

Effect of iron oxide nanoparticles functionalized with hyaluronic acid on CD44 gene expression and growth of Aspc-1 cell line of pancreatic cancer

Khosro Issazadeh¹, Seyedeh Motahareh Sadatfar², Alireza Habibi^{3*}

1. Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Lahijan Branch, Lahijan, Iran

2. MSc student, Department of Molecular-Cell Biology, Islamic Azad University, Lahijan Branch. Lahijan, Iran

3. Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Science Higher Education Center, Imam Hossein (AS) Officer Training and Guards University, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: Pancreatic cancer is the third leading cause of cancer-related mortality. The utilization of hyaluronic acid in treatment is promising due to its targeted absorption and lack of adverse effects. The objective of this study was to examine the impact of iron oxide and hyaluronic nanoparticles on alterations in *CD44* gene expression within cancer cells.

Materials and Methods: Iron oxide nanoparticles were synthesized using the co-precipitation method and then functionalized with hyaluronic acid in this study. Various confirmatory tests, such as Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Energy Dispersive X-Ray (EDX), Ultraviolet-Visible (UV-visible), and Zeta-potential, were conducted for characterization purposes. The viability of ASPC-1 and HEK-293 cells post-treatment with Fe₃O₄@HA was assessed using the MTT method. Additionally, the expression of the *CD44* gene in both treated and control cells was analyzed through the qRT-PCR technique.

Results: The Fe₃O₄@HA complex exhibited a more potent impact on ASPC-1 cells compared to Fe₃O₄ ($P < 0.05$), while its effect on normal cells was less pronounced ($P > 0.05$). The Selectivity Index (SI) for drug selection was determined to be 1.13. Analysis of qRT-PCR data revealed a 6% decrease in *CD44* expression in treated cells at the IC₅₀ concentration, although this difference was not statistically significant ($P > 0.05$).

Conclusion: In conclusion, the outcomes of this investigation demonstrate that Fe₃O₄@HA possesses effective anti-proliferative characteristics against pancreatic cancer cells and has the ability to lower *CD44* gene expression.

Keywords: Pancreatic Cancer, ASPC-1 cells, *CD44* gene, Fe₃O₄@HA nanoparticles.

*Corresponding Author:

Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Science Higher Education Center, Imam Hossein (AS) Officer Training and Guards University, Tehran, Iran

Emails: alirh110@gmail.com

تأثیر نانوذرات اکسید آهن عامل دار شده با هیالورونیک اسید بر بیان ژن *CD44* و رشد رده سلولی *Aspc-1* سرطان لوزالمعده

مطهره سادات فر^۱، خسرو عیسی زاده^۲، علیرضا حبیبی^{۳*}

۱. گروه زیست شناسی - سلولی مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.

۳. گروه علوم پایه، مرکز آموزش عالی علوم، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: سرطان لوزالمعده رتبه سوم مرگ و میرهای ناشی از سرطان است. هیالورونیک اسید به دلیل جذب اختصاصی و نداشتن عوارض جانبی در درمان می تواند مورد استفاده قرار گیرد. هدف از این پژوهش بررسی تأثیر نانوذرات اکسید آهن و هیالورونیک بر تغییرات بیان ژن *CD44* در سلول های سرطانی بود.

مواد و روش ها: در این پژوهش نانوذرات اکسید آهن به روش هم رسوبی، سنتز و با هیالورونیک اسید سنتز عامل دار شدند. از تست های تأییدی میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، طیف سنجی فرو سرخ تبدیل فوریه (FTIR)، طیف سنجی پراش انرژی پرتوی ایکس (EDX)، طیف سنجی فرابنفش مرئی (UV-visible) و آنالیز پتانسیل زتا (Zeta-potential) برای شناسایی استفاده شد. زنده مانگی سلول های *ASPC-1* و Human Embryonic Kidney 293 Cells (HEK-293) بعد از تیمار با $Fe_3O_4@HA$ به روش MTT بررسی شد. همچنین بیان ژن *CD44* در سلول های تیمار شده و کنترل با تکنیک qRT-PCR تعیین شد.

یافته ها: کمپلکس $Fe_3O_4@HA$ بر روی سلول های *ASPC-1* تأثیر قوی تری نسبت به Fe_3O_4 داشت ($p < 0.05$)، در حالی که اثر آن بر روی سلول های سالم ضعیف تر بود ($p > 0.05$). ضریب انتخاب دارو برابر ۱/۱۳ محاسبه شد. نتایج qRT-PCR نشان داد که بیان *CD44* در سلول های تیمار شده در غلظت IC_{50} ۶، درصد کمتر از سلول های گروه کنترل بود ($p > 0.05$).
نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که $Fe_3O_4@HA$ اثرهای ضد تکثیر مناسبی مقابل سلول های سرطان لوزالمعده دارد و می تواند باعث کاهش بیان ژن *CD44* شود.

واژگان کلیدی: سرطان لوزالمعده، سلول های *ASPC-1*، ژن *CD44*، نانوذرات $Fe_3O_4@HA$

نویسنده مسئول: گروه علوم پایه، مرکز آموزش عالی علوم،
دانشگاه افسری و تربیت پاسداری امام حسین (ع)، تهران، ایران
- پست الکترونیکی:

alirh110@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۱

۱- مقدمه

از بیماران مبتلا به سرطان لوزالمعده بین ۸۰-۸۵ درصد بعد از مرحله متاستاز به مراکز درمانی مراجعه می‌کنند. در بیماران با امکان جراحی نیز، پیش‌آگهی ضعیفی از زنده ماندن متصور است و تنها ۲۰ درصد از آن‌ها پس از جراحی، حداکثر به مدت ۵ سال زنده می‌مانند (۱). سرطان لوزالمعده در ایالات متحده، بعد از سرطان‌های ریه و کلورکتال، در سومین جایگاه کشندگی قرار دارد (۲). پیش‌بینی می‌شود کشندگی این تومور در سراسر اروپا بزودی از سرطان پستان پیشی گیرد (۳). خوشبختانه، علی‌رغم سرعت بالای مرگ‌ومیر ناشی از این بدخیمی در جهان، در ایران سرطان لوزالمعده دوازدهمین سرطان منجر به مرگ است و روند مرگ‌ومیر آن در دهه اخیر اندکی کاهش یافته است (۴). از دیدگاه مولکولی، نوپلازهای درون‌اپیتلیالی سرطان‌های درجه ۱ و ۲ لوزالمعده ناشی از جهش‌های نقطه‌ای انکوژن KRAS^۱ بوده که به‌ویژه در کدون ۱۲، با سیگنال‌دهی پایین‌دستی مسیرهای RAS و PI3K-AKT^۲ مشخص می‌شوند. کوتاه شدن تلومر یک ویژگی مشخص نوپلازای درون‌اپیتلیالی سرطان لوزالمعده درجه ۱ است که احتمالاً سلول‌ها را از طریق بی‌ثباتی کروموزومی مستعد بروز جهش می‌کند. در سرطان لوزالمعده درجه دو ایجاد بدخیمی به غیرفعال شدن دو مهارکننده کیناز وابسته به سایکلین شامل CDKN2A^۳ و پروتئین محصول آن (p16) و CDKN1A و پروتئین آن (p21) مرتبط هست. نشانه‌های نوپلازهای درون‌اپیتلیالی لوزالمعده درجه ۳ و ۴ به‌علت جهش در ژن سرکوبگر تومور TP53 گزارش شده است (۵). مارکرهای مختلفی شناسایی شده‌اند که ارتباط مستقیمی با شیوع سلول‌های بنیادی سرطان لوزالمعده دارند. برخی از این مارکرها شامل CD133، CD24^۴، CD44، DCLK1^۵، CD44^۶، CXCR4^۷، ESA^۸ و Oct4^۹ و ABCB1 هستند. مارکر CD44 یک گیرنده غشایی برای اسید هیالورونیک (HA)، استئوپونین، کندرویتین، کلاژن، فیبرونکتین و پروتئوگلیکان

سرگلیسین/سولفات است. CD44 در فرایندهایی مانند چسبندگی سلولی، رگزایی، آزادسازی سائتوکلین‌ها و ترمیم ماهیچه‌ها نقش دارد. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهند این پروتئین ممکن است نقش مهمی در ایجاد سرطان لوزالمعده داشته باشد. ژن CD44 توسط ۲۰ اگزون گذداری می‌شود. ایزوفرم استاندارد CD44 (CD44s) از اگزون‌های ۱-۵ و ۱۶-۲۰ تشکیل شده است، بنابراین به آن فرم ثابت می‌گویند. ایزوفرم نوع متغیر CD44 (CD44v) متشکل از اگزون‌های میانی است که می‌توان آن‌ها را با ۱۰ اگزون موجود در CD44 به هم متصل و مونتاژ کرد (۶). ثابت شده است که جهش‌های از نوع حذف (Delete mutation) در p53 ممکن است با افزایش بیان CD44 همراه شده و افزایش رشد تومور را منجر شود. در برخی تحقیقات، افزایش بیان CD44v و کاهش بیان CD44s در سرطان لوزالمعده متاستاتیک گزارش شده است. احتمالاً نقش CD44v در تهاجم به دلیل تعامل آن با فاکتور رونویسی انکوژنیک c-Myc است. c-Myc مسیرهای MEK و ERK را فعال می‌کند و به دلیل کاهش سیگنال‌دهی Fas، فعالیت ضدآپوپتوزی را افزایش می‌دهد. اتصال HA-CD44 نیز منجر به تنظیم دگرگونی سایر فاکتورهای رونویسی مانند Nanog، Sox2^{۱۰} و Oct4 می‌شود. این تعامل باعث افزایش بیان miR-302 و miR-21^{۱۱} می‌شود که تشکیل سلول‌های کروی و نیز رشد و خودتجدیدشوندگی سلول‌های سرطانی دارای CD44v را سبب می‌شود (۷). در پژوهش‌های مختلف، از هیالورونیک اسید (HA) به‌عنوان یک ترکیب شیمیایی مؤثر در هدف قرار دادن سلول‌های توموری اشاره شده است. این ماده به دلیل زیست‌سازگاری، تجزیه‌پذیری زیستی و خواص اتصال به گیرنده، به‌طور گسترده به‌عنوان حامل دارویی نیز مورد توجه قرار گرفته است. HA یک پلی‌ساکارید پلی‌آنیونی طبیعی است که به فراوانی در ماتریکس خارج سلولی و مایع سینوویال یافت می‌شود و به‌صورت یک پلیمر خطی است که از واحد دی‌ساکارید تکرارشونده D-گلوکورونیک اسید و N-استیل-D-گلوکزآمین تشکیل شده است. CD44 یکی از گیرنده‌های اولیه است که از طریق برهم‌کنش با مولکول‌های HA مانند تکثیر، تمایز و مهاجرت به‌طور مستقیم در رویدادهای سلولی متنوع درگیر است. CD44 نقش مهمی در فرایندهای متاستاز و تکثیر دارد. ثابت شده است که نانوذرات مبتنی بر HA (HANPs) با قطر ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر می‌توانند از طریق افزایش نفوذپذیری

¹⁰ SRY-Box Transcription Factor 2

¹¹ MicroRNA-302

¹ Kristen Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog

² Phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B-Acutely Transforming Retrovirus

³ Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A

⁴ Cluster Of Differentiation 24

⁵ Doublecortin-Like Kinase 1

⁶ Chemokine Receptor Type 4

⁷ Erythropoiesis-Stimulating Agent

⁸ Octamer-Binding Transcription Factor 4

⁹ ATP-Binding Cassette Subfamily B Member 1

روش اسپکتروفتومتری به ترتیب از دستگاه‌های ریل‌تایم مدل Mic qPCR و نانودراپ مدل NDNM96 استفاده شد.

۲-۲- سنتز و عامل‌دار کردن نانوذرات اکسید آهن

نانوذرات اکسید آهن (Fe_3O_4) از طریق فرایند هم‌رسوبی نمک‌های کلرید Fe (III) و Fe (II) با هیدروکسید آمونیوم که در پژوهش Li و همکاران گزارش شده سنتز شد (۱۱). برای این منظور $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (۱۱/۶۰ گرم) و $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (۴/۳۰ گرم) در ۴۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه و تحت حفاظت گاز نیتروژن و هم‌زدن در دمای 85°C رفلکس شدند. پس از آن، حدود ۲۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید آمونیوم به مخلوط اضافه شد و هم‌زدن تا تشکیل رسوب سیاه ادامه یافت (سه ساعت). سپس رسوب دو بار با اتانول و چندین بار با آب مقطر شسته شد تا pH خنثی به‌دست آید. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 85°C تحت گاز نیتروژن رفلکس شد. نانوذرات مغناطیسی به‌روش مغناطیسی طی سه بار شست‌وشو با آب دیونیزه و الکل از حلال جدا شدند. رسوب به‌دست آمده به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای 40°C قرار گرفت تا کاملاً خشک شد.

برای عامل‌دار کردن نانوذرات اکسید آهن با هیالورونیک اسید از روش هم‌رسوبی کنترل‌شده برابر گزارش Xang (با کمی تغییر) استفاده شد (۱۲). به‌طور خلاصه ۰/۱۶ گرم هیالورونیک اسید در ۳۰ میلی‌لیتر آب دو بار یونیزه حل شد و به مدت نیم ساعت در دمای 80°C استیرر شد تا یک محلول یکنواخت به‌دست آید. از طرف دیگر ۲ گرم $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ و ۰/۷۳۶ گرم $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر داخل یک بالن سده‌دهنه تحت گاز ازت (برای حذف گاز O_2) به مدت یک ساعت با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه استیرر شد. سپس ۳۰ میلی‌لیتر NH_4OH به محلول یکنواخت هیالورونیک اسید اضافه شد و این محلول به مخلوط کلرید آهن‌های II و III اضافه شد و به مدت سه ساعت با شرایط بالا، استیرر و رفلکس شد. رسوب سیاه رنگ به‌صورت مغناطیسی جدا شده و سه بار با آب مقطر شست‌وشو شد. محلول به‌دست‌آمده برای حذف یون‌های آزاد و HA به مدت ۲ روز در برابر آب مقطر با استفاده از کیسه دیالیز سایز ۱۲ دیالیز شد. مخلوط غلیظ نیمه‌جامد در دمای 4°C نگهداری شد. تست‌های FTIR، ZETA، UV visible، SEM و EDX برای تأیید محصول انجام شد.

و ماندگار ^۱EPR به بافت‌های تومور برسند و به‌دنبال آن از طریق اندوسیتوز با واسطه گیرنده به داخل سلول‌های توموری وارد شوند (۸). امروزه استفاده از نانوذرات مختلف برای مبارزه با سرطان‌ها مورد توجه قرار گرفته است. از جمله این نانوذرات که به‌صورت اختصاصی در انتقال دارو و ژن، تصویربرداری زیست‌پزشکی و ایجاد هایپرترمی (کنترل تومور از طریق حرارت) درمقابل سلول‌های سرطانی مورد استفاده قرار گرفته، نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی (Fe_3O_4 NPs) است (۹). در برخی پژوهش‌ها عامل‌دار کردن نانوذرات اکسید آهن با هیالورونیک اسید منجر به مهار رشد سلول‌های سرطانی شده است (۱۰). در این پژوهش تأثیر نانوذرات اکسید آهن عامل‌دار شده با هیالورونیک اسید، بر بیان ژن $CD44$ و مهار رشد رده سلولی Aspc-1 سرطان لوزالمعده مطالعه شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد و تجهیزات

مواد مصرفی برای سنتز نانوذرات اکسید آهن شامل $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck)، $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck)، NH_4OH (SigmaAldrich 25%) و هیالورونیک اسید (1000 KDa/Sigma Aldrich) بود که از شرکت درمان‌کاو رشت خریداری شد. رده سلولی Aspc-1 سرطان لوزالمعده و سلول‌های نرمال HEK از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شد. محیط کشت اختصاصی RPMI-1640 (Sigma Aldrich)، DMEM (Sigma Aldrich)، DMSO (Merck) و کیت استخراج RNA از شرکت کیاژن خریداری شد.

برای انجام تست‌های تأییدی از دستگاه‌های آنالیز اسپکتروسکوپی FTIR (Thermo/USA)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM: AVATAR)، ساخت جمهوری چک (TESCAN/MIRAI II)، FESEM ساخت جمهوری چک، Beckman DU640 UV/Vis، Spectrophotometer ساخت کشور چین و زتا پتانسیل (Horiba/SZ100) ساخت کشور ژاپن، موجود در آزمایشگاه بیم‌گستر تابان استفاده شد. برای به‌دست آوردن جذب نوری در تست MTT از دستگاه الیزا-ریدر مدل MR4+ ساخت آلمان استفاده شد. برای انجام PCR و تعیین کیفیت و کمیت آن با

¹ Enhanced Permeability and Retention

۳-۲- کشت سلولی

کشت سلول‌های Asp-1 و سلول‌های نرمال (HEK-293) که از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران خریداری شدند، به‌روش حاجی قاسمی و همکاران انجام شد (۱۳) ابتدا محلول DMSO به محیط RPMI-1640 اضافه شد و تا زمان استفاده در دمای 20°C نگهداری شد. در ادامه سلول‌های سرطانی و نرمال در محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS)، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین در دمای 37°C و پنج درصد CO_2 کشت داده شدند. سلول‌های نرمال با تراکم 4×10^3 و سلول‌های سرطانی با تراکم 3×10^3 در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای کاشته شدند و سپس با غلظت‌های مختلف DMSO (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۵ درصد) به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. همچنین تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند.

۴-۲- تست زنده‌مانی سلول‌ها (MTT)

برای انجام این تست به‌روش Tullii و همکاران (۱۴) پس از انکوباسیون محیط کشت حاوی سلول‌ها، ابتدا محیط اولیه با ۱۰۰ میکروگرم محیط تازه RPMI-1640 جایگزین شد. برای به‌دست آوردن رنج غلظتی تأثیر دارو از غلظت‌های (۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۲۵) میکروگرم بر میلی‌لیتر Fe_3O_4 و $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{HA}$ بر روی سلول‌ها استفاده شد. سلول‌ها مجدداً به‌مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شده و سپس با محلول PBS شسته شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر، محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و به‌مدت ۵ ساعت در دمای 37°C انکوبه شد. OD نمونه‌ها در ۵۹۰ نانومتر قرائت گردید و درنهایت با CC_{50} و IC_{50} با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism V5 محاسبه شد. در نهایت میزان زنده‌مانی سلول‌ها بر اساس تولید کریستال‌های آبی رنگ فورمازان تحلیل شد.

۲-۵- انجام Quantitative Reverse-Transcriptase PCR (qRT-PCR)

در این تست، به‌روش Lin تغییرهای بیان ژن *CD44* در رده سلولی Asp-1 (4×10^3 سلول) بعد از تیمار با $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{HA}$ (در سه تکرار ۰/۷، ۰/۹۵ و ۱/۰۸ میکروگرم) موردبررسی قرار گرفت (۱۵). پس از تیمار سلول‌های Asp-1

با مواد مورداستفاده، RNA کل براساس پروتکل کیت استخراج RNA شرکت کیاژن استخراج گردید. پس از استخراج RNA، کیفیت و کمیّت آن با روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. سپس از روی RNA استخراج‌شده، cDNA تولید شد (با استفاده از آنزیم ریورس ترانس کریپتاز و پرایمر الگو). برای سنجش میزان بیان ژن‌ها، واکنش Real-Time PCR Quantitative انجام گرفت. مقادیر در حجم ۲۰ میکرولیتر و شامل ۵ میکرولیتر آب دیونیزه، ۱۰ میکرولیتر Taq Man Universal Master Mix، یک میکرولیتر پرایمر ژن مربوطه و ۴ میکرو لیتر cDNA بود. سطح بیان ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن رفرنس استفاده شد. همچنین از پرایمرهای زیر به‌ترتیب برای ژن *CD44* و *GAPDH* استفاده شد:

Forward Primer:

3'-TGCCGCTTTGCAGGTGTATT-5'

Reverse Primer:

3'-CCGATGCTCAGAGCTTTCTCC-5'

Forward Primer:

3'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-5'

Reverse Primer:

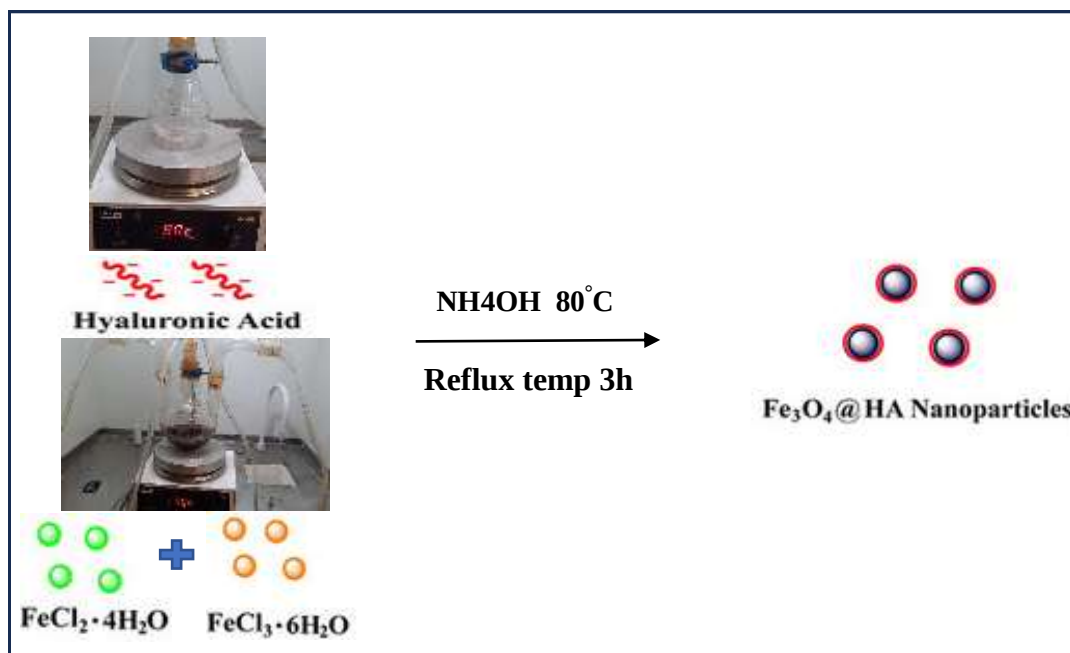
3'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-5'

تجزیه و تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار GraphPad Prism 5 و با آزمون ANOVA به‌صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ در سه تکرار انجام شد و مقدار معنی‌داری با $p < 0/05$ خطا پذیرفته و تحلیل شد.

۳- نتایج

۱-۳- شناسایی نانوذرات مغناطیسی

شمای کلی سنتز و عامل‌دار کردن Fe_3O_4 با هیالورونیک اسید در شکل ۱ نشان داده شده است. ترکیب سنتز شده به‌صورت محلول با غلظت بالا و به رنگ قهوه‌ای سوخته متمایل به سیاه بود. تست‌های تأییدی انجام‌شده نشان داد که روند سنتز به‌طور صحیح انجام شده است. ماده نهایی به‌صورت $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{HA}$ که بیانگر ترکیب نانوذرات اکسید آهن با هیالورونیک اسید بود نام‌گذاری شد.

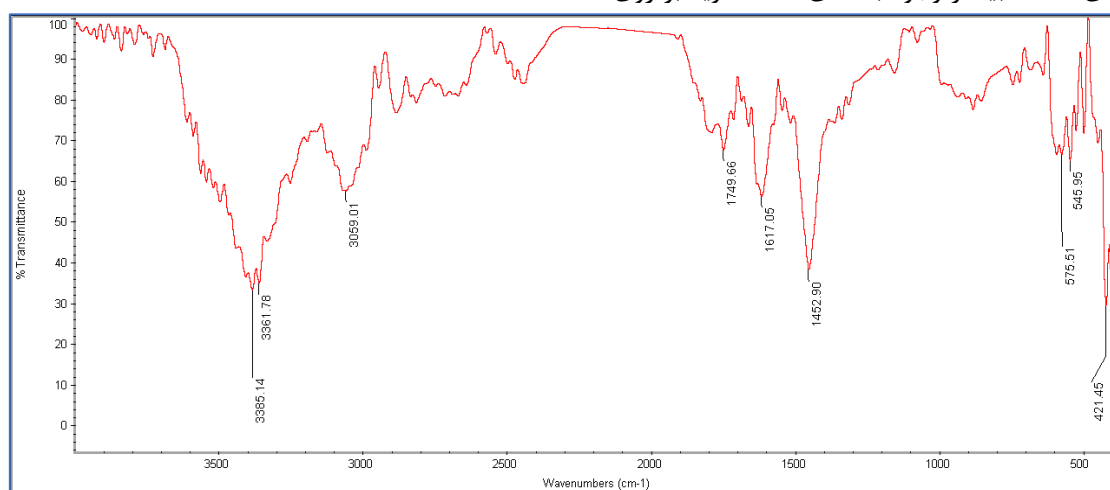


شکل ۱- شمای کلی مراحل سنتز و عامل دار کردن نانوذرات Fe_3O_4 با هیالورونیک اسید

اسید فوق است. همچنین پیک ۱۷۴۹، دلالت بر ارتعاش گروه آنهیدریدی $\text{C}=\text{O}$ بر روی هیالورونیک اسید است. پیک ۱۶۱۷ ارتعاش باند اشباع نشده $\text{C}-\text{C}$ را در این ماده تأیید می کند. پیک ۱۴۵۲ مربوط به گروه آلکانی $\text{C}=\text{H}$ در اسید هیالورونیک اسید است. دو پیک ۴۲۱ و ۵۷۵ نیز بیانگر باند $\text{Fe}-\text{O}$ در نانوذرات Fe_3O_4 هستند.

۲-۳- آنالیز داده های FTIR برای $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{HA}$

در شکل ۲ نتایج تست FTIR برای $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{HA}$ نشان داده شده است. آنالیز اسپکتروسکوپی FTIR در دامنه $400-4000 \text{ cm}^{-1}$ تعیین شد. پیک های ۳۳۸۵ و ۳۳۶۱ دلالت بر ارتعاش متقارن $\text{N}-\text{H}$ اولیه و مربوط به گروه NH_2 بر روی هیالورونیک اسید است. پیک های ۳۰۵۹ بیانگر وجود باندهای $\text{N}-\text{H}$ ثانویه بر روی

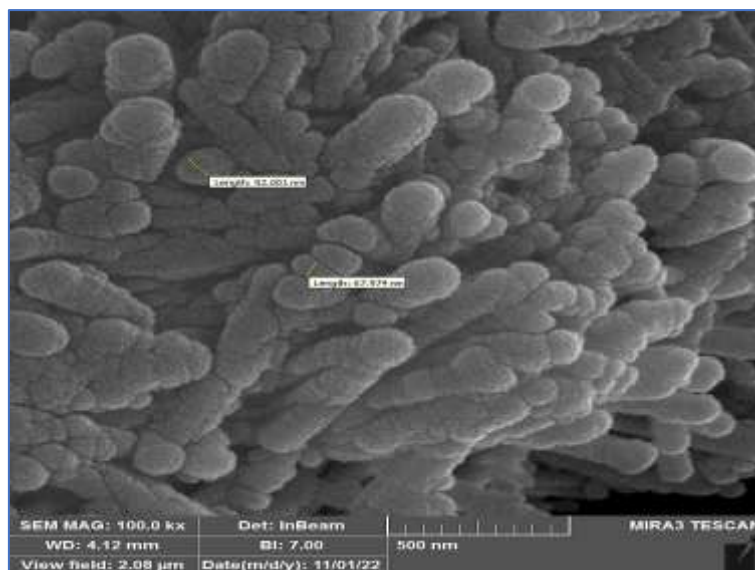


شکل ۲- نتایج تست FTIR برای $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{HA}$

بودن این نانوذره را تأیید نمود (شکل ۳). برطبق نتایج اندازه نانوذرات سنتز شده یکتواخت بودند و به طور میانگین در حدود ۶۷-۹۲ نانومتر اندازه گیری شدند.

۴-۳- آنالیز SEM

مورفولوژی نانوذرات عامل دار شده با هیالورونیک اسید، توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی تعیین شد. تصاویر SEM از نانوذرات سنتز شده $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{HA}$ کرو

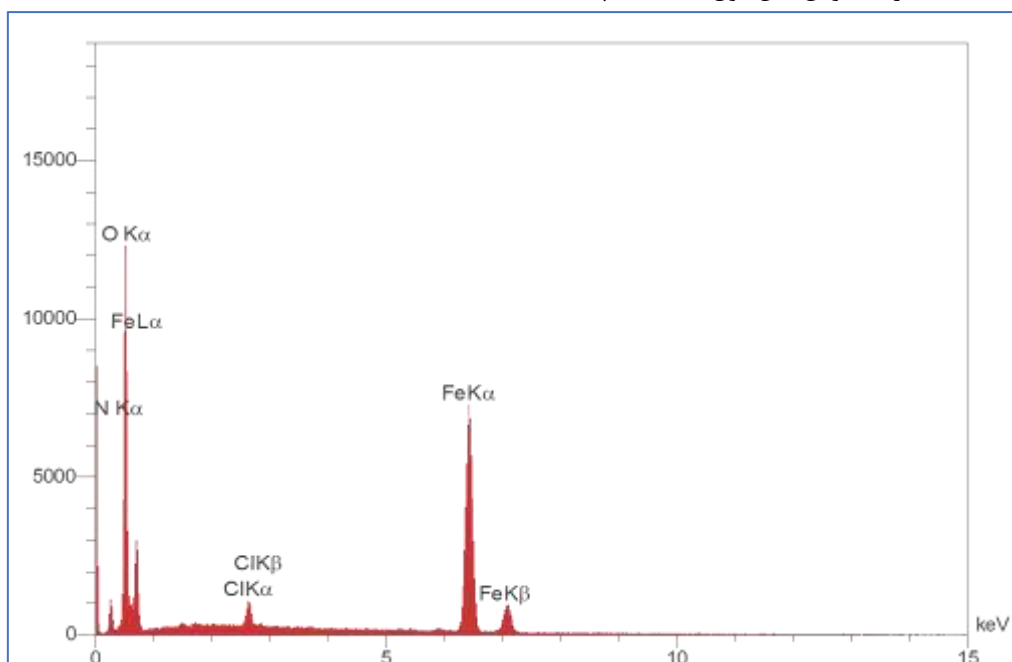


شکل ۳- تصویر SEM مربوط به نانوذرات سنتز شده $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{HA}$

هم Cl که خیلی کوتاه است، بیانگر حداقل ناخالصی در نمونه سنتز شده است. چون برای سنتز از کلرید آهن II و III استفاده شده و بیشتر کلر اضافی صرف سنتز شده و یا طی رفلکس از محیط خارج شده است.

۳-۵- آنالیز EDX

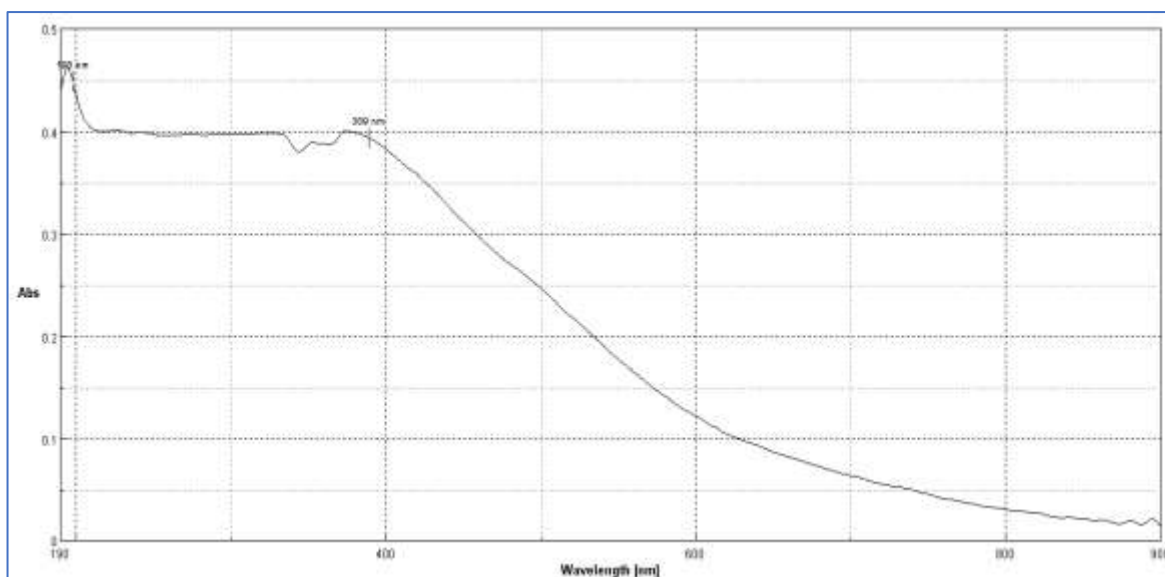
آنالیز EDX در شکل ۴ نشان داده شده است. با توجه به اینکه در فرمولاسیون هیالورونیک اسید $(\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_{11})_n$ و Fe_3O_4 عناصر آهن، اکسیژن و نیتروژن وجود دارند، صحت سنتز با خلوص قابل قبول تأیید شد. پیک



شکل ۴- آنالیز EDX نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Glu/BTSC}$

۳-۶- آنالیز UV-Visible

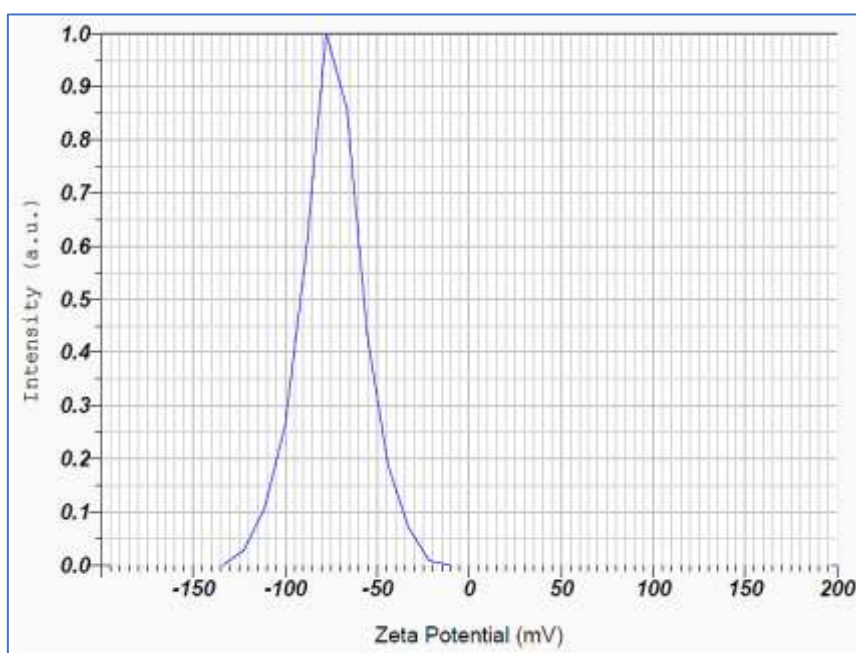
شکل ۵ آنالیز UV-Visible نانوذرات سنتز شده $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{HA}$ را نشان می‌دهد. طیف جذبی نوری نانوذرات اکسید آهن در ۳۸۹ نانومتر مشاهده شد.



شکل ۵- آنالیز UV-Visible نانوذرات سنتز شده $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@HA}$

۳-۷- تست پتانسیل Zeta

نتایج آنالیز پتانسیل زتا در آب دیونیزه برای نانوذرات Fe_3O_4 با پوشش هیالورونیک اسید برابر -74.3 mV بود (شکل ۶).

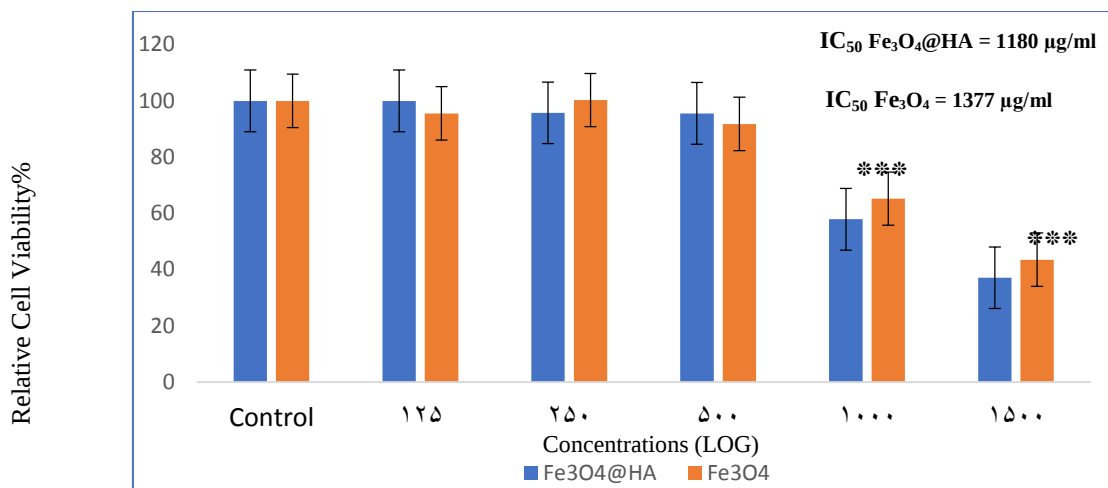


شکل ۶- تست پتانسیل زتای نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@HA}$

۳-۸- نتایج زنده‌مانی سلول (MTT)

با استفاده از تست MTT، سمیت و زنده‌مانی سلول‌های ASP-1 و سلول‌های نرمال (HEK-293) تیمار شده با نانوذرات Fe_3O_4 و $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@HA}$ بررسی شد (شکل ۷ و ۸). همچنین مقادیر IC_{50} و CC_{50} سلول‌های سرطانی و نرمال نیز محاسبه شد. اولین غلظت مؤثر هر دو

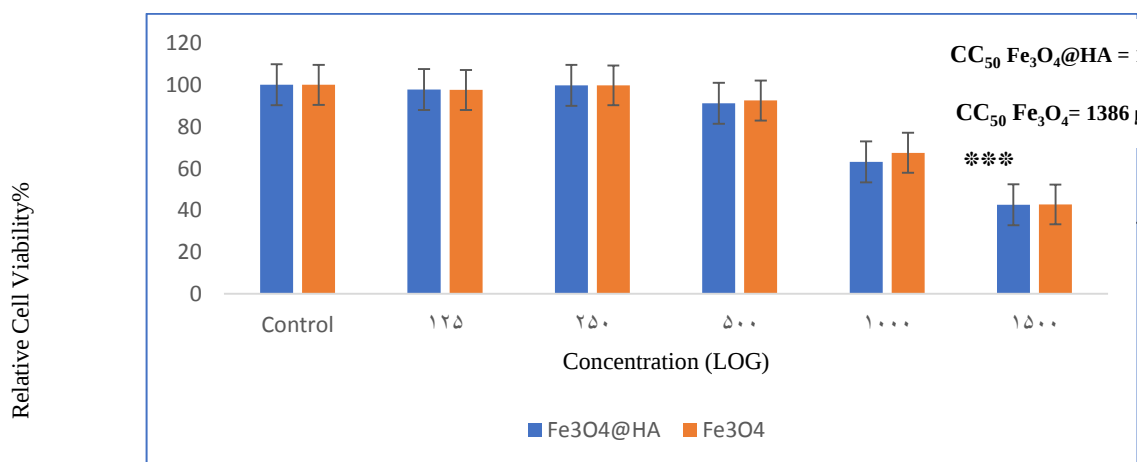
ماده بر روی سلول‌های ASP-1، در $1500 \mu\text{g/mL}$ مشاهده شد. غلظت تأثیرگذار بعدی $1000 \mu\text{g/mL}$ بود. میزان IC_{50} برای Fe_3O_4 و $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@HA}$ به ترتیب برابر 1180 و 1377 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. خروجی تست ANOVA برای نتایج تست MTT بین دو گروه کنترل و تیمار شده $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@HA}$ معنی‌دار بود ($p < 0.05$).



شکل ۷- نتایج تست MTT، تأثیر Fe₃O₄@HA و Fe₃O₄ روی زنده‌مانی رده سلولی Asp-1 (***) بیانگر غلظت مؤثر دارو بر رده سلولی است).

بر میلی‌لیتر برای این ماده، کاهش سمیت آن را بر روی سلول‌های نرمال نسبت به سلول‌های سرطانی تأیید نمود. میزان CC₅₀ نانوذرات Fe₃O₄ بر روی این سلول‌ها ۱۳۸۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

رشد و زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 نسبت به سلول‌های سرطانی، بعد از تیمار با Fe₃O₄@HA بیشتر بود (شکل ۸)، به‌طوری‌که غلظت بالاتری از Fe₃O₄@HA برای مهار رشد این سلول‌ها نیاز بود. CC₅₀ برابر ۱۳۴۴ میکروگرم



شکل (۸) نتایج تست MTT، تأثیر Fe₃O₄@HA و Fe₃O₄ روی زنده‌مانی رده سلولی HEK-293 (***) بیانگر غلظت مؤثر دارو بر رده سلولی است).

برای این رده سلولی بین دو گروه تیمار شده و کنترل معنی‌دار نبود ($p > 0.05$).

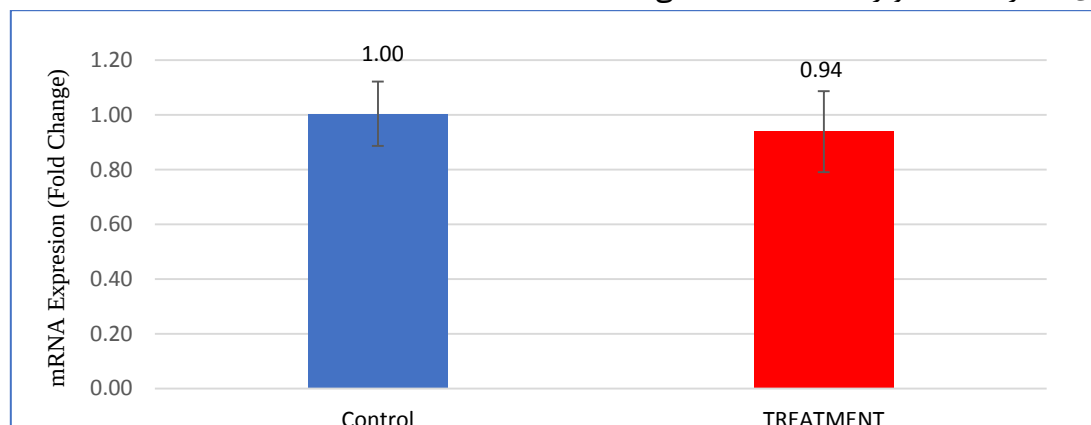
در این پژوهش از تقسیم عدد CC₅₀ بر IC₅₀ میزان شاخص انتخاب (SI^۱) برای Fe₃O₄@HA به‌دست آمد. شاخص انتخاب بزرگتر از یک نشان‌دهنده مؤثر بودن داروی موردنظر است (۱۵). شاخص انتخاب Fe₃O₄@HA برابر با $\frac{1344}{1180}$ یا ۱۳/۱ بود. بنابراین غلظت سمی دارو در سلول‌های سالم نسبت به سلول‌های سرطانی حدود ۱/۱۳ است. نتایج تست ANOVA

¹ Selectivity Index

۳-۹- نتایج qRT-PCR

ساعت در مقایسه با گروه کنترل (سلول‌های تیمارنشده)، ۶ درصد کمتر بود، اگرچه نتایج آزمون ANOVA بین گروه تیمار و کنترل معنی‌دار نبود (شکل ۹).

نتایج تست qRT-PCR درخصوص نانوذرات مغناطیسی $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@HA}$ کاهش بیان ژن $CD44$ را نسبت به گروه کنترل تأیید نمود به‌طوری‌که بیان این ژن در سلول‌های تیمارنشده با نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@HA}$ طی ۲۴



شکل ۹- مقایسه بیان ژن $CD44$ در سلول‌های $Asp-1$ تیمارنشده با نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@HA}$ طی ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه کنترل.

روی هیالورونیک اسید دارد. پیک ۱۶۱۷ ارتعاش باند اشباع‌نشده C-C را در این ماده تأیید می‌کند. پیک ۱۴۵۲ مربوط به گروه آلکانی C=H در اسید هیالورونیک اسید است. دو پیک ۴۲۱ و ۵۷۵ بیانگر باند Fe-O در نانوذرات Fe_3O_4 است.

پیک‌های ۳۳۸۵ و ۳۳۶۱ دلالت بر ارتعاش متقارن N-H اولیه مربوط به گروه NH_2 بر روی هیالورونیک اسید دارد. پیک‌های ۳۰۵۹ بیانگر وجود باندهای N-H ثانویه بر روی اسید فوق است. همچنین پیک ۱۷۴۹، دلالت بر ارتعاش گروه آن‌هیدریدی C=O بر

۴- بحث

مشکلات غیرمعمول در درمان سرطان لوزالمعده مانند دیگر بدخیمی‌ها، زمان طولانی از تحقیقات را به خود اختصاص داده است (۱۶). در سالیان اخیر از بین پروتکل‌های درمانی متعدد در درمان سرطان‌ها به دو روش جراحی و شیمی‌درمانی توجه ویژه شده است (۱۷). این درحالی است که سلول‌های سرطانی با روش‌های مختلف مانند فرار از سیستم ایمنی، مرگ برنامه‌ریزی‌شده، سیستم گردش خون یا عروق لنفاوی، سازگاری با سیستم ایمنی، مقاومت در برابر داروها و متاستاز قادر هستند تا از درمان‌های معمول دارویی و یا جراحی رهایی یافته و این پروتکل‌ها را با شکست مواجه سازند (۱۸). هیالورونیک اسید (HA) که یک گلیکوزآمینوگلیکان غیرسولفات و جزء اصلی ماتریکس خارج‌سلولی است توسط سلول‌های توموری متعدد به‌ویژه سلول‌های شروع‌کننده تومور بیش از حد بیان می‌شود (۱۹). نانوحامل‌های مغناطیسی بر پایه HA به‌دلیل هدف‌گیری فعال سلول‌های تومور، کاهش بیان آنکوژن‌های دخیل در

تومور مانند $CD44$ ، جذب اختصاصی توسط سلول‌های توموری و نداشتن عوارض جانبی خارج از سلول هدف، یک الگوی جدید مؤثر برای درمان سرطان‌ها به‌شمار می‌روند (۲۰). همچنین مطالعه‌های خوبی اما محدودی در مورد اثر کمپلکس‌های فلزی هیالورونیک اسید بر سلول‌های سرطانی انجام شده است. Luo و همکارانش نشان دادند که نانوذرات $\text{HA-Fe}_3\text{O}_4$ از طریق یک مسیر هدف‌گیری با واسطه HA، توسط سلول‌های سرطان لوزالمعده جذب می‌شوند (۲۱). در مطالعه‌ای دیگر که توسط سلیمانی و همکارانش انجام شد، برخی از ویژگی‌ها مانند پایداری کلئیدی مناسب، زیست‌سازگاری، کارایی حرارتی بالا و هدف قرار دادن سلول‌های سرطانی با بیان بیش از حد گیرنده $CD44$ ، از نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@HA}$ یک پلتفرم (زیرساخت) چندمنظوره و امیدوارکننده برای تشخیص و کاربردهای درمانی سرطان لوزالمعده معرفی نموده است (۲۲). افزایش بیان ژن $CD44$ در سرطان لوزالمعده توسط پژوهشگران مختلفی گزارش شده است. در این پژوهش دو هدف اصلی وجود داشت:

هدف اول) مطالعه مهار سلول‌های سرطانی Aspc-1 و نرمال توسط نانوذرات اکسید آهن کونژوگه‌شده با هیالورونیک اسید بود و **هدف دوم)** بررسی میزان بیان ژن *CD44* بعد از تیمار سلول‌ها با این ماده بود. در این پژوهش همان‌طور که در شمای کلی سنتز در شکل ۱ نشان داده شده است، محلول‌های یکنواخت از هیالورونیک اسید و نانوذرات Fe_3O_4 به‌طور هم‌زمان سنتز و کونژوگه شدند. درخصوص پیک‌های به‌دست‌آمده از تست FTIR وجود باندهای ۳۳۶۱ و ۳۳۸۵ که بیانگر ارتعاش متقارن N-H مربوط به گروه NH_2 بر روی هیالورونیک اسید است با داده‌های سلیمانی و همکاران آن مطابقت داشت. این محققان دامنه ارتعاش این گروه‌ها را بر روی هیالورونیک اسید در محدوده ۳۱۰۰ تا ۳۶۰۰ گزارش کرده بودند (۲۲). پیک‌های تأییدی برای گروه‌های O-H، C=O، C-C، C=H در اسید هیالورونیک اسید با آنچه که در سایت LibreTextsExperts درج شده است سازگار بود. در این سایت مقدار ارتعاش برای O-H در محدوده ۲۵۰۰-۳۳۰۰ تعریف شده است که موید پیک ۳۰۵۹ این تحقیق است، ارتعاش ۱۶۱۷ که در محدوده باندهای ۱۶۲۰-۱۶۱۰ قرار دارد، وجود پیوندهای قوی آلکانی C-C را در هیالورونیک اسید تأیید می‌کند. همچنین باند ۱۷۴۹ در محدوده ارتعاشی ۱۷۵۰-۱۷۳۵ قرار دارد و بیانگر پیوندهای قوی بر روی گروه‌های آلدئیدی C=O در مولکول هیالورونیک اسید است. پیک ۱۴۵۲ که در سایت LibreTextsExperts در محدوده ۱۴۶۵-۱۴۵۰ قرار دارد مؤید گروه‌های آلکانی C-C بر روی هیالورونیک اسید است (۲۳). همچنین پیک‌های ۴۲۱ و ۵۷۵ مربوط به باند Fe-O بود که با نتایج Fekri aval و همکاران آن سازگار بود. این محققان برای این باند، ارتعاش ۴۴۰، ۵۸۰ و ۶۲۰ را گزارش کرده بودند (۲۴). آنالیز داده‌های SEM بیانگر یکنواخت بودن اندازه نانوذرات سنتز شده بود و از آنجایی که برای کاربردهای زیست‌پزشکی، نانوذرات اکسید آهن با اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر بهترین کیفیت را دارا می‌باشند (۲۵) اندازه ۶۷-۹۲ نانومتر به‌دست‌آمده در این پژوهش در محدوده مناسبی قرار داشت. مقدار پیک UV-Visible در نقطه ۳۸۹ نانومتر نشان‌دهنده تشکیل نانوذرات اکسید آهن است و با نتایج Abdallah و همکاران که تشکیل نانوذرات کروی را در دامنه ۲۹۰-۵۱۹ نانومتر گزارش نموده بودند مطابقت دارد (۲۶). مقدار پتانسیل زتا در محلول‌های کلوییدی با کاربردهای پزشکی و پایداری مناسب بین ۱۰۰mV+ تا ۱۰۰- است و

برای نانوذرات، بهترین مقدار زتا کوچکتر از ۲۵- و بزرگتر از ۲۵+ است. این مقدار پتانسیل نیروی دافعه الکترواستاتیک لازم بین نانوذرات را تأمین می‌کند و منجر به پایداری آن‌ها می‌شود (۲۷). با توجه به این نکته، مقدار ۷۴/۳ mV- پتانسیل زتا در ترکیب سنتز شده از پایداری مناسبی برخوردار بود. اولین یافته پژوهش، سمیت نانوذرات $Fe_3O_4@HA$ و Fe_3O_4 در غلظت ۱۵۰۰ $\mu g/mL$ بود. نتیجه این پژوهش نشان داد که $Fe_3O_4@HA$ (۱۱۸۰ $\mu g/mL$)، IC_{50} نسبت به Fe_3O_4 (۱۳۷۷ $\mu g/mL$)، IC_{50} فعالیت ضدتکثیری مناسب‌تری در مهار رشد سلول‌های Aspc-1 سرطان لوزالمعده داشت (شکل ۷). با توجه به معنادار بودن آزمون ANOVA برای $Fe_3O_4@HA$ ، افزایش سمیت این ماده و کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی تیمار شده تأیید شد. این یافته با نتایج Luo و همکارانش سازگار بود (۱۱). اثر سیتوتوکسیسیته این ماده بر رشد و زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 در غلظت بالاتری (۱۳۴۴ $\mu g/mL$)، CC_{50} نسبت به سلول‌های سرطانی بود. اگرچه سمیت $Fe_3O_4@HA$ نسبت Fe_3O_4 در سلول‌های نرمال پایین‌تر بود، اما این کاهش معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). این درحالی بود که سمیت $Fe_3O_4@HA$ بر سلول‌های سرطانی نسبت به سمیت Fe_3O_4 بیشتر نتیجه معنی‌دار بود ($p < 0.05$). نتایج این تست نشان می‌دهد که عامل‌دار نمودن نانوذرات اکسید آهن با هیالورونیک اسید به‌طور مؤثرتری نسبت به Fe_3O_4 می‌تواند باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطان لوزالمعده شود. درواقع Fe_3O_4 وقتی با هیالورونیک اسید عامل‌دار می‌شود، سمیت کمتری بر روی سلول‌های نرمال دارد درحالی که برای سلول‌های سرطانی عکس آن اتفاق می‌افتد. این یافته‌ها با نتایج تحقیقات سلیمانی و همکاران (۲۲) و نیز Liang و همکاران (۲۸) که ترکیب این دو ماده را بر روی سلول‌های سرطانی لوسمی خون و MCF سرطان سینه بررسی کرده بودند مطابقت داشت. Yu و همکاران، غیرسمی بودن هیالورونیک اسید را در سلول‌های نرمال نسبت به سلول‌های سرطانی گزارش کرده بودند (۲۹). در یک مقاله مروری نیز که توسط Sudha & Rose منتشر شده غیرسمی بودن هیالورونیک اسید در سلول‌های نرمال مورد تأیید قرار گرفته است (۳۰). شاخص انتخاب ۱/۱۳، مؤثر بودن $Fe_3O_4@HA$ را بر روی سلول‌های سرطانی تأیید می‌کند. از آنجایی که بیان ژن *CD44* در رده سلولی Aspc-1 با افزایش بیان همراه است، این فرضیه که کاهش بیان این ژن در سرطان

لوزالمعده می‌تواند مهار رشد سلول‌های بدخیم را کنترل کند سلول‌های Asp-1 تحت تیمار نانوکمپلکس $\text{Fe}_3\text{O}_4@HA$ قرار گرفتند. نتایج qRT-PCR نشان داد که در سلول‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل (تیمار نشده)، میزان بیان ۶ درصد کاهش یافته اگرچه معنی‌دار نبود. با توجه به IC_{50} این کمپلکس که اثرگذاری آن را در مقابل سلول‌های سرطانی تأیید نمود کاهش بیان ژن $CD44$ را می‌توان به کونژوگه نمودن نانوذرات Fe_3O_4 با هیالورونیک اسید نسبت داد. Desai و همکاران هدف قرار دادن ژن‌های $CD44$ با بیان بالا توسط هیالورونیک اسید را گزارش کرده‌اند (۳۱). مشابه این مطالعه توسط Ortiz و همکاران نیز گزارش شده است (۳۲). با توجه به این داده‌ها و نقش رسانی دارویی نانوذرات اکسید آهن (۲۰ و ۳۳) کاهش بیان این ژن را می‌توان به کمپلکس نانوذرات اکسید آهن و هیالورونیک اسید نسبت داد.

۵- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، هدف اصلی مطالعه نقش مهاری $\text{Fe}_3\text{O}_4@HA$ بر روی رده سلولی ASP-1 سرطان لوزالمعده بود. نتایج نشان دادند که این کمپلکس در مهار رشد سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال مؤثرتر

عمل می‌کند. همچنین کاهش بیان ژن‌های $CD44$ در سلول‌های سرطانی را توسط این نانوکمپلکس می‌توان با مهار رشد این سلول‌ها مرتبط دانست. با توجه به برخی محدودیت‌ها، فرایندهای مهار این کمپلکس بر روی سلول‌های یادشده و نیز بیان سایر ژن‌ها بررسی نشد. بنابراین در پژوهش‌های آتی پیشنهاد می‌شود تا پژوهشگران دیگر نسبت به آن اقدام نمایند.

۶- ملاحظات اخلاقی

ندارد

۷- تشکر و قدردانی

از جناب آقای رضا کاظمی در سنجی به دلیل همکاری در سنتز نانوذرات و کونژوگه نمودن آن‌ها با هیالورونیک اسید تشکر و قدردانی می‌گردد.

۸- تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافی بین نویسندگان وجود ندارد.

۹- منابع

1. Mizrahi JD, Surana R, Valle JW, Shroff RT. Pancreatic cancer. *The Lancet*. 2020;395(10242):2008-20.
2. Miller KD, Fidler-Benaoudia M, Keegan TH, Hipp HS, Jemal A, Siegel RL. Cancer statistics for adolescents and young adults, 2020. *J CA*. 2020;70(6):443-59.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *J CA*. 2018;68(6):394-424.
4. Pourhoseingholi MA, Ashtari S, Hajizadeh N, Fazeli Z, Zali MR. Systematic review of pancreatic cancer epidemiology in Asia-Pacific Region: major patterns in Globacon 2012. *GHBB*. 2017.۲۴۵:(۴)۱۰ ;
5. Guo J, Xie K, S. Z. Molecular Biomarkers of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Their Implications in Early Diagnosis and Therapeutic Intervention of Pancreatic Cancer. *Int J Biol Sci*. 2016;28(12(3)):292-301.
6. Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman JW. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J H&O*. 2018;11:1-23.
7. Gzil A, Zarębska I, Bursiewicz W, Antosik P, Grzanka D, Szyłberg Ł. Markers of pancreatic cancer stem cells and their clinical and therapeutic implications. *J MBR*. 2019;46:6629-45.
8. Rao NV, Yoon HY, Han HS, Ko H, Son S, Lee M, et al. Recent developments in hyaluronic acid-based nanomedicine for targeted cancer treatment. *J EODD*. 2016;13(2):239-52.
9. Li J, He Y, Sun W, Luo Y, Cai H, Pan Y, et al. Hyaluronic acid-modified hydrothermally synthesized iron oxide nanoparticles for targeted tumor MR imaging. *J B*. 2014;35(11):3666-77.
10. Wang Y, Ma S, Liu X, Wei Y ,Xu H, Liang Z, et al. Hyaluronic acid mediated Fe₃O₄ nanocubes reversing the EMT through targeted cancer stem cell. *Colloids and Surfaces. J B*. 2023;222:113071.
11. Zhang W, Zhang Z, Lou S, Chang Z, Wen B, Zhang T. Hyaluronic Acid–Stabilized Fe₃O₄ Nanoparticles for Promoting In Vivo Magnetic Resonance Imaging of Tumors. *J FP*. 2022;13.
12. Li L, Gao F, Jiang W, Wu X, Cai Y, Tang J, Gao X, Gao F. Folic acid-conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for tumor-targeting MR imaging. *J DD*. 2016 Jun 12;23(5):1726-33.
13. Hajighasemi F, Tajic S. Assessment of cytotoxicity of dimethyl sulfoxide in human hematopoietic tumor cell lines. *IJBC*. 2017 Jun 10;9(2):48-53.
14. Tullii G, Giona F, Lodola F, Bonfadini S, Bossio C, Varo S, Desii A, Criante L, Sala C, Pasini M, Verpelli C. High-aspect-ratio semiconducting polymer pillars for 3D cell cultures. *ACSAM&I*. 2019 Jul 29;11(31):28125-37.
15. Lin J-T, Chang T-H, Chang C-S, Wang W-H, Su B-W, Lee K-D, et al. Prognostic value of pretreatment CD44 mRNA in peripheral blood of patients with locally advanced head and neck cancer. *J O*. 2010;46(5):e29-e33.
16. Habibi A, Sadat Shandiz SA, Salehzadeh A, Moradi-Shoeili Z. Novel pyridinecarboxaldehyde thiosemicarbazone conjugated magnetite nanoparticulates (MNPs) promote apoptosis in human lung cancer A549 cells. *JBIC*. 2020;25:13-22.
17. Balachandran VP, Beatty GL, Dougan SK. Broadening the impact of immunotherapy to pancreatic cancer: challenges and opportunities. *J G*. 2019;156(7):2056-72.
18. Pecorino L. Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics: Oxford university press; 2021.
19. Kim JH, Moon MJ, Kim DY, Heo SH, Jeong YY. Hyaluronic acid-based nanomaterials for cancer therapy. *J P*. 2018;10(10):1133.
20. Fang Z, Li X, Xu Z, Du F ,Wang W, Shi R, et al. Hyaluronic acid-modified mesoporous silica-coated superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for targeted drug delivery. *IJN*. 2019:5785-97
21. Luo Y, Li Y, Li J, Fu C, Yu X, Wu L. Hyaluronic acid-mediated multifunctional iron oxide-based MRI nanoprobes for dynamic monitoring of pancreatic cancer. *J RSCA*. 2019;9(19):10486-93.

22. Soleymani M, Velashjerdi M, Shaterabadi Z, Barati A. One-pot preparation of hyaluronic acid-coated iron oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia therapy and targeting CD44-overexpressing cancer cells. J CP. 2020;237:116130.
23. LibreTextsExperts. Infrared Spectroscopy Absorption Table LibreTexts; 2020 [Available from: <https://status.libretexts.org>].
24. Fekri Aval S, Akbarzadeh A, Yamchi MR, Zarghami F, Nejati-Koshki K, Zarghami N. Gene silencing effect of SiRNA-magnetic modified with biodegradable copolymer nanoparticles on hTERT gene expression in lung cancer cell line. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. 2016 Jan 2;44(1):188-93.
25. Xiang H, Ren G, Zhong Y, Yang X, Xu D, Zhang Z, et al. Characterization and synthesis of Fe₃O₄@C nanoparticles by in-situ solid-phase method. J MRE. 2021;8(2):025016.
26. Abdallah RM, Al-Haddad RM, editors. Optical and Morphology Properties of the Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles Prepared by Green Method. J P. :Conference Series; 2021: IOP Publishing.
27. Clogston JD, Patri AK. Zeta potential measurement. Characterization of nanoparticles intended for drug delivery: Springer; 2011. p. 63-70.
28. Liang J, Yang X, Liu D, Cong M, Song Y, Bai S. Lipid/hyaluronic acid-Coated Doxorubicin-Fe₃O₄ as a dual-targeting nanoparticle for enhanced cancer therapy. AAPS PharmSciTech. 2020 Aug;21:1-9.
29. Yu T, Li Y, Gu X, Li Q. Development of a hyaluronic acid-based nanocarrier incorporating doxorubicin and cisplatin as a pH-sensitive and CD44-targeted anti-breast cancer drug delivery system. J FP. 2020;11:532457.
30. Sudha PN, Rose MH. Beneficial effects of hyaluronic acid. J AFNR. 2014;72:137-76.
31. Desai P, Ann D, Wang J, Prabhu S. Pancreatic cancer: Recent advances in nanoformulation-based therapies. J CRTDCS. 2019;36.(۱)
32. Ortíz R, Quiñonero F, García-Pinel B, Fuel M, Mesas C, Cabeza L, et al. Nanomedicine to overcome multidrug resistance mechanisms in colon and pancreatic cancer: recent progress. J C. 2021;13(9):2058.
33. Yew YP, Shameli K, Miyake M, Khairudin NBBA, Mohamad SEB, Naiki T, et al. Green biosynthesis of superparamagnetic magnetite Fe₃O₄ nanoparticles and biomedical applications in targeted anticancer drug delivery system: A review. AJC. 2020;13(1):2287-308.