمودار بارگذاری دارو در حامل‌های مختلف

درصد بارگذاری DOX

طبق نتایج به دست آمده از میزان بارگذاری داروی DOX توسط ژئولیت، نانو کامپوزیت ژئولیت-مس اکسید، گرافن اکسید و نانو کامپوزیت ژئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید (شکل ۱۲)، مشخص شد که میزان بارگذاری دارو در دو ساعت اول در نانو حامل‌های ژئولیت و گرافن اکسید کامل بود، به طوری که بیش از ۹۰ درصد دارو بارگذاری شده بود، که این حجم بالای بارگذاری‌پذیری توسط این نانو حامل‌ها می‌تواند مربوط به تخلخل بالا و جذب اولیه خوب باشد. از سویی دیگر افزودن مس اکسید به نانو حامل‌های ژئولیت (به تنهایی) و ترکیب ژئولیت/گرافن اکسید ظرفیت بارگذاری دارو را به ترتیب تا ۶۷ و ۴۴ درصد کاهش داد (شکل ۱۲). از سویی دیگر مشخص شد که با گذشت زمان میزان بارگذاری کاهش داشت که بعد از ۵ ساعت این میزان بارگذاری به یک مقدار ثابت رسیده و تا ۲۴ ساعت هیچ تغییری نکرد که بیانگر محدود بودن ظرفیت بارگذاری توسط این نانو کامپوزیت‌ها بود.

درصد رهایش دارو

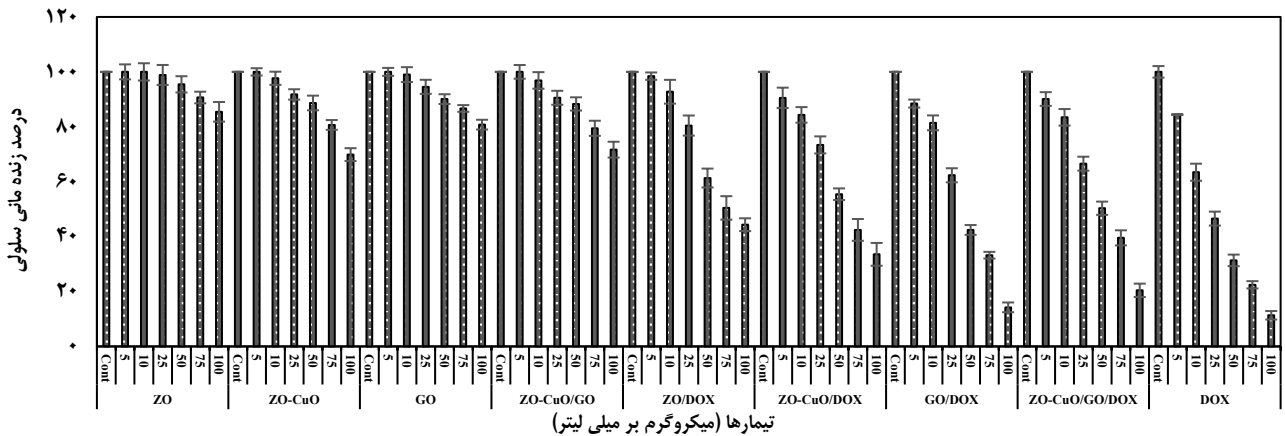
همانطور که در شکل ۱۳-A مشاهده می‌شود سرعت رهایش داروی DOX از ژئولیت، نانو کامپوزیت ژئولیت-مس اکسید و نانو کامپوزیت ژئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید در آب مقطر با $pH=7/4$ تا ۳۰ ساعت ابتدایی به صورت کنترل شده و آرام بود اما با گذشت زمان میزان رهایش دارو به صورت انفجاری افزایش یافت. طبق نتایج حاصل مشخص شد که میزان رهایش دارو از گرافن اکسید در ساعات ابتدایی کنترل شده بود اما پس از ۲۰ ساعت به صورت انفجاری افزایش یافت، هم‌چنین این میزان رهایش در ساعات اولیه از نانو کامپوزیت ژئولیت-مس اکسید کاملاً کنترل شده بود اما با افزودن گرافن اکسید یک تغییر بنیادی در میزان رهایش داروی DOX از نانو کامپوزیت‌های حاصل (نانو کامپوزیت ژئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید) ایجاد شد، البته این میزان رهایش کنترل شده‌تر از گرافن اکسید (به تنهایی) بود و دلیل بالا بودن میزان (غلظت) داروی رهایش یافته از این نانو کامپوزیت، غلظت بالای داروی بارگذاری شده در آن است. هم‌چنین دلیل اصلی در رهایش کنترل شده دارو توسط ژئولیت،



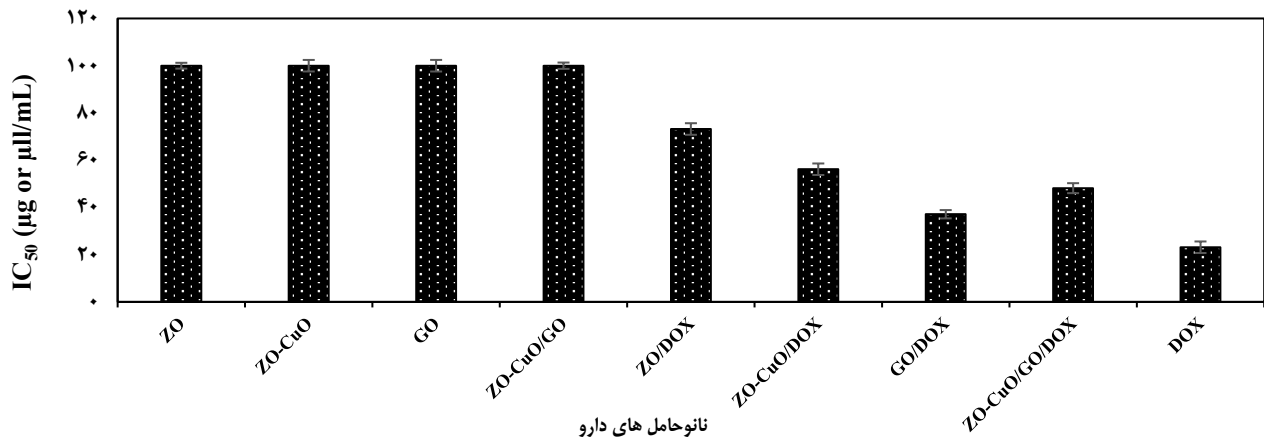
شکل ۱۳ - نمودار رهائش دارو از حامل‌های مختلف؛ (A) آب مقطر، (B) بافر فسفات (PBS) pH=۷/۴ و (C) بافر فسفات (PBS) pH=۵/۵

افزایش غلظت IC_{50} ترکیبات می‌شود، که این مورد نیز می‌تواند به دلیل پیوندهای محکم بین دارو-زئولیت در منافذ متعدد این ترکیب باشد. از سویی دیگر با مقایسه میزان سمیت سلولی زئولیت و نانو کامپوزیت زئولیت-مس اکسید، مشخص شد که نانو کامپوزیت مذکور به دلیل وجود عنصر مس از سمیت سلولی بالایی بر روی لاین‌های سلولی HS-578T برخوردار است (شکل‌های ۱۴، ۱۵ و ۱۶).

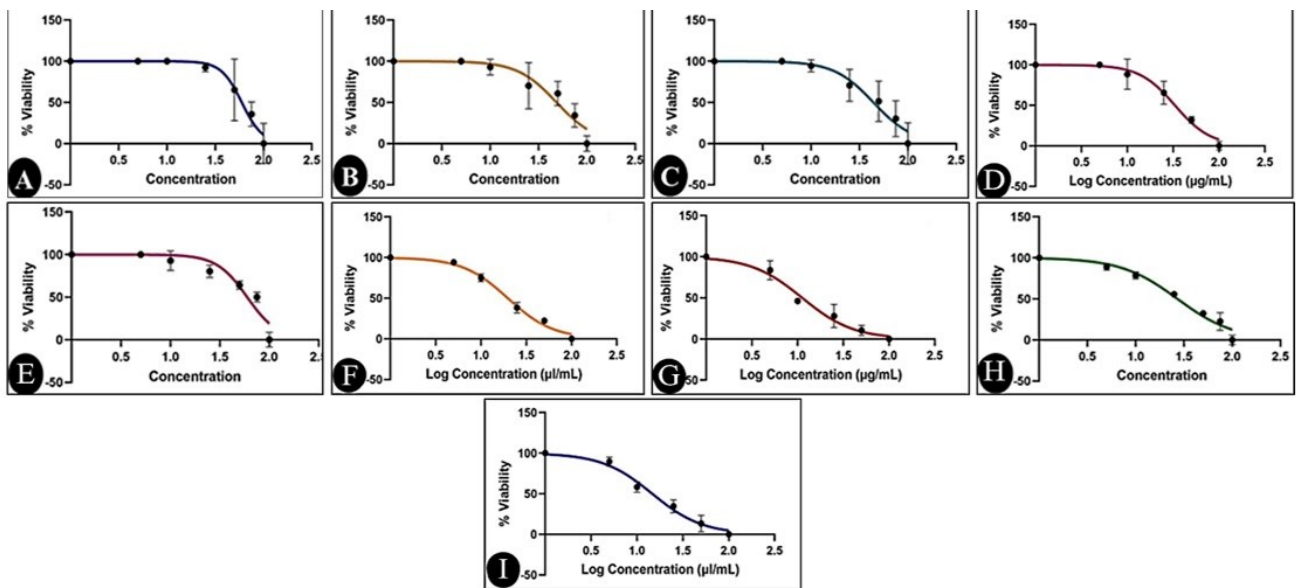
در بروز تفاوت در میزان IC_{50} بود. به طوری که مشخص شده است نانو کامپوزیت زئولیت-مس اکسید/گرافن/اکسید حاوی DOX میزان IC_{50} کمتری نسبت به نانو کامپوزیت زئولیت-مس اکسید/DOX داشت، این امر می‌تواند به دلیل حضور گرافن/اکسید در نانو کامپوزیت مذکور باشد که علاوه بر افزایش رهائش دارو، سمیت بیشتری به نانو کامپوزیت می‌بخشد (شکل ۱۵ و شکل ۱۶-F و H). همچنین از نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از زئولیت (با تخلخل بالا) موجب



شکل ۱۴ - میزان زنده‌مانی لاین‌های سلولی HS-578T تحت تأثیر نانوحامل‌های (حاوی دارو و فاقد دارو) مختلف در غلظت‌های متفاوت. (ZO، زنولیت، (ZO-CuO) نانوکامپوزیت زنولیت-مس اکسید، (GO) گرافن اکسید، (ZO-CuO-GO) نانوکامپوزیت زنولیت-مس اکسید-گرافن اکسید، (DOX) دوکسوروبیسین تیمارها (میکروگرم بر میلی لیتر)



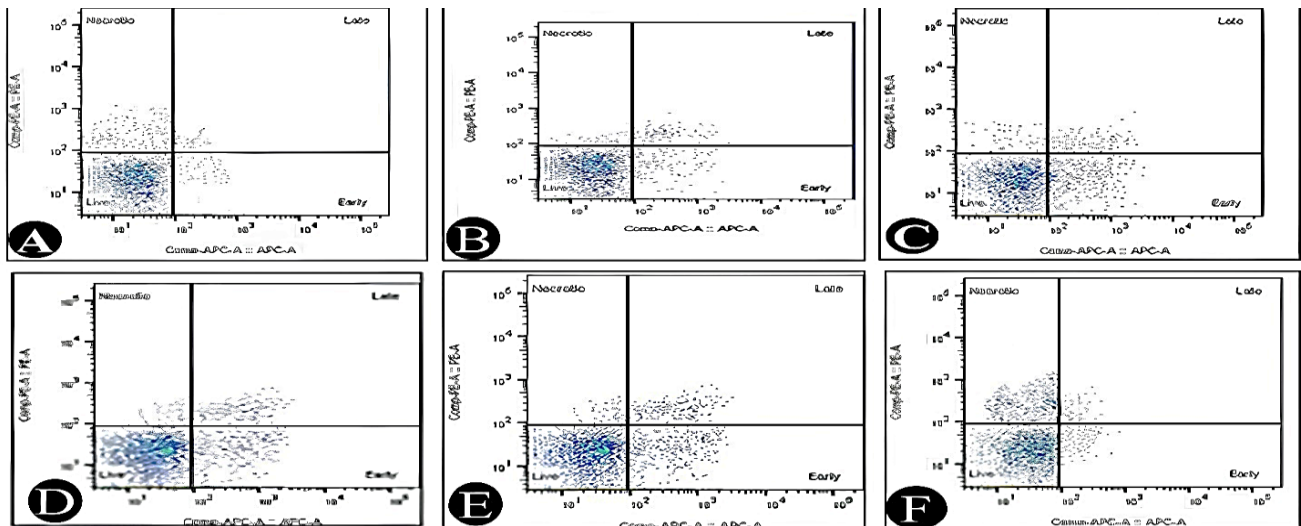
شکل ۱۵ - غلظت IC_{50} نانوحامل‌ها؛ (ZO، زنولیت، (ZO-CuO) نانوکامپوزیت زنولیت-مس اکسید، (GO) گرافن اکسید، (ZO-CuO-GO) نانوکامپوزیت زنولیت-مس اکسید-گرافن اکسید، (DOX) دوکسوروبیسین نانوحامل‌های دارو



شکل ۱۶ - نمودار IC_{50} نانوحامل‌ها؛ (A) زنولیت، (B) نانوکامپوزیت زنولیت-مس اکسید، (C) گرافن اکسید، (D) نانوکامپوزیت زنولیت-مس اکسید-گرافن اکسید، (E) زنولیت/DOX، (F) نانوکامپوزیت زنولیت-مس اکسید/DOX، (G) گرافن اکسید/DOX، (H) نانوکامپوزیت زنولیت-مس اکسید-گرافن اکسید/DOX، (I) دوکسوروبیسین (DOX).



شکل ۱۷ - لاین‌های سلولی HS-578T واقع در مراحل نکروتیک، پیش و پس آپوپتوزیک؛ ZO) زئولیت، ZO-CuO) نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید، مس اکسید، GO) گرافن اکسید، ZO-CuO-GO) نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید-گرافن اکسید، DOX) دوکسوروبیسین نانوحامل‌ها و دارو



شکل ۱۸ - نتایج فلوسایتومتری: لاین سلولی Hs-578T تیمار شده با (A) نمونه شاهد، (B) زئولیت/DOX، (C) نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید/DOX، (D) گرافن اکسید/DOX، (E) نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید-گرافن اکسید/DOX و (F) دوکسوروبیسین (DOX).

آپوپتوز سلولی

از نانوذرات و درصد بالای سلول‌هایی باشد که وارد فاز قبل یا بعد از آپوپتوز می‌شوند. بالاترین درصد سلول‌ها در فازهای قبل و بعد از آپوپتوز (به ترتیب ۲۰/۱۴ و ۱۷/۶۵ درصد) مربوط به تیمار سلول‌ها با نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید-گرافن اکسید/DOX بود (شکل ۱۷ و شکل ۱۸-E)، که نشان دهنده تأثیر مثبت نانوذرات حامل بر وقوع مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز) است.

بحث و نتیجه‌گیری

فناوری نانو، به عنوان یکی از پیشرفته‌ترین و نوآورانه‌ترین فناوری‌ها در زمینه‌های پزشکی و علوم مواد، در سال‌های اخیر توجه بسیاری از محققان و دانشمندان را به خود جلب کرده است [۳۵]. این فناوری با استفاده از خواص منحصر به فرد مواد در مقیاس نانو، به ویژه در درمان بیماری‌های پیچیده‌ای مانند سرطان، تحول چشمگیری ایجاد کرده است [۳۶]. درمان سرطان یکی از بزرگترین

یکی از پارامترهایی که می‌تواند نقش بسیار مهمی در افزایش سطح آپوپتوز سلول‌های سرطانی داشته باشد، توانایی داروها در هدف‌گیری سلول‌های سرطانی است [۳۴]. برای این منظور، استفاده از نانوذرات هدفمند نیز بسیار مفید است. در این مطالعه، پس از محاسبه غلظت IC50 ترکیبات، نقش آنها در وقوع فرآیند آپوپتوز سلولی بررسی شد. طبق نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه، بیشترین درصد سلول‌های نکروتیک (۳۰/۵۹ درصد) در گروه تیمار شده با DOX آزاد مشاهده شد (شکل ۱۷ و شکل ۱۸-F). علاوه بر این، طبق مطالعات قبلی، درصد بالای سلول‌های نکروتیک در تیمار کنترل نیز به دلیل رشد بالای لاین‌های سلولی HS-578T و رقابت برای مواد مغذی بود (شکل ۱۷ و شکل ۱۸-A). علاوه بر این، درصد پایین سلول‌های نکروتیک در نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید-گرافن اکسید/DOX می‌تواند نشان‌دهنده عدم وجود عوارض جانبی نامناسب

چالش‌های پزشکی در قرن بیست و یکم محسوب می‌شود. سلول‌های سرطانی معمولاً به سرعت رشد می‌کنند و می‌توانند به بافت‌های سالم بدن آسیب برسانند [۳۷]. یکی از مشکلات عمده در درمان سرطان، عدم تشخیص سریع و دقیق نوع و محل سلول‌های سرطانی و همچنین عوارض جانبی درمان‌های تجویز شده مانند شیمی‌درمانی و پرتودرمانی است [۳۸]. این درمان‌ها نه تنها سلول‌های سرطانی را هدف قرار می‌دهند، بلکه به سلول‌های سالم نیز آسیب می‌رسانند. بنابراین، انتقال هدفمند دارو و ژن به سلول‌های سرطانی از طریق فناوری نانو می‌تواند یک استراتژی مؤثر برای بهبود نتایج درمان و کاهش عوارض جانبی باشد [۳۹]. نانوحامل‌ها موادی هستند که برای انتقال مستقیم داروها و ژن‌ها به سلول‌های سرطانی طراحی شده‌اند. این نانوحامل‌ها معمولاً شامل نانوذرات، نانوکپسول‌ها یا نانوذله‌ها هستند که می‌توانند خواص خاصی برای هدف‌گیری سلول‌های سرطانی داشته باشند [۴۰]. توسعه فناوری نانو برای تحویل داروها و ژن‌ها به سلول‌های سرطانی مزایای قابل توجهی دارد، اولاً، این روش به افزایش کارایی داروها کمک می‌کند به طوری که با هدف‌گیری دقیق سلول‌های سرطانی، مقدار داروی مورد نیاز برای درمان کاهش می‌یابد. ثانیاً، نانوحامل‌ها می‌توانند از نشت دارو به بافت‌های سالم جلوگیری کنند و در نتیجه عوارض جانبی را به طور قابل توجهی کاهش دهند. فناوری نانو همچنین به امکان استفاده از روش‌های درمانی جدید مانند ژن‌درمانی و ایمونوتراپی کمک می‌کند که می‌تواند منجر به کنترل و حتی درمان سرطان شود [۱۴]. با وجود مزایای فراوان فناوری نانو در درمان سرطان، چالش‌ها و محدودیت‌های متعددی وجود دارد. این چالش‌ها شامل مسائلی مربوط به ایمنی و سمیت نانوحامل‌ها می‌شود [۴۱]. عدم درک کامل از رفتار نانوذرات در بدن و اثرات طولانی‌مدت آنها می‌تواند نگرانی‌هایی را برای محققان و بیماران ایجاد کند. علاوه بر این، هزینه‌های تولید و طراحی نانوحامل‌ها ممکن است برای بسیاری از مراکز پزشکی و تحقیقاتی گزاف باشد [۴۲]. در این مطالعه از ترکیباتی نظیر ژئولیت، مس‌اکسید و گرافن اکسید در جهت سنتز نانوکامپوزیت‌های کارآمد برای دارو رسانی هدفمند دوکسوروبیسین به لاین‌های سلولی HS-578T استفاده شد. این کار با توجه به مزایا و ویژگی‌های متمایز نانوکامپوزیت‌ها، همانطور که قبلاً ذکر شد، انجام شد. ژئولیت‌ها مهم‌ترین ترکیبات معدنی و میکرو متخلخل هستند که دارای ساختار منظم بلوری و حفره‌دار با بار ذاتی منفی می‌باشند [۴۳]. در اکثر موارد ساختار ژئولیتی از قطعات چهاروجهی با چهار اتم اکسیژن و یک اتم مرکزی نظیر آلومینیوم، سیلیسیم، گالیم یا فسفر تشکیل شده‌اند که با کاتیون‌ها خنثی می‌شوند [۴۴]. با توجه به خواص زیست‌سازگاری و متخلخل بالا، از ژئولیت می‌توان به عنوان حاملی برای دارورسانی هدفمند استفاده کرد [۱۷]. ژئولیت‌های طبیعی مانند کلینوپتیلولیت به عنوان

مواد خوراکی استفاده می‌شوند و کمبود مواد معدنی ضروری بدن را تأمین می‌کند و از مسمومیت تدریجی انسان که از مواد مضر موجود در محیط زیست، هوا، آب و مواد غذایی به دست می‌آید، جلوگیری می‌کند [۴۵]. گرافن اکسید، ماده‌ای تک‌لایه است که از اکسیداسیون پودر گرافیت با اکسیدکننده‌های بسیار قوی به دست می‌آید و به دلیل سهولت تبدیل آن به گرافن، نظر بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است. سطوح لایه‌ای گرافن اکسید به دلیل حضور گروه‌های عاملی اکسیده شده، قطبی می‌باشند و مقادیر زیادی از اتم‌های اکسیژن روی سطح C-O بصورت گروه‌های عاملی اپوکسی، هیدروکسیل و کربوکسیل وجود دارند که حضور همه‌ی این گروه‌های عاملی باعث می‌شود که C-O بصورت خارق العاده‌ی آب‌دوست باشد و منجر به ارتقاء کاربرد گرافن اکسید در محیط زیست گردد [۲۶]. در مطالعه‌ای که توسط Liu و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شد، از گرافن اکسید عامل‌دار شده به‌عنوان یک حامل دارویی کارآمد استفاده شد. با توجه به سطح مقطع گسترده گرافن اکسید، این نانوماده قابلیت بالایی در انتقال داروها از خود نشان می‌دهد. از آنجا که محیط سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی اسیدی‌تر است، این سیستم هوشمند به‌گونه‌ای طراحی شد که با کاهش pH محیط، میزان آزادسازی دارو افزایش یابد. این ویژگی هدفمند باعث می‌شود دارو عمدتاً در ناحیه تومور رهاسازی شود و جذب دارو توسط سلول‌های سالم به حداقل برسد [۴۶]. در این پژوهش نیز، کلینوپتیلولیت خام پس از اصلاح شیمیایی و ترکیب با مس‌اکسید و گرافن اکسید، به یک نانوکامپوزیت کارآمد برای بارگذاری و رهایش کنترل‌شده داروی دوکسوروبیسین تبدیل شد. ساختار ژئولیت (کلینوپتیلولیت پردازش شده) به گونه‌ای است که هر چهاروجهی AIO_4 در شبکه آن دارای بار منفی می‌باشد [۴۷]. این بار منفی از طریق تعویض یون با مس‌اکسید خنثی شده و در ادامه، افزودن گرافن اکسید منجر به تشکیل پیوندهای مناسب بین دارو، ژئولیت-مس‌اکسید و نانو ماده گرافنی می‌شود که برای فرآیند انتقال دارو ضروری است. این یافته‌ها با نتایج پژوهش Khatamian و همکاران (۲۰۱۶) هم‌خوانی دارد. گزارش دادند که نانوکامپوزیت Zn-Clin/GO قادر به جذب و انتقال مؤثر داروی دوکسوروبیسین می‌باشد [۴۸]. علاوه بر این در این مطالعه تصاویر FESEM تهیه شده از کلینوپتیلولیت خام نشان دهنده سطح صاف و متخلخل می‌باشد که بعد از اصلاح با NaOH میزان یکنواختی سطح کمتر و متخلخل‌تر می‌شود به طوری که قطر تخلخل‌ها کمتر از ۸۲ نانومتر مشخص شد (شکل ۳-A و B). که موارد بیانگر اصلاح صحیح و سنتز درست ژئولیت بود. همچنین نتایج TEM گرافن اکسید نشان دهنده سطوح لایه‌لایه مانند و صاف و نسبتاً هموار می‌باشد که امکان بارگذاری دارو را فراهم می‌کند. در این مطالعه اندازه ضخامت دسته‌ای از صفحات گرافن اکسید کمتر از ۷۸ نانومتر مشخص شد (شکل ۱۰-D).

چالش‌های پزشکی در قرن بیست و یکم محسوب می‌شود. سلول‌های سرطانی معمولاً به سرعت رشد می‌کنند و می‌توانند به بافت‌های سالم بدن آسیب برسانند [۳۷]. یکی از مشکلات عمده در درمان سرطان، عدم تشخیص سریع و دقیق نوع و محل سلول‌های سرطانی و همچنین عوارض جانبی درمان‌های تجویز شده مانند شیمی‌درمانی و پرتودرمانی است [۳۸]. این درمان‌ها نه تنها سلول‌های سرطانی را هدف قرار می‌دهند، بلکه به سلول‌های سالم نیز آسیب می‌رسانند. بنابراین، انتقال هدفمند دارو و ژن به سلول‌های سرطانی از طریق فناوری نانو می‌تواند یک استراتژی مؤثر برای بهبود نتایج درمان و کاهش عوارض جانبی باشد [۳۹]. نانوحامل‌ها موادی هستند که برای انتقال مستقیم داروها و ژن‌ها به سلول‌های سرطانی طراحی شده‌اند. این نانوحامل‌ها معمولاً شامل نانوذرات، نانوکپسول‌ها یا نانوذله‌ها هستند که می‌توانند خواص خاصی برای هدف‌گیری سلول‌های سرطانی داشته باشند [۴۰]. توسعه فناوری نانو برای تحویل داروها و ژن‌ها به سلول‌های سرطانی مزایای قابل توجهی دارد، اولاً، این روش به افزایش کارایی داروها کمک می‌کند به طوری که با هدف‌گیری دقیق سلول‌های سرطانی، مقدار داروی مورد نیاز برای درمان کاهش می‌یابد. ثانیاً، نانوحامل‌ها می‌توانند از نشت دارو به بافت‌های سالم جلوگیری کنند و در نتیجه عوارض جانبی را به طور قابل توجهی کاهش دهند. فناوری نانو همچنین به امکان استفاده از روش‌های درمانی جدید مانند ژن‌درمانی و ایمونوتراپی کمک می‌کند که می‌تواند منجر به کنترل و حتی درمان سرطان شود [۱۴]. با وجود مزایای فراوان فناوری نانو در درمان سرطان، چالش‌ها و محدودیت‌های متعددی وجود دارد. این چالش‌ها شامل مسائلی مربوط به ایمنی و سمیت نانوحامل‌ها می‌شود [۴۱]. عدم درک کامل از رفتار نانوذرات در بدن و اثرات طولانی‌مدت آنها می‌تواند نگرانی‌هایی را برای محققان و بیماران ایجاد کند. علاوه بر این، هزینه‌های تولید و طراحی نانوحامل‌ها ممکن است برای بسیاری از مراکز پزشکی و تحقیقاتی گزاف باشد [۴۲]. در این مطالعه از ترکیباتی نظیر ژئولیت، مس‌اکسید و گرافن اکسید در جهت سنتز نانوکامپوزیت‌های کارآمد برای دارو رسانی هدفمند دوکسوروبیسین به لاین‌های سلولی HS-578T استفاده شد. این کار با توجه به مزایا و ویژگی‌های متمایز نانوکامپوزیت‌ها، همانطور که قبلاً ذکر شد، انجام شد. ژئولیت‌ها مهم‌ترین ترکیبات معدنی و میکرو متخلخل هستند که دارای ساختار منظم بلوری و حفره‌دار با بار ذاتی منفی می‌باشند [۴۳]. در اکثر موارد ساختار ژئولیتی از قطعات چهاروجهی با چهار اتم اکسیژن و یک اتم مرکزی نظیر آلومینیوم، سیلیسیم، گالیم یا فسفر تشکیل شده‌اند که با کاتیون‌ها خنثی می‌شوند [۴۴]. با توجه به خواص زیست‌سازگاری و متخلخل بالا، از ژئولیت می‌توان به عنوان حاملی برای دارورسانی هدفمند استفاده کرد [۱۷]. ژئولیت‌های طبیعی مانند کلینوپتیلولیت به عنوان

ارتعاشات کششی متقارن پیوند T-O-T، ارتعاشات حفره و کشش متقارن آزاد TO_4 ، ارتعاشات نامتقارن TO_4 و پیوندهای خمشی TO_4 را گزارش کردند [۴۹]. که با نتایج به دست آمده در این پژوهش مطابقت کامل دارد. همچنین این نتایج در گزارشات *Mozgawa* و همکاران (۲۰۱۱) نیز مشاهده می‌شود [۵۰].

انتقال دارو توسط نانوذرات تحت تأثیر عوامل فیزیکی مانند اندازه، شکل و ویژگی‌های سطحی و همچنین عوامل شیمیایی از جمله ترکیب پوشش و پایداری نانوذرات قرار دارد [۵۱]. نانوذرات کوچک‌تر با اشکال خاص معمولاً نفوذ سلولی و تعامل با غشای سلولی را بهبود می‌بخشند [۵۲]. شرایط محیطی مانند pH و دما نیز نقش مهمی در تنظیم رهایش دارو از نانوذرات ایفا می‌کنند [۲۱]. pH بر بار الکتریکی و پایداری اتصال کمپلکس‌های دارو-نانوذره تأثیر می‌گذارد، قابل توجه است که محیط درون سلولی تومورها نسبت به سلول‌های سالم اسیدی‌تر است (pH=۵) که این امر بر متابولیسم سلولی، تهاجم و پاسخ ایمنی تأثیرگذار است [۵۳]. این تفاوت pH نه تنها بر کارایی انتقال ژن اثر می‌گذارد، بلکه فرصت‌هایی را برای استراتژی‌های درمانی هدفمند با بهره‌گیری از اسیدیته تومور فراهم می‌کند [۵۴]. نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که رهایش داروی دوکسوروبیسین (DOX) از نانوکامپوزیت‌های مختلف در محیط با pH فیزیولوژیک (۷/۴)، رهایش دارو از زئولیت، نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید و نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید در ۳۰ ساعت اولیه به صورت کنترل شده و تدریجی انجام شد (شکل ۱۳-A). با این حال، پس از این مدت، رهایش دارو به صورت ناگهانی افزایش یافت. در مقابل، گرافن اکسید به تنهایی در ساعات اولیه رهایش کنترل شده‌ای نشان داد، اما پس از ۲۰ ساعت با افزایش ناگهانی مواجه شد. جالب توجه اینکه نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید نسبت به گرافن اکسید خالص، رهایش کنترل شده‌تری داشت که می‌تواند ناشی از بارگذاری بیشتر دارو در این نانوکامپوزیت باشد. تداخل بالای زئولیت و نانوکامپوزیت‌های مبتنی بر آن نقش کلیدی در رهایش کنترل شده دارو ایفا می‌کنند، در حالی که گرافن اکسید فاقد این ویژگی است. در محیط شبیه‌ساز بدن (pH=۷/۴، PBS)، رفتار رهایش مشابه آب مقطر بود (شکل ۱۳-B)، با این تفاوت که نانوحامل‌ها (به جز گرافن اکسید) رهایش انفجاری نداشتند و رهایش به صورت کنترل شده ادامه یافت. با کاهش pH به ۵/۵ (مشابه محیط تومورهای سرطانی)، رهایش DOX از تمام نانوحامل‌ها به صورت ناگهانی افزایش یافت (شکل ۱۳-C). این پدیده احتمالاً ناشی از برهمکنش قوی‌تر گروه‌های آمین DOX با پروتون‌های محیط اسیدی است که آزادسازی دارو را تسهیل می‌کند. نتایج نشان می‌دهد که نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید با توجه به رهایش کنترل شده در pH فیزیولوژیک و رهایش سریع‌تر در pH اسیدی، گزینه مناسبی برای انتقال هدفمند دارو به بافت‌های سرطانی است.

نتایج TEM نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید سنتز شده نشان دهنده ذرات کروی و تقریباً توده‌ای شکل مس اکسید با اندازه متوسط ۷۹ نانومتر بود. همچنین لایه‌های متراکم و بر روی هم انباشته شده گرافن اکسید و زئولیت به خوبی بیانگر تشکیل نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید می‌باشد (شکل ۱۰). که نتایج این بخش با نتایج *Alswat* و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت داشت [۴۳]. از نظر الگوی XRD، نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید سنتز شده، ساختار بلوری داشت (شکل ۹). هم چنین تصاویر مربوط به ترکیبات نشان داد که فاز بلوری گرافن اکسید در زاویه ۱۰ درجه و زئولیت با خصوصیات بلوری کاملاً مشخص و با شدت ضعیف شده و فاز بلوری مس اکسید در زاویه ۳۸ درجه به خوبی قابل مشاهده است (شکل‌های ۴، ۶ و ۷). نتایج XRD به دست آمده در این مطالعه، با نتایج مطالعات *Khatamian* و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت دارد [۴۸]. از سویی دیگر نتایج آنالیز XRD نشان‌دهنده آن است که تشکیل نانوکامپوزیت سه‌جزئی (زئولیت/مس اکسید/گرافن اکسید) منجر به کاهش چشم‌گیر اندازه بلورک‌های مس اکسید به محدوده ۳ تا ۱۵ نانومتر و افزایش قابل توجه تنش شبکه‌ای آن‌ها تا ۸/۰۰۰ میکرومتر می‌شود. این تغییرات ریزساختاری قابل توجه در مقایسه با نمونه‌های تک‌جزئی، به‌وضوح حاکی از اثر هم‌افزایی و نقش مهارکنندگی بستر ترکیبی است که از طریق برهمکنش‌های فیزیکی و شیمیایی قوی در سطح مشترک، هم از رشد و تجمع نانوذرات ممانعت می‌کند و هم تنش داخلی شدیدی القا می‌نماید. این بهبود پارامترهای ساختاری (اندازه ریزتر و تنش بالاتر) به‌طور مستقیم ظرفیت بارگذاری دارو و پتانسیل رهایش کنترل شده و هدفمند نانوحامل نهایی را افزایش می‌دهد و عملکرد بهینه آن را در سیستم‌های دارورسانی تأیید می‌کند.

هم چنین نتایج FTIR زئولیت (شکل ۱۱-A) نشان دهنده نوارهای جذبی O-H در 3627 cm^{-1} (مونومری) و 3478 cm^{-1} (پلیمری)، پیوند T-O در 1213 cm^{-1} و سایر ارتعاشات ساختاری مانند طیف 796 cm^{-1} مربوط به T-O-T و طیف‌های $670-1469 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به TO_4 بود. در نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید (شکل ۱۱-B)، نوارهای جذبی 3627 cm^{-1} مربوط به O-H و 467 cm^{-1} مربوط به Cu-O مشاهده شد. طیف گرافن اکسید (شکل ۱۱-C) نوارهای جذبی مربوط به O-H، C=O و C=C/C-O را به ترتیب در نوارهای جذبی (۳۳۹۹، ۱۷۲۳، ۱۰۵۴ و 1618 cm^{-1}) نشان داد. در نهایت بررسی طیف‌های FTIR نانوکامپوزیت زئولیت-مس اکسید/گرافن اکسید (شکل ۱۱-D)، هم‌پوشانی نوارهای جذبی سنتز موفق را تأیید کرد. همچنین، طیف DOX (شکل ۱۱-E و F) نوارهای جذبی مربوط به ترکیبات و پیوندهای شیمیایی O-H، C=O و C-H را در 3435 ، 1638 و 1667 cm^{-1} (به ترتیب) نشان داد که این نتایج بارگذاری دارو در نانوکامپوزیت را نیز تأیید کرد. *Doula* و همکاران (۲۰۰۷)، با بررسی طیف‌های FTIR حاصل از زئولیت سنتزی وجود ارتعاشات نامتقارن پیوند T-O،

و طیف‌های FTIR تشکیل موفقیت‌آمیز نانوکامپوزیت و بارگذاری دارو را تأیید کردند. مطالعات رهایش دارو در شرایط مختلف pH نشان داد که نانوکامپوزیت ژئولیت-مس‌اکسید/گرافن‌اکسید در محیط خنثی ($pH=7/4$) رهایش کنترل شده‌ای از خود نشان می‌دهد، در حالی که در محیط اسیدی ($pH=5/5$) مشابه بافت‌های توموری، رهایش دارو به‌صورت سریع و انفجاری افزایش می‌یابد. این رفتار هوشمندانه می‌تواند ناشی از برهمکنش گروه‌های آمین DOX با پروتون‌های محیط اسیدی و همچنین تخلخل بالای ژئولیت است که امکان رهایش انتخابی دارو را فراهم می‌کند. از جنبه بیولوژیکی، هدف‌گیری انتخابی سلول‌های سرطانی با استفاده از این نانوکامپوزیت‌ها می‌تواند منجر به کاهش عوارض جانبی درمان‌های متداول مانند شیمی‌درمانی شود. بر اساس نتایج حاصل از سمیت سلولی، تمامی نانوحامل‌های فاقد دارو (ژئولیت، CuO/ژئولیت، CuO/GO و ژئولیت/GO) سمیت بسیار ناچیزی روی رده سلولی HS-578T نشان دادند (زنده‌مانی سلولی بالا و $IC_{50} > 100 \mu g/ml$). اما بارگذاری داروی DOX موجب افزایش چشمگیر سمیت در همه نمونه‌ها شد، به‌طوری‌که نانوکامپوزیت CuO/ژئولیت/GO حاوی DOX با کمترین مقدار IC_{50} ($12/37 \mu g/ml$)، بیشترین سمیت و کارایی ضدسرطانی را داشت. این افزایش اثر می‌تواند ناشی از نقش هم‌افزایی گرافن‌اکسید در افزایش رهایش دارو و سمیت ذاتی یون‌های مس باشد. بر اساس نتایج آزمون آپوپتوز، بیشترین درصد سلول‌های واقع در مرحله نکروز سلولی ($30/59$ درصد) در گروه دریافت‌کننده داروی آزاد DOX مشاهده شد. در مقابل، تیمار با نانوکامپوزیت ژئولیت-مس‌اکسید/گرافن‌اکسید حاوی DOX، کمترین نکروز و بالاترین درصد تجمع سلولی در فازهای قبل ($14/20$ درصد) و بعد ($65/17$ درصد) از آپوپتوز را نشان داد. این نتایج حاکی از آن است که سیستم نانوحامل طراحی شده به‌طور مؤثری مسیر مرگ سلولی را از نکروز غیرهدفمند به سمت آپوپتوز برنامه‌ریزی شده سوق می‌دهد، که نشان‌دهنده کاهش سمیت غیراختصاصی و افزایش مکانیسم هدفمند ضدسرطانی است. به‌طور کلی می‌توان ادعا نمود که نانوکامپوزیت ژئولیت-مس‌اکسید/گرافن‌اکسید به‌دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود، پتانسیل بالایی برای استفاده در کاربردهای بالینی دارد و می‌تواند به‌عنوان یک سیستم نوین در درمان هدفمند سرطان مورد توجه قرار گیرد. ادامه تحقیقات در این زمینه می‌تواند به بهینه‌سازی این نانوحامل‌ها و افزایش کارایی آن‌ها در شرایط *in vivo* منجر شود.

این ویژگی می‌تواند منجر به کاهش عوارض جانبی دارو در سلول‌های سالم و افزایش اثربخشی درمانی در سلول‌های سرطانی شود. نتایج حاصل از مطالعات *Khatamian* و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که میزان بارگذاری داروی دوکسوروبیسین در نانوکامپوزیت‌های ژئولیت و Zn-ژئولیت پس از ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه به حدود ۷۰ درصد رسید. همچنین، بررسی رهایش دارو در شرایط مختلف pH نشان داد که در محیط با pH خنثی، حدود ۲۶ درصد و در بافر استات با $pH=4/5$ تقریباً ۶۵ درصد از دارو رهاسازی شد [۴۸]. که با نتایج ما مابقت کامل داشت. اعضای خانواده پروتئین Bcl-2 و کاسپازها برخی از پروتئین‌های کلیدی درگیر در فرآیند آپوپتوز هستند [۵۵]. مقاومت در برابر آپوپتوز یکی از ویژگی‌های اصلی سلول‌های سرطانی است [۵۶]. مطالعات مختلف القای موثر آپوپتوز سلولی را با کپسوله نمودن ترکیبات فعال در سیستم‌های نانوذراتی را نشان دادند. مطالعه‌ای توسط *Rana* و همکاران (۲۰۲۲)، نشان داد که نانوذرات بارگذاری شده با کوئرستین مسیر ذاتی آپوپتوز را به‌طور موثرتری نسبت به کوئرستین آزاد بر روی سلول‌های سرطانی کبد تحریک کرده‌اند [۵۷]. مطالعه دیگری نشان داد که نانوذرات همراه با جمسیتابین و سیس پلاتین سطوح آپوپتوز را نسبت به مولکول‌های منفرد در سرطان مثانه افزایش می‌دهند [۵۸]. که با نتایج به دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

فناوری نانو با ارائه راهکارهای نوین در زمینه دارورسانی هدفمند، تحولی چشمگیر در درمان بیماری‌های پیچیده‌ای مانند سرطان ایجاد کرده است. این مطالعه با تمرکز بر طراحی و سنتز نانوکامپوزیت‌های مبتنی بر ژئولیت، مس‌اکسید و گرافن‌اکسید، به بررسی عملکرد این نانوحامل‌ها در انتقال و رهایش کنترل شده داروی دوکسوروبیسین (DOX) پرداخت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که نانوکامپوزیت ژئولیت-مس‌اکسید/گرافن‌اکسید به‌دلیل ترکیب خواص مطلوب ژئولیت (تخلخل بالا و زیست‌سازگاری) و گرافن‌اکسید (ظرفیت بارگذاری بالا و پاسخگویی به pH)، عملکرد بهینه‌ای در دارورسانی هدفمند دارد. ویژگی‌های ساختاری و شیمیایی این نانوکامپوزیت‌ها با استفاده از روش‌های مختلفی مانند TEM، FESEM، XRD و FTIR تأیید شد. تصاویر FESEM و TEM ریخت‌شناسی متخلخل و لایه‌ای نانوکامپوزیت‌ها را نشان دادند، در حالی که الگوهای XRD

مراجع

- [1] Bourang S., Jahanbakhsh Godehkahriz S., Noruzpour M., Asghari Zakaria R., Granados-Principal S. Anticancer Properties of Copolymer Nanoparticles Loaded with *Foeniculum Vulgare* Derivatives in Hs578T and SUM159 Cancer Cell Lines. *Cancer Nano.*, **16(1)**: 1-28 (2025).

- [2] Mohajeri S., Dashti S., Noruzpour M., Bourang S., Yaghoubi H., [Design and Preparation of PLA-Chitosan-PEG-Glucose Copolymer for Combined Delivery of Paclitaxel and siRNA](#). *Discov Appl Sci.* **7(8)**: 801 (2025).
- [3] Noruzpour M., Zakaria R.A., Zare N., Bourang S., Ebrahimi H.A., Granados-Principal S., [Delivery of *Moringa Oleifera* Extract via PLA-PEG-FA/Chitosan-PLA NPs into Breast Cancer Cell Lines](#). *BioNanoScience.* **15(2)**: 287 (2025).
- [4] 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 Arch Pharmacol.* 1-23 (2025).
- [5] Zhong Y., Peng Z., Peng Y., Li B., Pan Y., Ouyang Q., Sakiyama H., Muddassir M., Liu J., [Construction of Fe-Doped ZIF-8/DOX Nanocomposites for Ferroptosis Strategy in the Treatment of Breast Cancer](#). *J. Mater. Chem. B.* **11(27)**: 6335-45 (2023).
- [6] Bourang S., Noruzpour M., Jahanbakhsh Godekahriz S., Ebrahimi HAC., Amani A., Asghari Zakaria R., Yaghoubi H., [Application of Nanoparticles in Breast Cancer Treatment: A Systematic Review](#). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **397(9)**: 6459-505 (2024).
- [7] Kitakata H., Endo J., Ikura H., Moriyama H., Shirakawa K., Katsumata Y., Sano M., [Therapeutic Targets for DOX-Induced Cardiomyopathy: Role of Apoptosis Vs. Ferroptosis](#). *Int. J. Mol. Sci.* **23(3)**: 1414 (2022).
- [8] Mozar F.S., Meivita M.P., Go S-X., Li L., Bajalovic N., Loke D.K., [Ultra-Efficient MCF-7 cell Ablation and Chemotherapy-Integrated Electrothermal Therapy with DOX-WS2-PEG-M13 Nanostructures](#). *Discov Mater.* **4(1)**: 5 (2024).
- [9] Liu H., Liu Q., Li X., Boucetta A., Eyer J., Spadavecchia J., [Doxorubicin-NFL-TBS. 40-63 Peptide Gold Complex Nanovector \(DOX IN-NFL@ AuNPs\): Efficacy Evaluation in a Mouse Transplantation Tumor Model Induced by PANC-1/ADR Human Pancreatic Cancer Resistant Strain Cells](#). *Nanotheranostics.* **9(2)**: 186 (2025).
- [10] Ahmadi-Nouraldinvand F., Bourang S., Azizi S., Noori M., Noruzpour M., Yaghoubi H., [Preparation and Characterization of Multi-Target Nanoparticles for co-Drug Delivery](#). *Med Drug Discov.* **21**: 100177 (2024).
- [11] Bourang S., Asadian S., Noruzpour M., Mansuryar A., Azizi S., Ebrahimi H.A., Amani Hooshyar V., [PLA-HA/Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Loaded with Curcumin: Physicochemical Characterization and Toxicity Evaluation in HCT116 Colorectal Cancer Cells](#). *Discov Appl Sci.* **6(4)**: 186 (2024).
- [12] Qian F., Jia R., Cheng M., Chaudhary A., Melhi S., Mekkey S.D., Zhu N., Wang C., Razak F., Xu X., [An Overview of Polylactic Acid \(PLA\) Nanocomposites for Sensors](#). *Adv Compos Hybrid Mater.* **7(3)**: 75 (2024).
- [13] Huang J., Zhou J., Liu M., [Interphase in Polymer Nanocomposites](#). *JACS Au.* **2(2)**: 280-91 (2022).
- [14] Ighalo J.O., Sagboye P.A., Umenweke G., Ajala O.J., Omoarukhe F.O., Adeyanju C.A., Ogunniyi S., Adeniyi A.G., [CuO Nanoparticles \(CuO NPs\) for Water Treatment: A Review of Recent Advances](#). *Environ Nanotechnol Monit Manag.* **15**: 100443 (2021).

- [15] Noruzpuor M., Asghari Zakaria R., Zare N., Ebrahimi H.A., Parsa H., Bourang S., [Green Synthesis of Metal Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Moringa Oleifera* L. and Investigating Their Antioxidant and Antibacterial Properties](#). *Appl Chem Today*. **19(71)**: 283-302 (2024).
- [16] Chai Y., Dai W., Wu G., Guan N., Li L., [Confinement in a Zeolite and Zeolite Catalysis](#). *Acc. Chem. Res.* **54(13)**: 2894-904 (2021).
- [17] Kordala N., Wyszowski M., [Zeolite Properties, Methods of Synthesis, and Selected Applications](#). *Molecules*. **29(5)**: 1069 (2024).
- [18] Zhang J., Tang X., Yi H., Yu Q., Zhang Y., Wei J., Yuan Y., [Synthesis, Characterization and Application of Fe-Zeolite: A Review](#). *Appl. Catal. A Gen.* **630**: 118467 (2022).
- [19] Jiříčková A., Jankovský O., Sofer Z., Sedmidubský D., [Synthesis and Applications of Graphene Oxide](#). *Materials*. **15(3)**: 920 (2022).
- [20] Razaq A., Bibi F., Zheng X., Papadakis R., Jafri SHM., Li H., [Review on Graphene-, Graphene Oxide-, Reduced Graphene Oxide-Based Flexible Composites: From Fabrication to Applications](#). *Materials*. **15(3)**: 1012 (2022).
- [21] Ito A.M., Vemula S.L., Gupta M.T., Giram M.V., Kumar S.A., Ghosh B., Biswas S., [Multifunctional Graphene Oxide Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer](#). *J. Control. Release*. **350**: 26-59 (2022).
- [22] Noruzpour M., Asghari Zakaria R., Zare N., Ebrahimi H.A., Parsa H., Bourang S., [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](#). *Iran J Breast Dis*. **17(1)**: 59-83 (2024).
- [23] Xu H., Wu P., [New Progress in Zeolite Synthesis and Catalysis](#). *Natl. Sci. Rev.* **9(9)**: nwac045 (2022).
- [24] Lv G., Wang T., Zou X., Shen J., Wang J., Chen Y., Wang F., Zhang X., [Highly Dispersed Copper Oxide-Loaded Hollow Fe-MFI Zeolite for Enhanced Tetracycline Degradation](#). *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **655**: 130250 (2022).
- [25] Trikkaliotis D.G., Christoforidis A.K., Mitropoulos A.C., Kyzas G.Z., [Graphene Oxide Synthesis, Properties and Characterization Techniques: A Comprehensive Review](#). *ChemEngineering*. **5(3)**: 64 (2021).
- [26] Anege B., Ifijen I.H., Maliki M., Uwidia I.E., Aigbodon A.I., [Graphene Oxide Synthesis and Applications in Emerging Contaminant Removal: A Comprehensive Review](#). *Environ Sci Eur*. **36(1)**: 15 (2024).
- [27] Fatimah S., Ragadhita R., Al Husaeni D.F., Nandiyanto A.B.D., [How to Calculate Crystallite Size from X-Ray Diffraction \(XRD\) Using Scherrer Method](#). *ASEAN J. Sci. Eng.* **2(1)**: 65-76 (2022).
- [28] Amani A., Dustparast M., Noruzpour M., Zakaria R.A., Ebrahimi H.A., [Design and *In vitro* Characterization of Green Synthesized Magnetic Nanoparticles Conjugated with Multitargeted Poly Lactic Acid Copolymers for Co-Delivery of siRNA and Paclitaxel](#). *Eur. J. Pharm. Sci.* **167**: 106007 (2021).

- [29] Bourang S., Jahanbakhsh-Godekahriz S., Asghari-Zakaria R., Parsa-Khankandi H., Noruzpour M., Calahorra J., [Evaluation of Antioxidant Properties of Essential Oil, Aqueous Extract and Metal Nanoparticles Biosynthesized from *F. Vulgare* and Their Anticancer Effect on Two Breast Cancer Cell Lines \(Sum-159, Hs-578T\)](#). *Agric Biotechnol J.* **16(1)**: 235-66 (2024).
- [30] Sangour M.H., Ali I.M., Atwan Z.W., Al Ali A.L.A., [Effect of Ag Nanoparticles on Viability of MCF-7 and Vero Cell Lines and Gene Expression of Apoptotic Genes](#). *Egypt J Med Hum Genet.* **22**: 1-11 (2021).
- [31] Soltani M., Ahmadzadeh N., Nasiraei Haghighi H., Khatamian N., Homayouni Tabrizi M., [Targeted Cancer Therapy Potential of Quercetin-Conjugated with Folic Acid-Modified Nanocrystalline Cellulose Nanoparticles: A Study on AGS and A2780 Cell Lines](#). *BMC biotechnology.* **25(1)**: 29 (2025).
- [32] Xiong X-B., Falamarzian A., Garg S.M., Lavasanifar A., [Engineering of Amphiphilic Block Copolymers for Polymeric Micellar Drug and Gene Delivery](#). *J. Control. Release.* **155(2)**: 248-61 (2011).
- [33] Mansuryar A., Bourang S., Noruzpour M., Ebrahimi H.A., Amani A., Granados-Principal S., Calahorra J., [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 J Pharm Sci.* **33(2)**: 27 (2025).
- [34] Morana O., Wood W., Gregory C.D., [The Apoptosis Paradox in Cancer](#). *Int. J. Mol. Sci.* **23(3)**: 1328 (2022).
- [35] Rai P., Mehrotra S., Priya S., Gnansounou E., Sharma S.K., [Recent Advances in the Sustainable Design and Applications of Biodegradable Polymers](#). *Bioresour. Technol.* **325**: 124739 (2021).
- [36] Abbasi R., Shineh G., Mobaraki M., Doughty S., Tayebi L., [Structural Parameters of Nanoparticles Affecting Their Toxicity for Biomedical Applications: A Review](#). *J Nanopart Res.* **25(3)**: 43 (2023).
- [37] Dastgerdi N.K., Dastgerdi N.K., Bayraktutan H., Costabile G., Atyabi F., Dinarvand R., Longobardi G., Alexander C., Conte C., [Enhancing siRNA Cancer Therapy: Multifaceted Strategies with Lipid and Polymer-Based Carrier Systems](#). *Int. J. Pharm.* 124545 (2024).
- [38] Emami J., Kazemi M., Hasanzadeh F., Minaiyan M., Mirian M., Lavasanifar A., [Novel pH-Triggered Biocompatible Polymeric Micelles Based on Heparin- \$\alpha\$ -Tocopherol Conjugate for Intracellular Delivery of Docetaxel in Breast Cancer](#). *Pharm. Dev. Technol.* **25(4)**: 492-509 (2020).
- [39] Ghaz-Jahanian M.A., Abbaspour-Aghdam F., Anarjan N., Berenjian A., Jafarizadeh-Malmiri H., [Application of Chitosan-Based Nanocarriers in Tumor-Targeted Drug Delivery](#). *Mol. Biotechnol.* 201 (2015).
- [40] Hammami I., Alabdallah N.M., [Gold Nanoparticles: Synthesis Properties and Applications](#). *J. King Saud Univ. Sci.* **33(7)**: 101560 (2021).
- [41] Jain A.K., Thareja S., [In Vitro and in Vivo Characterization of Pharmaceutical Nanocarriers used for Drug Delivery](#). *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **47(1)**: 524-39 (2019).

- [42] Kashani G.K., Naghib S.M., Soleymani S., Mozafari M., [A Review of DNA Nanoparticles-Encapsulated Drug/Gene/Protein for Advanced Controlled Drug Release: Current Status and Future Perspective Over Emerging Therapy Approaches](#). *Int. J. Biol. Macromol.* 131694 (2024).
- [43] Alswat A.A., Ahmad M.B., Saleh T.A., [Preparation and Characterization of Zeolite/Zinc Oxide-Copper Oxide Nanocomposite: Antibacterial Activities](#). *Colloid Interface Sci. Commun.* **16**: 19-24 (2017).
- [44] Hao J., Stavljenic Milasin I., Batu Eken Z., Mravak-Stipetic M., Pavelic K., Ozer F., [Effects of Zeolite as a Drug Delivery System on Cancer Therapy: A Systematic Review](#). *Molecules.* **26(20)**: 6196 (2021).
- [45] Ranković M., Jevremović A., Janošević Ležaić A., Arsenijević A., Rupar J., Dobričić V., Nedić Vasiljević B., Gavrilov N., Bajuk-Bogdanović D., Milojević-Rakić M., [Can Zeolite-Supporting Acridines Boost Their Anticancer Performance? J. Funct. Biomater. **14\(3\)**: 173 \(2023\).](#)
- [46] Liu S., Zeng T.H., Hofmann M., Burcombe E., Wei J., Jiang R., Kong J., Chen Y., [Antibacterial Activity of Graphite, Graphite Oxide, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide: Membrane and Oxidative Stress](#). *ACS nano.* **5(9)**: 6971-80 (2011).
- [47] Zakeri N., Rezaie H.R., Javadpour J., Kharaziha M., [Cisplatin Loaded Polycaprolactone-Zeolite Nanocomposite Scaffolds for Bone Cancer Treatment](#). *J. Sci. Adv. Mater. Dev.* **7(1)**: 100377 (2022).
- [48] Khatamian M., Divband B., Farahmand-Zahed F., [Synthesis and Characterization of Zinc \(II\)-Loaded Zeolite/Graphene Oxide Nanocomposite as a New Drug Carrier](#). *Mater. Sci. Eng. C.* **66**: 251-8 (2016).
- [49] Doula M.K., [Synthesis of a Clinoptilolite-Fe System with High Cu Sorption Capacity](#). *Chemosphere.* **67(4)**: 731-40 (2007).
- [50] Mozgawa W., Król M., Barczyk K., [Badania FT-IR Zeolitów Z Różnych Grup Strukturalnych](#). *Chemik.* **65(7)**: 667-74 (2011).
- [51] Bourang S., Noruzpour M., Azizi S., Yaghoubi H., Ebrahimi H.A., [Synthesis and in Vitro Characterization of PCL-PEG-HA/FeCo Magnetic Nanoparticles Encapsulating Curcumin and 5-FU](#). *Nanomed. J.* **11(2)** (2024).
- [52] Choubdar N., Avizheh S., Karimifard S.A., [Recent Advances in Efficacy of Using Doxorubicin Gold Nanoparticles for Chemo, Radio, Photothermal, and Photodynamic Therapy](#). *Curr. Drug Deliv.* **19(7)**: 745-62 (2022).
- [53] Ke X., Shelton L., Hu Y., Zhu Y., Chow E., Tang H., Santos J.L., Mao H-Q., [Surface-Functionalized PEGylated Nanoparticles Deliver Messenger RNA to Pulmonary Immune Cells](#). *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **12(32)**: 35835-44 (2020).
- [54] Bourang S., Jahanbakhsh-Godekahriz S., Asghari-Zakaria R., Parsa-Khankandi H., Noruzpour M., [Green Synthesis of Iron Oxide, Copper, Zinc Oxide and Silver Nanoparticles from Aqueous Extract of *F. Vulgare* and Evaluation of Their Structural and Antimicrobial Properties](#). *Agric Biotechnol J.* **16(3)**: 61-88 (2024).

- [55] Solano-Gálvez S.G., Abadi-Chiriti J., Gutiérrez-Velez L., Rodríguez-Puente E., Konstat-Korzenny E., Álvarez-Hernández D-A., Franyuti-Kelly G., Gutiérrez-Kobeh L., Vázquez-López R., Apoptosis: [Activation and Inhibition in Health and Disease](#). *Medical Sciences*. **6(3)**: 54 (2018).
- [56] Kaloni D., Diepstraten S.T., Strasser A., Kelly GL., [BCL-2 Protein Family: Attractive Targets for Cancer Therapy](#). *Apoptosis*. **28(1)**: 20-38 (2023).
- [57] Rana N., Privitera G., Kondolf H.C., Bulek K., Lechuga S., De Salvo C., Corridoni D., Antanaviciute A., Maywald R.L., Hurtado A.M., [GSDMB is Increased in IBD and Regulates Epithelial Restitution/Repair Independent of Pyroptosis](#). *Cell*. **185(2)**: 283-98. e17 (2022).
- [58] Mahmood R.I., Kadhim A.A., Ibraheem S., Albukhaty S., Mohammed-Salih H.S., Abbas R.H., Jabir M.S., Mohammed M.K., Nayef U.M., AlMalki F.A., [Biosynthesis of Copper Oxide Nanoparticles Mediated Annona Muricata as Cytotoxic and Apoptosis Inducer Factor in Breast Cancer Cell Lines](#). *Scientific Reports*. **12(1)**: 16165 (2022).