Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Protein nanoparticles as drug delivery carriers in cancer treatment

Fereshteh Alizadeh
PhD student in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. fereshteh.alizadeh001@yahoo.com

Abstract

Cancer is still one of the deadliest diseases worldwide. Although researchers have studied many of the complex processes that lead to cancer and metastasis and have made good progress in this field, there is still no effective treatment for cancer. One of the biggest challenges in cancer treatment is the release of drugs into the bloodstream and the fact that the effective dose of the drug does not reach the cancerous tissue, causing patients to use a higher dose of the drug and take the drug repeatedly, leading to the development of drug resistance. Therefore, for effective treatment of cancer, drug delivery systems that can deliver the effective dose of the drug to the target tissue and overcome the above limitations must be used. Researchers have enlisted the help of nanoscience and various nanostructures to target and deliver an effective dose of the drug. Meanwhile, protein nanoparticles are one of the nanostructures that can be a good alternative for improving the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of various types of drug molecules, as they are abundant in natural sources, biocompatible, and biodegradable, easily synthesized, potentially non-toxic, and surface modifiable. and be a promising treatment for various types of diseases, including cancer.

Keywords: Cancer, Drug delivery, Nanobiotechnology, Protein Nanoparticles.

بیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۲۴۳۴-۲۵۳۸
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

نانوذرات پروتئینی به‌عنوان حامل‌های دارورسانی در درمان سرطان

فرشته علیزاده
دانشجوی دکتری ریززیست فناوری، گروه ریززیست فناوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
fereshteh.alizadeh001@yahoo.com

چکیده

سرطان همچنان یکی از کشنده‌ترین بیماری‌ها در سراسر جهان محسوب می‌شود و علی‌رغم اینکه محققین، بسیاری از رویدادهای پیچیده‌ای که منجر به بروز سرطان و متاستاز می‌شوند را مورد بررسی قرار داده‌اند و در این زمینه پیشرفت خوبی داشته‌اند، با این حال هنوز درمان موثری برای سرطان وجود ندارد. یکی از چالش‌های اساسی در درمان سرطان، آزاد شدن دارو در جریان خون و نرسیدن دوز موثر دارو به بافت سرطانی است که سبب می‌شود بیماران دوز بالاتری از دارو را استفاده و به طور مکرر دارو مصرف کنند که منجر به ایجاد مقاومت‌های دارویی می‌شود لذا برای درمان موثر سرطان، باید از سیستم‌های دارورسانی استفاده شود که بتوانند دوز موثر دارو را به بافت مدنظر برسانند و بر محدودیت فوق فائق آیند. محققین با قصد انتقال هدفمند دوز موثر دارو از علم نانو و نانوساختارهای متنوع کمک گرفته‌اند. در این میان نانوذرات پروتئینی یکی از نانوساختارهایی محسوب می‌شوند که به دلیل فراوانی در منابع طبیعی، زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، فرآیند سنتز آسان، عدم سمیت بالقوه و امکان اصلاح سطح، می‌توانند جایگزین خوبی برای بهبود خواص فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک انواع مختلف مولکول‌های دارو و درمان امیدوارکننده‌ای برای انواع مختلف بیماری‌ها و از جمله سرطان باشند.

واژه‌های کلیدی: دارورسانی، سرطان، نانوذرات پروتئینی، نانوبیوتکنولوژی.

۱-مقدمه: سرطان یک اصطلاح کلی است که برای تومورها به کار می‌رود. اصطلاحات انکولوژی[1]، آناپلازی[2] و نئوپلاسم[3] ممکن است به‌عنوان جایگزینی برای کلمه سرطان استفاده شوند. همانطور که میدانیم در حالت طبیعی، سلول‌های بدن به طور معمول بازسازی می‌شوند و به طور مداوم می‌میرند لذا تعداد سلول‌ها ثابت می‌ماند اما در سرطان، سلول‌ها در یک اندام یا بافت خاص، شروع به رشد بی نظم و کنترل نشده می‌کنند و اگر این تکثیر بی رویه ادامه یابد، منجر به ایجاد تومور می‌شود (۱). تشخیص و درمان سرطان به‌دلیل شیوع گسترده، میزان بالای مرگ و میر و عود پس از درمان از اهمیت زیادی برخوردار است (۲). از عمده‌ترین روش‌های درمان سرطان می‌توان به رادیودرمانی، شیمی درمانی و جراحی اشاره کرد که درد بسیاری را به بیماران متحمل می‌کنند و علاوه بر آن فراهمی زیستی ضعیف و مقاومت‌های دارویی داروهای ضدسرطان، آزادسازی در جریان خون پیش از رسیدن به بافت هدف، عدم انتخاب پذیری و آسیب به سایر یافت‌ها، ایجاد عوارض جانبی و اثرگذاری اندک از مهم‌ترین نقایص این روش‌ها به شمار می‌روند (۳). محققین برای رفع این محدودیت‌ها از علم نانو و نانوسیستم‌های دارورسانی بهره گرفتند. نانوبیوتکنولوژی علم به‌کارگیری مواد در ابعاد ۱۰۰-۱ نانومتر است و در این بعد، مواد نسبت به حالت بالکشان خواص فیزیکوشیمیایی و زیستی متفاوتی پیدا می‌کنند. یکی از نانوساختارهایی که اخیرا توجه بسیاری را در دارورسانی به خود جلب کرده‌اند، نانوذرات می‌باشند. نانوذرات، مواد صفر بعدی هستند که تمام ابعادشان در مقیاس نانومتری می‌باشد و شکل، اندازه و خواص شیمیایی مشابهی دارند (٤و٥). با توجه به مطالعات انجام شده و مشاهده اثر سمیت برخی از نانوذرات فلزی (٦و٧)، بررسی بر روی نانوذرات پروتئینی به‌دلیل عدم تحریک ایمنی، فراوانی در منابع طبیعی، زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، فرآیند سنتز آسان، عدم سمیت بالقوه و امکان اصلاح سطح پروتئین‌ها مورد توجه است (۸). سیستم‌های دارورسانی مانند نانوذرات پروتئینی به‌دلیل نسبت سطح به حجم بالا می‌توانند دوز موثر دارو را در خود ذخیره کنند و با اندازه کوچکی که دارند از بافت مورد نظر عبور کنند و دارو را به

[1] oncology
[2] anaplasia
[3] neoplasms

صورت هدفمند به بافت برسانند (۵). در این مقاله مروری، ابتدا به تشریح انواع نانوذرات پروتئینی، روش‌های سنتز و مشخصه‌یابی آن‌ها پرداخته می‌شود و در نهایت کاربردشان در دارورسانی به سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۲-انواع نانوذرات پروتئینی

۲-۱. ژلاتین[1]: ژلاتین یک بیوپلیمر طبیعی است که به دلیل کم هزینه بودن، در دسترس بودن آسان، زیست تخریب پذیری و زیست سازگاری و وجود گروه‌های فعال فراوان، گزینه مناسبی جهت سنتز نانوذرات است. ژلاتین ماهیت پلی آمفولیتی دارد زیرا دارای هر دو گروه کاتیونی و آنیونی است. پلی پپتید ژلاتین از آمینواسیدهای تکرار شونده آلانین، گلیسین و پرولین تشکیل شده‌است که مسئول ساختار مارپیچ سه گانه معمولی ژلاتین هستند. ژلاتین پروتئینی است که از هیدرولیز کلاژن به دست می‌آید (۹).

۲-۲. کلاژن[2]: کلاژن نوعی فیبرین است که به طور گسترده در بافت‌های مختلف بدن پخش می‌شود و ۳۰ درصد از انواع پروتئین‌ها را تشکیل می‌دهد. این پروتئین فراوان‌ترین پروتئین در حیوانات است (۱۰). بیش از ۳۰ نوع کلاژن وجود دارد و هر نوع کلاژن شامل سه زنجیره پلی پپتیدی مارپیچ است. علاوه بر این، کلاژن جزء مهمی از ماتریس خارج سلولی است. زیست تخریب پذیری، زیست سازگاری و آنتی ژنیسیتی ضعیف از ویژگی‌های خوب کلاژن محسوب می‌شود. وزن مولکولی کلاژن ۳۰۰ کیلو دالتون است و پس از هیدرولیز برگشت ناپذیر به ژلاتین تبدیل می شود. نانوذرات مبتنی بر کلاژن می توانند سمیت سیستمیک داروها را کاهش و جذب نانوذرات توسط سلول را افزایش دهند (۱۱).

۲-۳. گلیادین[3]: پروتئین تک زنجیره‌ای دارای پیوند دی سولفید درون مولکولی گلوتن است که در گندم وجود دارد و خواص چسبندگی زیستی به موکوس را از خود نشان می‌دهد.از این پروتئین به‌عنوان حامل دارو رسان در مسیرهای دهانی و موضعی استفاده می‌شود. این پروتئین بجز در مواقع حضور در pHهای بسیار شدید، حلالیت پذیری پایینی از خود نشان می‌دهد که

[1] Gelatin
[2] Collagen
[3] Gliadin

آن را برای دارورسانی داروهای لیپوفیلیک مناسب می‌کند. این ترکیب مانند سایر نانوذرات پروتئینی زیست سازگار و زیست تخریب پذیر است و سمیت پایینی دارد. ساختار این پروتئین متشکل از آمینواسیدهای خنثی و چربی دوست است که آمینواسیدهای خنثی اجازه برقراری پیوند هیدروژنی با موکوس را می‌دهند و آمینواسیدهای چربی دوست با میانکنش‌های هیدروفوب به غشای زیستی متصل می‌شوند. از آنجایی‌که این حامل تمایل اتصال خوبی به قسمت بالای دستگاه گوارش دارد، از آن برای دارورسانی آموکسی‌سیلین به معده و درمان هلیکوباکترپیلوری استفاده کرده‌اند (۱۲).

۲-٤. الاستین[1]: الاستین یک پروتئین ماتریکس خارج سلولی کلیدی است که برای خاصیت ارتجاعی و انعطاف پذیری بسیاری از بافت‌های مهره داران از جمله شریان‌های بزرگ، ریه، رباط، تاندون، پوست و غضروف الاستیک حیاتی است. پیوندها در الاستین توسط دو اسیدآمینه چند منظوره به‌نام دسموزین و ایزودموزین ایجاد می‌شود که از ویژگی‌های خاص الاستین وجود دسموزین است که با ٤ گروه خود، زنجیره‌های پروتئینی را به سیستم‌هایی متصل می‌کند که قادر به کشش در همه جهات هستند (۱۳).

۲-۵. زئین[2]: زئین از پروتئین پرولامین تشکیل‌شده است که حاوی اسید آمینه‌های آبگریز پرولین و گلوتامین است. این پروتئین غیرسمی و پایدار است و دارای خاصیت تجزیه پذیری زیستی می‌باشد بنابراین زئین توسط FDA تایید و به عنوان پلیمر ایمن و بی‌خطر، برای کاربردهای انسانی شناخته شد. نانوذرات تشکیل شده از پروتئین‌های زئین برای کپسوله سازی چندین دارو و ترکیبات فعال زیستی مانند کومارین تهیه شده‌است (١٤).

۲-٦. لکتین[3]: لکتین‌ها گروه متنوعی از گلیکوپروتئین‌ها یا پروتئین‌هایی هستند که قادر به اتصال به کربوهیدرات‌ها می‌باشند. آگلوتینین جوانه گندم[4] (WGA) یکی از محبوب‌ترین لکتین‌های گیاهی است که بسیار مورد توجه است. این پروتئین دارای پایداری بالا، سمیت و ایمنی زایی کم، مقاومت در برابر تخریب پروتئولیتیک و همچنین شناسایی خاص و محل

[1] Elastin
[2] Zein
[3] Lectin
[4] Wheat germ agglutinin

اتصال به اجزای گلیکوزیله مخاط روده است و بنابراین می‌تواند جذب فرمولاسیون دارویی خوراکی را بهبود بخشد (۱۵).

۲-۷. پوشش پروتئینی ویروس[1]: قفس‌های پروتئینی ساختارهایی هستند که از ویروس‌ها یا ذرات ویروس مانند به‌دست می‌آیند. اندازه این ذرات اغلب از چند نانومتر تا چند ده نانومتر متغیر است. قفس‌های ویروسی در واقع پوسته یا کپسید ساختاری ویروس‌ها بدون محتوای اسید نوکلئیک آن‌ها هستند. شکل، اندازه و پایداری قفس های ویروس به نوع ویروس بستگی دارد. این قفس‌ها از تعداد محدودی زیر واحد تشکیل شده‌اند که به شکل نانوکره‌های متخلخل تجمع می‌یابند. در این ساختار سه ناحیه متمایز قابل توجه است که عبارتند از سطح داخلی و خارجی قفس و فاصله بین زیر واحدها. هر سه منطقه را می‌توان با روش‌های شیمیایی یا روش‌های مهندسی ژنتیک (با تغییر توالی نوکلئوتیدی زیر واحدها) بدون تغییر ساختار قفس، برای استفاده در کاربردهای تشخیص و درمان پزشکی اصلاح کرد (۱۶).

۲-۸. سویا[2]: یکی از گسترده‌ترین پروتئین‌های گیاهی است. ساختار آن از دو زیرواحد اصلی گلیسنین و بتاکونگلیسنین تشکیل شده‌است که حدود ۷۰٪ پروتئین‌های سویا را تشکیل می‌دهند. این ساختار به پروتئین سویا پایداری نسبی برای نگهداری طولانی مدت و زیست تخریب پذیری می‌بخشد. نانوذرات کبتنی بر سویا در محیط‌های آبی محلول هستند و در دارورسانی دهانی کاربرد بیشتری دارند. نانوذرات این پروتئین به‌عنوان پوشش برای نانوذرات مغناطیسی به کار می‌روند و نقش محافظت و دست ورزی را امکان پذیر می‌سازند (۱۲).

۲-۹. فیبروئین[3]: پروتئین‌های طبیعی ابریشم معمولاً شامل فیبروئین هستند که از پیله‌های کرم ابریشم به‌دست می‌آیند. این پروتئین به دلیل داشتن تاییدیه از سازمان غذا و دارو، کم هزینه بودن و فراوانی از معروف‌ترین پروتئین‌های طبیعی استفاده شده در زیست مواد است. فیبروئین طی استخراج از پروتئین پوشش دهنده سریسین در پیله کرم ابریشم طی تیمار با سدیم کربنات به‌دست می‌آید. نانوذرات کبتنی بر فیبروئین در رسانش داروهای هیدروفوب و هیدروفیل عملکرد خوبی از خود نشان داده‌اند (۱۷).

---

[1] Viral protein cages
[2] Soy
[3] Fibroin

۱۰-۲. سرسین[1]: ابریشم عنکبوت، متفاوت از ابریشم مشتق شده از کرم ابریشم است و دارای پوشش نوسریسین می‌باشد. نانوذرات پروتئینی ابریشم میل بالایی با داروها نشان می‌دهند، آزادسازی کنترل شده دارو (وابسته به pH) را ترویج می‌کنند و می‌توانند به‌راحتی تهیه شوند و به عنوان کاندیدای قوی حاملان دارو برای درمان سرطان، انتخاب شوند. نانوذرات پروتئین ابریشم را می‌توان با داروها یا لیگاندها از طریق پیوند کووالانسی مانند واکنش EDC/NHS یا پیوند غیرکووالانسی مانند جذب فیزیکی و رسوب همزمان اصلاح کرد. از نانوذرات پروتئین ابریشم می‌توان برای محصور کردن داروهای آبگریز استفاده نمود (۱۸).

۱۱-۲. آلبومین: آلبومین پروتئینی کروی متشکل از ۵۸۵ آمینواسید (در مورد آلبومین انسانی) است که می‌توان آن را از منابع مختلفی مانند سفیده تخم مرغ(اوآلبومین)، سرم گاو و سرم انسان به دست آورد. مهم‌ترین وظیفه آلبومین حفظ فشار اسمزی خون است. هنگام دهیدراتاسیون که آلبومین کاهش می‌یابد، خیز یا ادم رخ می‌دهد (۱۹). آلبومین سرم انسانی بیشترین پروتئین پلاسما را تشکیل می‌دهد و مونومری با وزن ٦٦ کیلودالتون است که سه دومین همولوگ هلیکس دارد (I-III) که هریک از دو زیر دومین A و B تشکیل شده‌اند. مولکول آلبومین‌سرم‌گاوی از ۵۸۳ اسید آمینه تشکیل شده است که در یک زنجیره منفرد به ۱۷ باقیمانده سیستین (هشت پیوند دی سولفیدی و یک گروه تیول آزاد) متصل است و دارای جرم مولکولی ٦٦٤۰۰ دالتون می‌باشد. زنجیره آمینواسید از سه حوزه همولوگ با ساختار متمایز (I، II و III) تشکیل شده‌است که توسط پیوندهای دی سولفید به ۹ حلقه تقسیم شده و در یک مولکول قلبی شکل قرار گرفته اند (۲۰). اوآلبومین اصلی‌ترین پروتئین سفیده‌تخم‌مرغ با وزن مولکولی ٤۵ کیلو دالتون و یکی‌از اولین پروتئین‌های جدا شده از سفیده تخم‌مرغ است. به‌عنوان یک فسفوگلیکوپروتئین از ۳۸۵ اسید آمینه تشکیل شده‌است. نیمی از اسیدهای آمینه موجود در اووآلبومین آبگریز و یک سوم آنها باردار هستند. اوآلبومین به طور گسترده‌ای به‌عنوان یک پروتئین استاندارد در مطالعات ایمونولوژیکی و تغذیه‌ای استفاده می‌شود. اوآلبومین پروتئینی با عملکرد ناشناخته است و اگرچه فاقد فعالیت بازدارندگی پروتئاز است، به خانواده سرپین‌ها تعلق دارد و سنتز آن توسط هورمون‌های استروئیدی تنظیم می‌شود (۲۱).

[1] sericin

۱۲-۲. لگومین[1]: لگومین یکی از پروتئین‌های ذخیره‌سازی اصلی دانه‌های سویا (Pisum sativum L) است و از خانواده پروتئین‌های گلوبولین s 11 است. لگومین دارای جرم مولکولی ۳۰۰ تا ٤۰۰ کیلو دالتون است، غنی از اسیدهای آمینه حاوی گوگرد است و از شش زیر واحد تشکیل شده‌است. نانوذرات مشتق شده از لگومین، سطح بالایی دارند و پتانسیل برهمکنش بالایی را با سطوح بیولوژیکی نشان می‌دهند. روش coacervation پرکاربردترین روش از نظر سنتز نانوذرات لگومین بوده‌است. حلالیت لگومین در طول فرآیند coacervation کاهش می‌یابد و باعث جداسازی فاز برای تشکیل نانوذرات می‌شود (۲۲).

۱۳-۲. کراتین[2]: پروتئین ساختاری است که به طور معمول در سلول‌های اپیتلیال یافت شده و باعث اتصال سلول به سلول برای ایجاد یک لایه محافظ می‌شود. ساختار کراتین به شکل آلفاهلیکس چپ گرد بوده که توانایی پیچیدن به دور هم و ایجاد کمپلکس پلیمری را دارد. نانوذرات برپایه کراتین با توانایی هدفگیری به بافت سرطانی و رهایش کنترل شده دارو حامل مناسبی برای داروهای ضد سرطان هستند (۲۳).

۱٤-۲: گلوبولین[3]: گلوبولین‌ها خانواده وسیعی از پروتئین‌های گلوبولار هستند که در آب خالص نامحلول بوده اما در محلول نمکی حل می‌شوند. در پستانداران گلوبولین‌ها را براساس تحرک الکتروفورزی آن‌ها به سه گروه آلفا، بتا و گاما تقسیم بندی می‌کنند. اکثر آلفا و بتاگلوبولین‌ها در توسط کبد تولید می‌شوند در حالی‌که محل تولید گاماگلوبولین‌ها، لنفوسیت‌ها و سلول‌های پلاسمای موجود در بافت‌های لنفوئیدی هستند. گلوبولین‌های معمول مورد استفاده در تهیه ناوذرات به صورت کلی از منابع گیاهی مانند نخود یا دانه سویا تهیه می‌شوند که ویسیلین‌ها از این دسته هستند و پروتئین متعلق دیگر به خانواده گلوبولین‌ها که برای ساخت نانوذرات استفاده می‌شود، بتالاکتوگلوبولین است (۲٤).

۱۵-۲. بتالاکتوگلوبولین[4]: این پروتئین، پروتئین اصلی موجود در آب پنیر در گونه‌های نشخوارکننده است بتالاکتوگلوبولین پروتئینی متشکل از ۱٦۲ آمینواسید با وزن مولکولی ۱۸ کیلودالتون می‌باشد. این پروتئین شامل دو پیوند دی سولفید و یک گروه تیول آزاد

[1] Legumin
[2] Keratin
[3] Globulin
[4] B-lactoglobulin

است.صفحات بتا فرم غالب موجود در ساختار این پروتئین می‌باشند. نانوذرات این پروتئین برای حمل داروهایی مانند کورکومین، ریووفلاوین، کافئین و دوکسوروبسین به کار رفته‌است (۲٤).

۳- روش‌های تهیه نانوذرات پروتئینی

روش های تهیه نانوذرات براساس کاربردهای خاصی که دارند، متفاوت است. برای دست‌یابی به خصوصیات موردنظر، نحوه سنتز نانوذرات بسیار حائز اهمیت می‌باشد. انتخاب روش مناسب برای تهیه نانوذرات به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پلیمر و دارویی که قرار است بارگیری شود، بستگی دارد.

۱-۳. روش جریان نازک[1]: روش جریان نازک معمولاً شامل مایعی است که بین یک بستر جامد و یک سطح آزاد در تماس با سیال دیگری مانند هوا قرار دارد (۲۵). در این حوزه، دو زیرمجموعه مجزا پدید آمده است که یکی شامل میدان‌های الکتریکی است و دیگری نه. روش اول شامل روش‌هایی مانند پاشش الکترونی و الکتروهیدرودینامیکی هم جت است که از اختلاف پتانسیل الکتریکی چندین کیلوولت (۵-۳٤ کیلوولت) استفاده می‌کند. در حالی که روش دوم شامل تکنیک‌هایی مانند خشک کردن نانو اسپری و فناوری NAB است که شامل پتانسیل الکتریکی نمی‌شود (۲٦).

۲-۳. جایگزینی حلال[2]: در این روش، حلال موجود در محلول پروتئینی برای ایجاد تغییر ساختاری در پروتئین و تولید نانوذرات تغییر می‌یابد. این تکنیک شامل سه روش امولسیون سازی[3]، نمک زدایی[4] و نانورسوب[5] می‌شود. امولسیون‌ها از مخلوط‌هایی از دو فاز مایع تشکیل شده‌اند که قادر به مخلوط شدن نیستند اما می‌توان آن‌ها را از طریق اعمال برش مکانیکی ترکیب کرد که معمولاً توسط سورفکتانت‌ها برای جلوگیری از ادغام تثبیت می‌شوند. سورفکتانت‌ها با

---

[1] Thin flow method
[2] Solubility substitution
[3] Emulsification
[4] Salting-out
[5] Nanoprecipitation

عمل به‌عنوان یک مانع بین دو فاز، تشکیل نانوذرات نسبتاً پایدار را در امولسیون ممکن می‌سازند. سورفکتانت‌ها با به حداقل رساندن کشش سطحی بین محلول پروتئین آبی و فاز روغنی، نقش مهمی در تولید نانوذرات پروتئینی دارند (۲۷). در روش نمک زدایی، به‌عنوان مثال پروتئین و داروی مدنظر در یک محلول امولسیفاید حاوی ماده نمکی مانند کلرید منیزیم و تثبیت کننده کلوئیدی مانند هیدروکسی اتیل سلولز حل می‌شوند. سپس امولسیون آب و روغن با افزایش حجم کافی از آب رقیق می‌شوند تا نفوذ حلال را در فاز آبی تشدید کنند و اینگونه نانوذرات پروتئینی تشکیل می‌شوند (۲۸). تکنیک نانو رسوب یا جابجایی حلال بر استفاده از دو حلال قابل امتزاج متکی است، جایی که پروتئین و دارو باید در یک حلال محلول باشند و در حلال دیگر نامحلول باقی بمانند. این فرآیند زمانی آغاز می‌شود که محلول پروتئینی با غیر حلال مواجه می‌شود و باعث تخلیه سریع و نانورسوب می‌شود یعنی حلال حاوی پروتئین در محیط پراکنده پخش می‌شود، رسوب پلیمری رخ می‌دهد و دارو را به دام می‌اندازد (۲۹).

۳-۳. تغییر حلال[1]: حلالیت به چگونگی مخلوط شدن املاح با حلال اشاره دارد. تغییر حلال، خود شامل سه روش خودتجمعی[2]، هم رسوبی[3] و رسوب دهی[4] است که با کنترل و تنظیم حلالیت پروتئین، تشکیل نانوذرات از آن‌ها را القا می‌کنند. در روش خودتجمعی، برهمکنش‌های بین پروتئین‌ها از جمله نیروهای هیدروفوبی، هیدروژنی و.. سبب تشکیل نانوذرات می‌شود (۳۰). در روش هم رسوبی، یک عامل حل زدا مانند الکل یا استون به محلول پروتئین در آب در حین هم زدن اضافه می‌شود که در نتیجه پروتئین حالت پیچ خورده به خود می‌گیرد و کم آب می‌شود. برای افزایش چگالی نانوذرات و محافظت از کواسروات‌ها، می‌توان گروه‌های عامل آمینو پروتئین را توسط عوامل شبکه‌ای مانند گلوتارآلدئید به هم متصل کرد (۳۱). فرآیند رسوب دهی به مدولاسیون حلالیت پروتئین در حلال بستگی دارد که تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند قطبیت حلال، قدرت یونی و حضور الکترولیت‌ها قرار می‌گیرد. در این روش، ورود نمک به محلول پروتئین، جداسازی فاز مایع- مایع را آغاز می‌کند و یک فاز غنی از پلیمر متراکم در پایین و یک محلول شفاف در بالا ایجاد می‌کند. این جداسازی باعث تسهیل

[1] Solubility change
[2] Self-assembly
[3] Desolvation
[4] Coacervation

ایجاد نانوذرات با خواص مطلوب می‌شود (۳۲).

٤- روش‌های مشخصه یابی نانوذرات پروتئینی

اندازه، مورفولوژی، پایداری، تبلور و ترکیب نانوذرات از مهم‌ترین ویژگی‌های کلیدی آن‌ها محسوب می‌شوند که باید مورد ارزیابی قرار بگیرند (۳۳).

۱-٤. اسپکتروسکوپی مرئی-فرابنفش[1]: طیف سنجی اسپکتروسکوپی مرئی-فرابنفش مهم‌ترین تکنیک اسپکتروفتومتری است که بیشترین کاربرد را برای آنالیز انواع نانوذرات دارد. این تکنیک بر اساس اندازه‌گیری برهمکنش پرتوهای الکترومغناطیسی با ماده در طول موج خاص کار می‌کند. دستگاه اسپکتروفتومتر با نورتابی به نمونه‌ها می‌تواند به مشخصه‌یابی آن‌ها کمک کند بدین صورت که برهمکنش نور با ماده (جذب نور، گسیل نور و یا پراش نور) مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد. طول موج‌هایی که این دستگاه می‌تواند ایجاد کند در محدوده مرئی و فرابنفش و در بازه ۳۰۰-۸۰۰ نانومتر است که بسته به نوع نانوذره پروتئینی، می‌توان در یک ناحیه خاص از طول موج پیک پلاسمونیک قوی را مشاهده کرد (۳۳ و ۳٤).

۲-٤. طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه[2]: در آنالیز FTIR، پرتوهای مادون قرمز از نمونه عبور می‌کنند، مقداری از پرتوهای IR توسط نمونه درگیر می شوند و پرتوهای باقی مانده از آن عبور می‌کنند. دستگاه، طیف جذب یا انتقال را به‌عنوان تابعی از طول موج که مشخصه مواد نمونه است، نشان می‌دهد. تجزیه و تحلیل FTIR یک روش مناسب، مقرون به صرفه، ساده و غیر تهاجمی برای تشخیص عملکرد زیست مولکول‌ها است (۳۵).

۳-٤. میکروسکوپ‌های الکترونی: میکروسکوپ‌های الکترونی مختلف ابزار دقیقی برای شناسایی شکل، اندازه، مورفولوژی و توزیع نانوذرات سنتز شده هستند. FE-SEM[3] اطلاعات توپوگرافی را با وضوح فضایی ۳ تا ٦ برابر بهتر از SEM[4] معمولی ارائه می‌دهد و TEM[5] به‌عنوان یکی از پایدارترین تکنیک‌های توپوگرافی شناخته می‌شود که به طور مستقیم هندسه، اندازه دانه و سازماندهی نانوذرات منفرد را با وضوح بالاتر تجزیه و تحلیل می‌کند. تمایز اساسی

[1] UV–Vis Spectrophotometry
[2] Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)
[3] Field Emission Scanning Electron Microscopes
[4] Scanning Electron Microscopy
[5] Transmission Electron Microscopy

بین SEM و TEM ریشه در رویکردهای متمایز آن‌ها برای تشکیل تصویر دارد. SEM این کار را به وسیله جمع آوری الکتروهان‌هایی که با سطح نمونه برخورد کرده‌اند، انجام می‌دهد ولی در TEM تشکیل تصویر به سبب جمع شدن الکترون‌هایی است که از نمونه نازک مدنظر عبور کرده‌اند (۳۳و ۳۵).

٤-٤. پراش اشعه ایکس[1]: ساختارهای اتمی مواد را می توان با XRD آنالیز کرد. بررسی XRD برای شناسایی و تایید اندازه و ساختار نانوذرات کریستالی استفاده می‌شود. شکاف باند نوری و بار سطحی هر نانوذره به ساختار کریستالی آن بستگی دارد و نانوذرات با ساختارهای کریستالی متفاوت رفتار متفاوتی از خود نشان می‌دهند (۳۳و ۳۵).

٥-٤. پراکندگی نور هیدرودینامیکی[2]: یک تکنیک شناخته شده برای اندازه گیری اندازه متوسط و توزیع اندازه ذرات در یک سوسپانسیون است. با پراکندگی نور از ذرات کوچک می‌توان ساختار هندسی و حالت حرکت آن‌ها را اندازه‌گیری کرد. در یک سوسپانسیون، هنگامی‌که مولکول‌های حل شونده با مولکول‌های حلال برخورد می‌کنند، یک حرکت براونی ایجاد می‌شود و در این روش سرعت حرکت براونی اندازه‌گیری می‌شود و از روی آن قطر هیدرودینامیک را محاسبه می‌کنند (٣٦).

٦-٤. طیف سنجی پراکندگی انرژی[3]: این روش می‌تواند ترکیبات عنصری نانوذرات را مشخص نماید اما مشکل این تکنیک این است که از دقت تشخیص پایینی برای نمونه‌های توده برخوردار است بدین معنا که پرتوهای ایکس تنها می‌توانند در عمق نانومتری نفوذ نمایند و قادر به تشخیص عناصر در لایه‌های بیرونی و سطحی نانوذره هستند و نمی‌توان نتیجه حاصل را به لایه‌های درونی تعمیم داد و ممکن است مغایرت عنصری در لایه‌های بیرونی و درونی وجود داشته باشد. باید توجه داشت که طیف‌سنجی پراکنده انرژی به طور کلی یک روش تحلیلی بسیار حساس نیست و برای عناصر با عدد اتمی کم نامناسب است (۳۳و ۳۵).

۷-٤. بار سطحی: پس از تجویز داخل وریدی نانوذرات، سیستم ایمنی به آسانی مواد خارجی را در طی فرآیند گردش خون تشخیص می‌دهد و سپس آن‌ها را از طریق فرآیند

[1] X-ray Diffraction (XRD)
[2] Dynamic Light Scattering (DLS)
[3] Energy dispersive X-ray (EDX)

فاگوسیتوز خارج می‌کند. عوامل متعددی در فرآیند حذف دخیل هستند، مانند بار سطحی، آبگریزی و اندازه نانوذرات. بنابراین، بسیاری از روش‌های مدل‌سازی سطح نانوذرات را مطالعه کرده‌اند. با اندازه گیری بار سطحی، چگالی و آب دوستی سطح، کارایی اصلاح سطح را می توان پیش بینی کرد. یکی از راه‌های رایج برای شناخت بار سطحی، اندازه‌گیری پتانسیل زتا[1] نانوذرات در محلول‌های آبی است. پتانسیل زتا اختلاف پتانسیل الکتریکی نانوذره را گزارش می‌دهد که براساس تحرک الکتروفورتیک محاسبه می‌شود. با استفاده از پتانسیل زتا می‌توان پایداری نانوذره در محلول کلوئیدی را پیش‌بینی کرد. از آنجایی‌که اکثر سیستم‌های کلوئیدی محلول در آب توسط دافعه الکترواستاتیکی تثبیت می‌شوند، هرچه دافعه بین ذرات بیشتر باشد، احتمال نزدیک‌تر شدن آن‌ها به یکدیگر و ایجاد انسجام کمتر است (۱۲).

۵- دارورسانی هوشمند و انواع آن

دارورسانی هوشمند به معنی رساندن غلظت موثر دارو به کمک نانوحامل‌ها به بافت خاصی از بدن است که کمترین عوارض جانبی را ایجاد کند و کارایی و امنیت بالایی داشته باشد. این روش با افزایش خاصیت کینتیکی دارو، افزایش زمان رهایش کنترل شده و رسانش منطقه‌ای دارو باعث افزایش کارایی درمان می‌شود. موفقیت در این روش زمانی حاصل می‌شود که غلظت داروی مصرفی در خون حفظ شود و دارو به فرم فعال و طی نرخ مشخصی به بافت مدنظر برسد و اثرش را اعمال کند. نانوذرات یکی از کلیدهای مهم رفع مشکل دارورسانی هوشمند هستند زیرا می‌توانند دارورسانی هدفمند و کنترل شده را به طور همزمان فراهم کنند بدین معنا که نانوذرات به‌عنوان حامل غلظت موثری از دارو را درون یا در سطح خود ذخیره، آن را از سیستم ایمنی حفظ و سپس به بافت خاصی منتقل و در نهایت در طول بازه زمانی مشخصی رها می‌کنند و سبب بهبود بیماری می‌شوند.

۱-۵. هدفگیری فیزیکی[2]: هدفگیری فیزیکی از طریق نیروهای خارجی مانند میدان مغناطیسی، فراصوت، نور، حرارت و میدان الکتریکی انجام می‌شود که سبب تجمع دارو در محل مدنظر می‌شوند. در این میان استفاده از امواج فراصوت، نور و میدان مغناطیسی کاربردهای گسترده‌ای پیدا کرده‌اند. به‌عنوان مثال برهمکنش دوقطبی‌های مغناطیسی تحت تاثیر یک میدان

[1] Zeta potential
[2] Physical targeting

مغناطیسی خارجی باعث تجمع نانوذرات (طلا، اکسیدآهن و...) در بافت مدنظر می‌شود یا دارورسانی به‌وسیله امواج فراصوت از طریق میکروحباب‌ها سبب رهایش دارو می‌شود (۳۷).

۲-۵. هدفگیری غیرفعال[1]: هدفگیری غیرفعال بر پایه تفاوت در نفوذپذیری عروق خونی بافت‌های سالم و توموری استوار است. در بافت‌های سالم، سلول‌های اپیتلیال دیواره عروق به‌صورت منظم کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند و اجازه عبور به ذرات را نمی‌دهند اما هنگامی‌که بافت توموری می‌شود، سلول‌ها به سرعت رشد و تکثیر پیدا می‌کنند و سیستم عروقی گسترده‌ای با منافذ بزگ‌تر و نفوذپذیرتر را برای تامین اکسیژن موردنیاز شکل می‌دهند. در این حالت چینش سلول‌های اندوتلیال مویرگ در بافت ناسالم و توموری نامنظم است و بافت نفوذپذیری بالایی دارد و سیستم تخلیه لنفاوی در بستر تومور وجود ندارد لذا ذراتی با ابعاد چند صد نانومتر قادرند یه مناطق ملتهب که نفوذپذیری بیشتری دارند، وارد شوند و در آنجا تجمع یابند. این پدیده به اثر افزایش نفوذپذیری و احتباس[2] معروف است. این نوع هدف گیری مستلزم آن است که سیستم‌های دارورسانی دارای گردش طولانی مدت در خون باشند تا به اندازه کافی در بافت توموری تجمع یابند. معمول‌ترین راه برای نگه داشتن حامل‌های دارو به مدت کافی در خون این است که سطح آن‌ها را با پلیمرهای محلول در آب مانند پلی اتیلن گلیکول اصلاح کنیم تا توسط سیستم رتیکولواندوتلیال حذف نشوند. در تحقیقات از لیپوزوم‌های پوشش داده شده با پلی اتیلن گلایکول برای محصور کردن داروی دوکسوروبسین استفاده شده‌است (۳۸).

۳-۵. هدفگیری فعال[3]: هدفگیری فعال براساس مداخله عواملی مانند لیگاند، رسپتور، آنتی‌بادی و یا پپتید است.مثلا برهمکنش‌های لیگاند روی سطح دارو با رسپتور روی سلول‌های هدف می‌تواند آزادسازی دارو در محل مشخص منجر شود. نانوداروها یا نانوذرات می‌توانند تومورها را به طور فعال از طریق میل ترکیبی با گیرنده‌های خاص در سلول‌های تومور یا ریزمحیط تومور (مانند رگ‌های خونی تومور و فیبروبلاست‌ها) مورد هدف قرار دهند (۳۸). در یک مطالعه Lin و همکارانش نانوذرات آلبومین خود مونتاژ شده‌ای را توسعه دادند که دو نوع داروی ضد سرطان آبگریز، پاکلیتاکسل[4] و فنرتینید[1] را در خود محصور می‌کردند. این نانوذرات

[1] Passive targeting
[2] Enhanced permeability and retention effect (EPR)
[3] Active targeting
[4] paclitaxel

کامپوزیتی می‌توانستند گلیومای زیر جلدی را به طور موثر هدف قرار دهند و پپتید نافذ سلولی LMWP (CPP) اصلاح شده بر روی نانوذرات، سبب افزایش برهمکنش بین نانوذرات و سلول‌های سرطانی و تحویل هدفمند در بافت توموری می‌شد (۳۹).

٦- مطالعات مربوط به اتصال دارو به نانوحامل، بارگیری و رهایش دارو

٦-١- مطالعه اتصال دارو به نانوحامل

٦-١-١- مطالعه فلئورسانس: یکی از روش‌های بررسی اتصال دارو به نانوحامل است و داده‌های مربوط به خاموشی نشر فلئورسانس برای بررسی اتصال دارو به نانوحامل مورد استفاده قرار می‌گیرد. آمینواسیدهای تایروزین، تریپتوفان و فنیل آلاینین دارای نشر ذاتی می‌باشند و معادله اشترن-ولمر[2] برای بررسی مکانیسم خاموشی به‌کار می‌رود. کاهش شدت فلئورسانس پروتئین، می‌تواند به علت ایجاد کمپلکس غیرفلئورسانسی صورت بگیرد مثلا دارو می‌تواند به آمینواسیدهایی که مسئول نشر ذاتی در پروتئین هستند متصل شود و از تهییج آن‌ها ممانعت کند. ثابت پایداری این کمپلکس غیرفلئورسانس را که همان ثابت دارو در نظر گرفته می‌شود را می‌توان از رابطه اشترن-ولمر که در زیر قابل مشاهده‌است، مورد محاسبه قرار داد (٤٠).

$$F0/F=1+ Kq _ \tau 0\ [Q] =1+ KSV\ [Q]$$

F0= fluorescence intensity without quencher

F= fluorescence intensity with quencher

[Q]= quencher concentration

KSV= stern-volmer quenching constant

Kq = biomolecular quenching rate constant

τ0= the average lifetime of the biomolecule without a quencher (_0 = 10-8 s)

٦-٢- درصد بارگیری دارو توسط نانوذره: پس از تولید نانوذره، باید میزان بارگیری دارو توسط آن محاسبه شود. دارو به دو صورت روی نانوذرات بارگذاری می‌شود. روش اول ترکیب کردن یا افزودن نانوذرات به دارو هنگام تولید نانوذرات و بارگذاری همزمان آن‌ها است. روش دوم، اتصال یا قرار دادن محلول‌های دارویی غلیظ به نانوذرات، مانند جذب دارو، پس از سنتز نانوذرات است. اثرات بارگذاری دارو بسته به حلالیت دارو، اندازه نانوذرات، مواد رسانه ای و

---

[1] fenretinide

[2] Stern–Volmer

پلیمرها متفاوت است (۱۲). میزان بارگیری دارو را می‌توان از طریق دستگاه اسپکتروسکوپی مرئی–فرابنفش و اندازه‌گیری جذب بررسی و با فرمول زیر محاسبه نمود (٤١).

Entrapment efficiency%= [(Total drug - free drug) ÷ Total drug] × 100

۳-٦- میزان رهایش دارو توسط نانوذره: آزادسازی دارو و زیست تخریب پذیری پروتئین پارامترهای مهم نانوذرات برای تحویل موفق دارو هستند. انتشار دارو تحت تأثیر حلالیت دارو، انتشار دارو از طریق ماتریکس نانوذرات، تجزیه نانوذرات و فرآیندهای تخریب ماتریکس قرار دارد (۱۲). یکی از روش‌های بررسی رهایش دارو استفاده از کیسه دیالیز و خوانش جذب داروی رهایش شده به وسیله دستگاه اسپکتروسکوپی مرئی–فرابنفش است (٤٢).

۷-نانوذرات پروتئینی به‌عنوان حامل‌های دارو

همانطور که میدانیم گلیوبلاستوما از تهاجمی ترین اشکال سرطان محسوب می‌شود و به دلیل حضور سد خونی مغزی، دارورسانی به این بافت دارای محدودیت است. دریک مطالعه، محققین یک نانوذره پروتئینی مصنوعی از آلبومین سرم انسانی پلیمریزه شده سنتز کردند که حاوی پپتید iRGD جهت نفوذ به سلول‌های توموری بود و علاوه بر آن جهت مهار سلول‌های توموری حاوی اسیدنوکلئیک تداخلگر siRNA علیه فاکتور رونویسی STAT3i بود. هنگامیکه تشعشعات یونیزه همراه این نانوذرات در موش‌های مورد مطالعه در شرایط in vitro و in vivo استفاده شدند، نتایج نشان داد که موش‌ها به مدت طولانی‌تری زنده می‌مانند و نانوذرات پروتئینی با مهار ژن رونویسی در سلول‌های توموری سبب مهار تومور می‌شود و سیستم ایمنی موش‌ها را برای ایجاد حافظه ایمنی در برابر سلول‌های توموری تقویت می‌کند (٤٣). اینتگرین در بسیاری از سلول‌های تومور بیش از حد بیان می‌شود. Bari و همکارانش از این خاصیت بهره گرفتند و سیکلوپنتاپپتیدهای اصلاح شده را روی سطح نانوذرات فیبروئین قرار دادند و نتیجه گرفتند که این نانوذرات، میل ترکیبی بالایی با اینتگرین αvβ3 و αvβ5 بیان شده در سلول‌های سرطان مثانه دارند (٤٤). در یک بررسی، اثر نانوذرات آلبومین سرم گاوی حاوی کربوپلاتین را بر رده سلول‌های سرطانی تخمدان انسانی A2780 مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که نانوذرات آلبومین بارگذاری‌شده با کربوپلاتین، اثر ضد سرطانی قوی را روی این رده سلولی نشان می‌دهند (٤٥). در بررسی دیگری، برای افزایش اثرگذاری داروی متوتروکسات، نانوذرات آلبومین سرم گاوی بدون پوشش و با پوشش کیتوزان به همراه متاتروکسات تهیه شدند و اثر

آن‌ها بر روی رده سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 ارزیابی شد. نتایج نشان داد که پوشش کیتوزان سبب بار سطحی مثبت بر روی نانوذرات می‌شود و جذب سلولی را نسبت به نانوذرات بدون پوشش افزایش می‌دهد و ورود نانوذرات به سلول‌های سرطانی را القا می‌کند. علاوه بر آن اثر سمیت و القای آپاپتوز در نانوذرات پوشش داده شده با کیتوزان نسبت به نانوذرات بدون پوشش و متاتروکسات آزاد بیشتر بود (٤٦). در بررسی دیگری نانوذرات ساخته شده از گلیادین گندم به وسیله پلی اکسی اتیلن اولیل اتر تثبیت و سپس به‌عنوان حامل داروی دوکسوروبسین انتخاب شدند. نتایج نشان داد که این نانوسیستم پایداری زیادی در دما (۲۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد) از خود نشان می‌دهد و می‌تواند مقادیر بالایی از دارو را حفظ کند و اجازه انتشار طولانی‌مدت و پایدار آن را تا یک هفته دهد. سنجش زنده‌مانی آزمایشگاهی بر روی سلول‌های سرطان پستان نشان داد که نانوکپسولاسیون دوکسوروبسین، سمیت سلولی ماده فعال زیستی را به‌عنوان تابعی از زمان انکوباسیون با توجه به شکل آزاد دارو تعدیل می‌کند (٤٧).

در مطالعه دیگری برای ترفیع محدودیت حلالیت ضعیف و سمیت داروی ضدسرطان مایتانسین[1] از نانوذره پروتئین زیست سازگار زئین به‌عنوان حامل آن استفاده کردند. اثر نانوذره زئین بارگذاری شده با مایتانسین برروی رده سلول‌های سرطانی A549 ارزیابی شد و نتایج نشان داد که نانوذرات سبب افزایش جذب سلولی می‌شوند و نرخ مهار تومور توسط آن‌ها نسبت به داروی آزاد بیشتر است (٤٨). در مطالعه‌ای نانوذرات کازئین به‌عنوان حامل برای داروی کورکومین استفاده شدند و اثر مهاری آن‌ها برروی رده سلول سرطانی MCF-7 ارزیابی شد و نتایج نشان داد که این نانوذرات دارای سمیت چشمگیری علیه سلول‌های سرطانی هستند (٤٩). در تحقیقی، نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی درون نانوذرات ژلاتین محصور شدند. این نانوذرات برای القای اثر درمانی در سلول‌های سرطانی کولورکتال، حاوی mTOR-siRNA نیز بودند. نتایج ارزیابی اثر مهاری نشان داد که این نانوسیستم به خوبی می‌تواند سلول‌های سرطانی را مهار نماید (۵۰).

بحث و نتیجه‌گیری: امروزه نانوذرات پروتئینی به دلیل ویژگی‌های منحصر بفرد و برتری که نسبت به نانوذرات معدنی دارند، برای درمان سرطان توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند اما

[1] Maytansine

علیرغم مزایای مختلفی که در مورد استفاده از نانوذرات پروتئینی در دارورسانی و مهندسی بافت و... وجود دارد، استفاده از آن‌ها در صنایع دارویی و پزشکی با محدودیت‌هایی مانند عدم تکرارپذیری در تولید محصولات در اشل انبوه، ایمنی زایی و امکان انتقال بیماری مواجه است که باید با بررسی‌های بیشتر در جهت رفع آن‌ها کوشید. به صورت کلی می‌توان گفت نانوذرات پروتئینی از پتانسیل زیادی برای شکل‌دهی به نوآوری‌های زیست‌پزشکی و درمانی آینده برخوردار هستند و می‌توانند راه‌حل‌های کارآمدی را به پزشکان و محققان ارائه دهند اما این مهم جز با تلاش‌های بیشتر و مستمرتر در این حوزه‌ها و شکل‌گیری تیم‌های بین‌رشته‌ای و ترکیب علوم مختلف اعم از شیمی، زیست، فیزیک، مهندسی مواد و نانوپزشکی میسر نخواهد شد.

References:

1-COOPER J. 1 What is Cancer?. Occupational therapy in oncology and palliative care. 2006 May 1:1.

2- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. 2011 Mar;61(2):69-90.

3- Lettieri-Barbato D, Aquilano K. Pushing the limits of cancer therapy: the nutrient game. Frontiers in oncology. 2018 May 8;8:148.

4- Wang Z, Hu T, Liang R, Wei M. Application of zero-dimensional nanomaterials in biosensing. Frontiers in chemistry. 2020 Apr 17;8:320.

5- Paras, Yadav K, Kumar P, Teja DR, Chakraborty S, Chakraborty M, Mohapatra SS, Sahoo A, Chou MM, Liang CT, Hang DR. A review on low-dimensional nanomaterials: nanofabrication, characterization and applications. Nanomaterials. 2022 Dec 29;13(1):160.

6- Sánchez-López E, Gomes D, Esteruelas G, Bonilla L, Lopez-Machado AL, Galindo R, Cano A, Espina M, Ettcheto M, Camins A, Silva AM. Metal-based nanoparticles as antimicrobial agents: an overview. Nanomaterials. 2020 Feb 9;10(2):292.

7- Jamkhande PG, Ghule NW, Bamer AH, Kalaskar MG. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. Journal of drug delivery science and technology. 2019 Oct 1;53:101174.

8- Jain A, Singh SK, Arya SK, Kundu SC, Kapoor S. Protein nanoparticles: promising platforms for drug delivery applications. ACS Biomaterials Science & Engineering. 2018 Nov 2;4(12):3939-61.

9- Yasmin R, Shah M, Khan SA, Ali R. Gelatin nanoparticles: A potential candidate for medical applications. Nanotechnology Reviews. 2017 Apr 1;6(2):191-207.

10- Cardoso VS, de Carvalho Filgueiras M, Dutra YM, Teles RH, de Araújo AR, Primo FL, Mafud AC, Batista LF, Mascarenhas YP, Paino IM, Zucolotto V. Collagen-based silver nanoparticles: Study on cell viability, skin permeation, and swelling inhibition. Materials Science and Engineering: C. 2017 May 1;74:382-8.

11- Sahithi B, Ansari S, Hameeda S, Sahithya G, Prasad D.M, Lakshmi Y. A. review on collagen based drug delivery systems. Indian J. Res. Pharm.Biotechnol. 2013. 1; 461.

12- Hong S, Choi DW, Kim HN, Park CG, Lee W, Park HH. Protein-based nanoparticles as drug delivery systems. Pharmaceutics.

2020 Jul;12(7):604.

13- Mithieux SM, Weiss AS. Elastin. Advances in protein chemistry. 2005 Jan 1;70:437-61.

14- Saindane NS, Pagar KP, Vavia PR. Nanosuspension based in situ gelling nasal spray of carvedilol: development, in vitro and in vivo characterization. Aaps Pharmscitech. 2013 Mar;14:189-99.

15- Mukherjee S, Dasari M, Priyamvada S, Kotcherlakota R, Bollu VS, Patra CR. A green chemistry approach for the synthesis of gold nanoconjugates that induce the inhibition of cancer cell proliferation through induction of oxidative stress and their in vivo toxicity study. Journal of Materials Chemistry B. 2015;3(18):3820-30.

16- Puzyn T, Rasulev B, Gajewicz A, Hu X, Dasari TP, Michalkova A, Hwang HM, Toropov A, Leszczynska D, Leszczynski J. Using nano-QSAR to predict the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles. Nature nanotechnology. 2011 Mar;6(3):175-8.

17- Pham DT, Tiyaboonchai W. Fibroin nanoparticles: A promising drug delivery system. Drug delivery. 2020 Jan 1;27(1):431-48.

18- Seo SJ, Das G, Shin HS, Patra JK. Silk sericin protein materials: characteristics and applications in food-sector industries. International Journal of Molecular Sciences. 2023 Mar 3;24(5):4951.

19- Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. FEBS letters. 2008 Jun 11;582(13):1783-7.

20- Wani TA, Bakheit AH, Al-Majed AR, Bhat MA, Zargar S. Study of the interactions of bovine serum albumin with the new anti-inflammatory agent 4-(1, 3-Dioxo-1, 3-dihydro-2 H-isoindol-2-yl)-N′-[(4-ethoxy-phenyl) methylidene] benzohydrazide using a multi-spectroscopic approach and molecular docking. Molecules. 2017 Jul 27;22(8):1258.

21- Huntington JA, Stein PE. Structure and properties of ovalbumin. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 2001 May 25;756(1-2):189-98.

22- Cho YoungHee CY, Jones OG. Assembled protein nanoparticles in food or nutrition applications.

23- Bragulla HH, Homberger DG. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. Journal of anatomy. 2009 Apr;214(4):516-59.

24- Martínez-López AL, Pangua C, Reboredo C, Campión R,

Morales-Gracia J, Irache JM. Protein-based nanoparticles for drug delivery purposes. International journal of pharmaceutics. 2020 May 15;581:119289.

25-Aljohani MA, Jimack PK, Walkley MA. A faster optimal solver for thin film flows. Applied Numerical Mathematics. 2023 Feb 1;184:357-70.

26-Peltonen L, Valo H, Kolakovic R, Laaksonen T, Hirvonen J. Electrospraying, spray drying and related techniques for production and formulation of drug nanoparticles. Expert opinion on drug delivery. 2010 Jun 1;7(6):705-19.

27-Ravera F, Dziza K, Santini E, Cristofolini L, Liggieri L. Emulsification and emulsion stability: The role of the interfacial properties. Advances in Colloid and Interface Science. 2021 Feb 1;288:102344.

28-Karuppusamy C, Venkatesan P. Role of nanoparticles in drug delivery system: a comprehensive review. Journal of Pharmaceutical sciences and Research. 2017 Mar 1;9(3):318.

29-Fessi HP, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. International journal of pharmaceutics. 1989 Oct 1;55(1):R1-4.

30-Tarhini M, Greige-Gerges H, Elaissari A. Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. International journal of pharmaceutics. 2017 Apr 30;522(1-2):172-97.

31-Weber C, Coester C, Kreuter J, Langer K. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. International journal of pharmaceutics. 2000 Jan 20;194(1):91-102.

32-Yan C, Zhang W. Coacervation processes. InMicroencapsulation in the food industry 2014 Jan 1 (pp. 125-137). Academic Press.

33-Azizi ZL, Daneshjou S. Bacterial nano-factories as a tool for the biosynthesis of TiO2 nanoparticles: Characterization and potential application in wastewater treatment. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2024 Jan 4:1-25.

34-Penner MH. Basic principles of spectroscopy. Food analysis. 2017:79-88.

35- Vijayaram S, Razafindralambo H, Sun YZ, Vasantharaj S, Ghafarifarsani H, Hoseinifar SH, Raeeszadeh M. Applications of green synthesized metal nanoparticles—a review. Biological Trace Element

Research. 2024 Jan;202(1):360-86.

36-Goldburg WI. Dynamic light scattering. American Journal of Physics. 1999 Dec 1;67(12):1152-60.

37- Attia M.F, Anton N, Wallyn J, Omran Z, Vandamme T.F. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. J Pharm Pharmacol. 2019. 71(8), 1185-1198. doi:10.1111/jphp.13098

38- Torchilin VP. Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. Handb Exp Pharmacol. 2010;(197):3-53. doi: 10.1007/978-3-642-00477-3_1. PMID: 20217525.

39- Lin T, Zhao P, Jiang Y, Tang Y, Jin H, Pan Z, Huang Y. Blood–brain-barrier-penetrating albumin nanoparticles for biomimetic drug delivery via albumin-binding protein pathways for antiglioma therapy. ACS nano. 2016 10(11), 9999-10012.

40-Lunardi C. N, Bonilha J. B. S, Tedesco A .C. Stern–Volmer quenching and binding constants of 10-alkyl-9(10H)-acridone probes in SDS and BSA. Journal of Luminescence. 2002. 99(1), 61-71. doi:https://doi.org/10.1016/S0022-

2313(02)00227-2

41- Giridhar Reddy S, Thakur A. Drug Entrapment Efficiency of Silver Nanocomposite Hydrogel. IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 2019. 577012176

42- Omolo CA, Hassan D, Devnarain N, Jaglal Y, Mocktar C, Kalhapure RS, Jadhav M, Govender T. Formulation of pH responsive multilamellar vesicles for targeted delivery of hydrophilic antibiotics. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2021 Nov 1;207:112043.

43- Gregory JV, Kadiyala P, Doherty R, Cadena M, Habeel S, Ruoslahti E, Lowenstein PR, Castro MG, Lahann J. Systemic brain tumor delivery of synthetic protein nanoparticles for glioblastoma therapy. Nature communications. 2020 Nov 10;11(1):5687.

44- Bari E, Serra M, Paolillo M, Bernardi E, Tengattini S, Piccinini F, Lanni C, Sorlini M, Bisbano G, Calleri E, Torre ML. Silk fibroin nanoparticle functionalization with Arg-Gly-Asp cyclopentapeptide promotes active targeting for tumor site-specific delivery. Cancers. 2021 Mar 9;13(5):1185.

45- Esim O, Gedik ME, Dogan AL, Gunaydin G, Hascicek C. Development of carboplatin loaded bovine serum albumin nanoparticles and evaluation of its effect on an ovarian cancer cell line. Journal of

Drug Delivery Science and Technology. 2021 Aug 1;64:102655.

46- Esim O, Oztuna A, Sarper M, Hascicek C. Chitosan-coated bovine serum albumin nanocarriers mediate efficient delivery of methotrexate in breast cancer therapeutics. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2022 Nov 1;77:103906.

47- Voci S, Gagliardi A, Ambrosio N, Salvatici MC, Fresta M, Cosco D. Gliadin nanoparticles containing doxorubicin hydrochloride: characterization and cytotoxicity. Pharmaceutics. 2023 Jan 4;15(1):180.

48- Yu X, Wu H, Hu H, Dong Z, Dang Y, Qi Q, Wang Y, Du S, Lu Y. Zein nanoparticles as nontoxic delivery system for maytansine in the treatment of non-small cell lung cancer. Drug delivery. 2020 Jan 1;27(1):100-9.

49- Barick KC, Tripathi A, Dutta B, Shelar SB, Hassan PA. Curcumin encapsulated casein nanoparticles: Enhanced bioavailability and anticancer efficacy. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2021 May 1;110(5):2114-20.

50- Selimovic A, Kara G, Denkbas EB. Magnetic gelatin nanoparticles as a biocompatible carrier system for small interfering RNA in human colorectal cancer: Synthesis, optimization, characterization, and cell viability studies. Materials Today Communications. 2022 Dec 1;33:104616.