

Investigating the effect of cytotoxicity of nanonosome containing the extract of *Artemisia annua* on breast cancer cell lines

Rastgar Z¹, Khosravinejad F^{2*}

Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 2022/10/18 | Accepted: 2023/02/13

Abstract:

Background: Niosomes are primary-bilayer vesicles used in anticancer drugs. The aim of this study is the synthesis of niosome nanocarrier containing *Artemisia Annua* extract and its anticancer characteristics.

Materials and Methods: This in-vitro study was carried out at the Islamic Azad University, North Tehran Branch, from December 1400 to September 1401. Firstly, a niosomes nanocarrier was synthesized with the thin-layer hydration approach. Then, *Artemisia Annua* extract was loaded into them. Following that, physical and chemical features of nanocarriers were evaluated utilizing scanning electron microscope (SEM) and dynamic light scattering (DLS). The encapsulation level and the release pattern of the extract were validated via a dialysis bag. Finally, its anticancer effects were investigated on breast cancer cell line (MCF_7).

Results: The results showed that the synthesized nanocarrier of niosome containing the extract has a spherical structure and its size was 208.1 nm and the encapsulation percentage was 62.35%. It was also found that the nanocarrier of loaded niosome had significant anticancer effects compared to non-loaded extract.

Conclusion: It can be concluded that the niosome-containing *Artemisia Annua* extract of medicinal plant increases the anti-cancer effects significantly, and therefore, niosome can be used as a targeted drug delivery system for anti-cancer purposes.

Keywords: Nanoprobe, Niosome, *Artemisia Annua*, Breast cancer

***Corresponding Author**

Email: f.khosravinejad@iau-tnb.ac.ir

Tel: 0098 217 7009 801

Fax: 0098 217 731 7998

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2023; Vol. 27, No 1, Pages 1-11

بررسی اثر سمیت سلولی نانونیوزوم حاوی عصاره گیاه درمنه گندواش بر رده سلولی سرطان پستان

زهرا رستگار^۱، فریبا خسروی نژاد^{۲*}

خلاصه:

سابقه و هدف: نیوزوم‌ها و زیکول‌های اولیه دولایه‌ای هستند که در داروهای ضدسرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند. هدف از این مطالعه، سنتز نانوحامل نیوزوم حاوی عصاره گیاه درمنه گندواش (*Artemisia annua*) و بررسی اثرات ضدسرطانی آن می‌باشد. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه برون‌تنی که از آذرماه ۱۴۰۰ تا شهریور ۱۴۰۱ به انجام رسید، ابتدا نانوحامل نیوزومی با استفاده از روش هیدراتاسیون لایه‌نازک ساخته و عصاره گیاه درمنه گندواش در آن بارگذاری شد. در ادامه خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM و پراکندگی نور دینامیکی (DLS) مورد تأیید قرار گرفت. همچنین درصد محصورسازی و الگوی رهایش عصاره با استفاده از کیسه دیالیز بررسی شد. در انتها اثرات ضدسرطانی آن علیه رده سلولی سرطان پستان (MCF_7) بررسی شد و مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که نانوحامل نیوزوم سنتز شده حاوی عصاره، دارای ساختار کروی می‌باشد و اندازه آن ۲۰۸/۱ نانومتر و درصد محصورسازی ۶۲/۳۵ درصد است. همچنین مشخص شد که نانوحامل نیوزوم حاوی عصاره، دارای اثرات ضدسرطانی معناداری نسبت به عصاره آزاد می‌باشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که نیوزوم حاوی عصاره گیاه درمنه گندواش اثرات ضدسرطانی را به‌طور معناداری افزایش می‌دهد؛ بنابراین می‌توان از نیوزوم به‌عنوان سیستم دارورسانی هدفمند جهت اهداف ضدسرطانی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: نانوحامل، نیوزوم، درمنه گندواش، سرطان پستان

دوماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و هفتم، شماره ۱، فروردین - اردیبهشت ۱۴۰۲، صفحات ۱۱-۱

مقدمه

از جمله نانوذرات می‌توان به نیوزوم‌ها اشاره کرد. نیوزوم‌ها و زیکول‌های اولیه دولایه هستند و از سورفکتانت‌های غیریونی تشکیل شده‌اند [۵-۸]. نیوزوم، به افزایش زمان ماندن دارو، حلالیت داروی آبگریز در محلول آبی، فراهمی زیستی، افزایش نفوذ دارو و هدف قراردادن سلول‌ها و بافت‌های خاص منجر می‌شود. کپسوله‌کردن داروی موردنظر در نانوذرات نیز به محافظت از دارو کمک می‌کند [۷]. سرطان سینه دومین عامل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در زنان در سراسر جهان است. تقریباً ۸۱ درصد سرطان‌های سینه تهاجمی هستند [۹]. تعداد مرگ‌ومیر ناشی از این بیماری بدخیم در حال افزایش است [۱۰] و یک‌سوم بیماران در اثر این بیماری جان خود را از دست خواهند داد [۱۱]. درمان‌های مرسوم سرطان سینه؛ شامل جراحی، پرتودرمانی، شیمی‌درمانی و هورمون‌درمانی است. با این حال، با عوارض جانبی جدی همراه است که بیشتر برای بیمار مضر است [۱۲]. از جمله گیاهانی که دارای خاصیت ضدسرطانی می‌باشد، می‌توان به درمنه گندواش اشاره کرد که مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است [۱۳، ۱۱]. درمنه گندواش در فعالیت‌های ضدالتهابی، ضد درد، آنتی‌اکسیدان و ضدتومور کاربرد دارد و همچنین این، گونه در صنعت لوازم آرایشی اهمیت فزاینده‌ای دارد [۱۴]. اخیراً کاربرد احتمالی درمنه گندواش در درمان COVID-19 به‌طور علمی مورد بحث قرار گرفته است [۱۵]. درمنه

یکی از جدیدترین علوم در حال گسترش، نانوتکنولوژی است که نتیجه مطالعات گسترده در رابطه با جابه‌جایی ذرات ریز اتمی است. ابعاد این ذرات در نانو بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است [۲، ۱]. استفاده از نانوذرات با اندازه ۱۰۰ نانومتر یا کمتر در ترکیب با داروهای ضدسرطانی جهت هدف‌گیری سلول‌های سرطانی در پروژه‌های پزشکی سرطان بسیار گسترده شده است [۳]. فناوری نانو دارای توسعه سریعی بوده و برای اهداف بیولوژیکی تأثیر عالی بر دارو داشته است. فناوری نانو در مقیاس نانومتر در دسترس است؛ به‌همین دلیل امکان دسترسی به ابزارهای جدید را برای درمان، تشخیص، کنترل و نظارت سیستم‌های بیولوژیکی فراهم کرده است [۴].

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

تهران، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی

دوره‌نویس: ۰۲۱۷۷۳۱۷۹۹۸

تلفن: ۰۲۱۷۷۰۰۹۸۰۱

پست الکترونیک: f.khosravinejad@iau-tnb.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۱۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۲۶

مواد و روش‌ها

این مقاله، حاصل پایان‌نامه دانشجویی مقطع کارشناسی ارشد تحت عنوان سنتز نیوزوم انکپسوله شده بر روی عصاره گیاه درمنه گندواش: اثرات ضدسرطانی علیه رده سلولی سرطان پستان (Mcf-7) می‌باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال با کد ۹۷۰۲۱۰۶۸۸ و کد اخلاق IR.IAU.TNB.REC.1401.012 تصویب شده است.

جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری

جهت تهیه عصاره گیاهی به روش ماسراسیون ابتدا گیاه درمنه گندواش (*Artemisia annua*) از بانک گیاهی مرکز ذخایر زیستی ایران با کد IBRC P1000008 تهیه گردید. سپس مقدار ۵۰ گرم پودر گیاهی آسیاب شده به بشر حاوی ۲۰۰ سی‌سی حلال (الکل / آب و الکل / آب / هگزان) اضافه شد و سپس با استفاده از نایلون، درب بشر پوشانده و آب‌بندی گردید. حرارت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به وسیله همزن مغناطیسی تنظیم شد. با استفاده از پمپ خلأ و قیف بوختر، محلول نهایی صاف شد و به بالن ۲۵۰ سی‌سی منتقل گردید. سپس به منظور تغلیظ محلول نهایی، سیستم تقطیر به کار رفت و حلال تبخیر شده جداگانه نگهداری شد. در نهایت آن‌چه در بالن باقی می‌ماند، عصاره است [۲۲].

تهیه نیوزوم‌ها به روش هیدراسیون لایه‌نازک

جهت تهیه کردن نمونه‌ها، مقادیر مشخصی از کلسترول، اسپین ۶۰ و توئین ۶۰ در مخلوط حلال‌های کلروفرم و متانول (نسبت ۲ به ۱) حل شد. سپس محلول حاصل کاملاً هم‌زده شد تا اجزا به‌طور کامل حل شوند. بعد به بالن مخصوص روتاری انتقال داده شد و تحت شرایط موردنظر (دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۵۰) تحت خلأ قرار گرفت تا حلال کاملاً حل گردد. در مرحله هیدراتاسیون، مقدار ۱۰ سی‌سی بافر فسفات حاوی ۱۰ میلی‌گرم عصاره درمنه (1 mg/ml) در دمایی بالاتر از انتقال فاز (۶۰ درجه سانتی‌گراد) به فیلم لیبیدی تهیه شده اضافه گردید و سپس با کمک دستگاه تقطیر در خلأ با سرعت rpm ۱۲۰ به مدت نیم‌ساعت جهت هیدراته شدن مناسب چرخید. پس از هیدراتاسیون، جهت کاهش اندازه ذره‌ای، عمل سونیکاسیون به مدت ۷ دقیقه صورت گرفت [۲۳].

محصورسازی عصاره در نیوزوم و بررسی کارایی محصورسازی (Encapsulation efficiency)

کارایی محصورسازی به نسبت عصاره وارد شده در ساختار نیوزوم نسبت به عصاره اولیه گفته می‌شود. برای جدا کردن عصاره آزاد از نیوزوم حاوی عصاره، از روش سانتریفیوژ استفاده می‌شود؛ به این ترتیب که فرمولاسیون نیوزومی در دمای ۴ درجه و با

خزری یا درمنه گندواش (*Artemisia annua*): گیاهی علفی، چندساله و از خانواده آستراسه (Asteraceae) است [۱۶]. درمنه گندواش یک گیاه علفی چندساله است که تا ارتفاع ۱۰۰ سانتی‌متر رشد می‌کند [۱۶]. این گیاه، یکی از شاخه‌های مهم طب سنتی چین می‌باشد و به‌عنوان عامل القاکننده آپوپتوز، ضدتومور و ضدپلاسمودیال نیز در طب مدرن استفاده شده است [۱۷]. مطالعات مختلفی در زمینه بررسی اثرات ضدسرطانی و آپوپتوزی عصاره گیاهان جنس درمنه به انجام رسیده است. رشیدیان و همکاران اثرات ضد میکروبی و ضدسرطانی نانوذره نقره سنتز شده را با استفاده از عصاره گیاه درمنه خراسانی (*Artemisia khorassanica*) و آنالیز بیان ژن‌های Bax و Bcl2 علیه رده سلولی سرطان ریه مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تأثیر کشندگی معناداری بر روی رده سلولی سرطان ریه داشت و همچنین بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia khorassanica* کم‌هزینه و آسان بود و به دلیل داشتن اثرات ضد میکروبی و ضدسرطانی می‌تواند به‌عنوان یک کاندیدای دارویی مورد استفاده قرار بگیرد [۱۸]. طائب‌پور و همکاران ساخت و مشخصه‌یابی نانوذرات لیپوزومال حاوی عصاره هیدروالکلی افسنتین (*Artemisia Absinthium*) و سمیت آن را بر رده سلولی (Mcf_7) سرطان پستان مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان کسپوله شدن، ۴۰ درصد می‌باشد و لیپوزوم حاوی عصاره *Artemisia Absinthium* از سمیت بالاتری نسبت به عصاره آزاد بر سلول‌های سرطانی پستان برخوردار است [۱۹]. معلم‌زاده و همکارانش اثرات سمیت سلولی عصاره گیاه درمنه دشتی (*Artemisia Sieberi*) را علیه رده سلولی سرطان پستان (SKBr3) مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه درمنه دارای خاصیت ضدسرطانی علیه رده سلولی سرطان پستان (SKBr3) می‌باشد [۲۰]. سفالیان و همکاران بررسی اثر ضدسرطانی عصاره اتانولی گیاه درمنه ایرانی (*Artemisia persica*) را علیه سلول‌های سرطانی معده انسان (AGS) مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدرواتانولی درمنه دارای اثرات ضدسرطانی است و می‌تواند باعث مهار رشد این سلول‌ها شود [۲۱]. علیرغم خواص زیاد و ارزشمند این گیاه که در طب سنتی و عامیانه بسیار استفاده می‌شود، مطالعات کمی در زمینه اثرات ضدسرطانی و آپوپتوزی آن انجام شده است. در این مطالعه برای اولین بار درمنه سنتز نیوزوم انکپسوله شده حاوی عصاره گیاه درمنه گندواش با هدف بررسی اثرات ضدسرطانی و خصوصیات آن، پژوهشی انجام شده است.

دیونیزه به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد، یک قطره از نمونه بر روی یک فیلم هادی نظیر آلومینیوم پخش گردید و در دمای اتاق خشک شد. بررسی الگوی رهائش عصاره

بررسی رهائش عصاره به صورت دینامیک مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. بدین صورت که در کیسه دیالیز، مقدار ۲ میلی‌لیتر از نانوحامل نیوزومی بارگذاری شده با عصاره و همچنین محلول عصاره تنها (به صورت جداگانه) قرار داده می‌شوند. هریک از کیسه‌ها به صورت معلق در مزور محتوی ۵۰ میلی‌لیتر PBS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرند. در ساعت‌های مختلف از مزور نمونه‌گیری انجام می‌شود، بدین صورت که مقدار ۱ میلی‌لیتر از PBS حاوی کیسه دیالیز برداشته و ۱ میلی‌لیتر PBS با دمای ۳۷ درجه جایگزین آن می‌شود. عمل نمونه‌گیری تا ۷۲ ساعت در فواصل زمانی مشخص (۱، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت) صورت می‌گیرد. در پایان، جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه UV اسپکتروفوتومتر در طول موج بهینه انجام شد و نمودار درصد آزادسازی تجمعی عصاره از نیوزوم در مدت زمان ۷۲ ساعت رسم گردید [۲۶].

بررسی اثرات سمیت سلولی نیوزوم حاوی عصاره درم نه گندواش به منظور بررسی اثرات سمیت سلولی نانوحامل‌های بارگذاری شده با عصاره علیه رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. تعداد سلول‌های شمارش شده، دو میلیون سلول در حجم یک میلی‌لیتر بود که طبق محاسبات در حجم ۱۰ میکرولیتر، تعداد ۲۰۰۰۰ سلول وجود داشت. پلیت‌های حاوی سلول‌های کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور کشت سلول انکوبه شدند. بعد از گذشت زمان فوق، محتوای چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای به دقت خارج شد و به آن رنگ (Microculture Tetrazolium Test) اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت تحت شرایط ۵CO₂ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شد و سپس رنگ MTT جداسازی گردید و کریستال‌های فورمازان تولیدشده به وسیله سلول‌های زنده در ایزوپروپانول حل شدند. در نهایت جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه الیزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانش شد و میزان کشندگی سلول‌ها توسط فرمول زیر محاسبه گردید [۲۵]:

$100 \times (\text{جذب نوری سلول‌های کنترل} / \text{جذب نوری سلول‌های تیمار شده}) = \text{میزان بقای سلولی}$
آنالیز آماری

در این مطالعه، تمامی تست‌ها به صورت ۳ بار تکرار بود و آنالیز آماری توسط نرم‌افزار GraphPad Prism انجام شد و داده‌های سمیت سلولی با آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way analysis of variance) مورد بررسی قرار گرفت و اطلاعات

سرعت ۱۴۰۰۰ g به مدت ۴۵ دقیقه تحت سانتی‌فیوژ قرار گرفت. نانوذرات حاوی عصاره رسوب کرده و داروی آزاد به همراه موادی که وارد واکنش نشده‌اند، به عنوان سوپرناتانت باقی می‌مانند. جذب نمونه سوپرناتانت در طول موج ۵۴۰ nm توسط اسپکتروفوتومتر خوانده شد و مقدار عصاره آزاد محاسبه شده از مقدار عصاره اولیه کم گردید و از روی آن میزان درصد کارایی محصورسازی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

$$EE\% = \frac{\text{میزان عصاره آزاد} - \text{میزان عصاره اولیه}}{\text{میزان عصاره اولیه}} \times 100$$

در نهایت، فرمولاسیون‌های مختلف نیوزوم، بر اساس غلظت مولی span60/Tween60 تهیه شدند و میزان درصد انکپسولاسیون و اندازه نیوزوم‌های سنتز شده به دست آمد [۲۵، ۲۴].

بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نیوزوم‌ها؛ تعیین اندازه و توزیع ذرات

جهت اندازه‌گیری قطر دینامیکی نانوذرات از دستگاه زتاسایزر استفاده شد. همچنین برای بررسی سایز ذرات در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، این دستگاه مجهز به لیزر سبز با طول موج ۶۳۳ نانومتر به روش تفرق دینامیک نور به کار رفت [۲۶]. پراکندگی نور دینامیک، روشی فیزیکی است که برای تعیین اندازه ذرات موجود در محلول‌ها استفاده می‌شود. این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون به کار می‌رود. این روش به برهم‌کنش نور با ذره بستگی دارد. نور پراکنده شده به وسیله نانوذرات موجود در سوسپانسیون یا محلول با زمان تغییر می‌کند و به قطر ذره ربط داده می‌شود. اندازه ذره‌ای در واقع میانگین قطر ذرات است که به صورت Z-Average و برحسب نانومتر نشان داده می‌شود. بنابراین هرچه Z-Average بیشتر باشد، اندازه ذره‌ای بزرگ‌تر خواهد بود. شاخص پراکندگی ذره‌ای (PDI) در واقع درجه غیریکسان بودن توزیع اندازه ذره‌ای می‌باشد. این شاخص توسط دستگاه نانو سایزر محاسبه شد.

بررسی شکل ظاهری و مورفولوژی نیوزوم‌های سنتز شده به منظور بررسی ساختار ظاهری و مورفولوژی نیوزوم‌های حاوی عصاره گیاه درم نه از روش میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) استفاده شد. روش SEM نسبت به سایر روش‌های میکروسکوپی و میکروسکوپ‌های نوری از دامنه بزرگ‌نمایی بیشتر و تفکیک‌پذیری بهتری برخوردار است. دامنه بزرگ‌نمایی SEM‌های ابتدایی در حدود ۱۰ تا ۱۰۰ هزار می‌باشد. رسانا بودن نمونه‌ها جهت تصویربرداری از آن‌ها در میکروسکوپ SEM یک امتیاز محسوب می‌شود. برای تصویربرداری، سوسپانسیون نانوذره تهیه شده در آب

اثرات ضدسرطانی نیوزوم انکپسوله شده بر درمنه گندواش در سرطان، ...

به صورت $\bar{X} \pm SD$ نمایش داده شدند و سطح معنی داری در آزمون ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. نسبت مولی ۱:۱ (سورفکتانت / کلسترول) و نسبت مولی ۵۰:۵۰ (Span 60 / Tween 60) و با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر عصاره درمنه و مدت زمان سونیکاسیون ۷ دقیقه سنتز گردید (جدول های شماره های ۱ و ۲).

نتایج

سنتز نانوحامل نیوزومی و بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن در این مطالعه فرمولاسیون بهینه نانوحامل نیوزومی با

جدول شماره ۱- فرمولاسیون های مختلف نیوزوم سنتز شده بر اساس نسبت مولی (توین ۶۰ / اسپان ۶۰) و کلسترول تهیه شده است و جهت کاهش اندازه ذره ای، عمل سونیکاسیون به مدت ۷ دقیقه صورت گرفت.

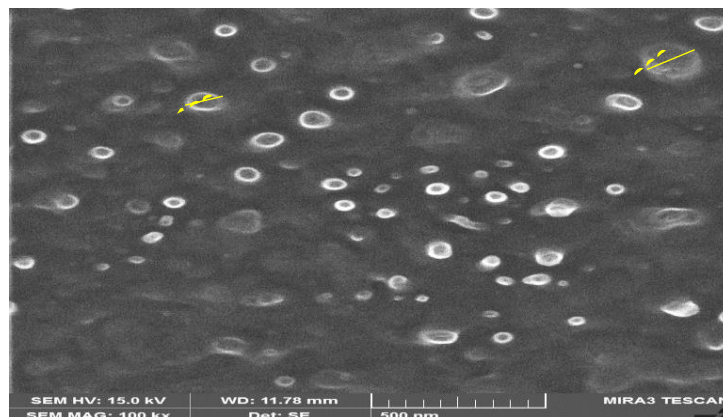
Formulation	Type of Surfactant	Span60 : Tween60 (mol ratio)	Lipid (μmol)	Sonication time (min)	Surf / Chol (mol ratio)
F1	اسپان ۶۰	۷۵:۲۵	۲۰۰	۷	۱:۱
F2	اسپان ۶۰	۵۰:۵۰	۲۰۰	۷	۱:۱
F3	اسپان ۶۰	۲۵:۷۵	۲۰۰	۷	۱:۱
F4	اسپان ۶۰	۷۵:۲۵	۲۰۰	۷	۲:۱
F5	اسپان ۶۰	۵۰:۵۰	۲۰۰	۷	۲:۱

جدول شماره ۲- فرمولاسیون های مختلف اندازه و میزان درصد محصورسازی نیوزوم های سنتز شده حاوی عصاره درمنه گندواش؛ فرمولاسیون F2 از نظر اندازه و کارایی محصورسازی فرمولاسیون بهینه بود.

Formulation	Size (nm)	EE (%)
F1	۲۳۳/۹	۵۸/۹۱
F2	۱۰۴/۱	۶۲/۳۵
F3	۲۵۷/۹	۵۰/۳۹
F4	۲۱۰/۵	۶۰/۵۸
F5	۲۲۲/۶	۷۱/۳۴

(SEM) مشاهده می شود، نیوزوم های حاوی عصاره درمنه گندواش با غلظت های مختلف، کاملاً کروی با سطح صاف و یکنواخت هستند (شکل شماره ۱).

در ادامه به منظور بررسی خصوصیات مورفولوژی نیوزوم های سنتز شده از طریق میکروسکوپ الکترونی نگاره و DLS استفاده گردید. همان طور که در تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره



شکل شماره ۱- مورفولوژی نانوحامل های نیوزوم بارگذاری شده با عصاره؛ همان طور که مشاهده می شود، نیوزوم ها دارای ساختار کروی هستند.

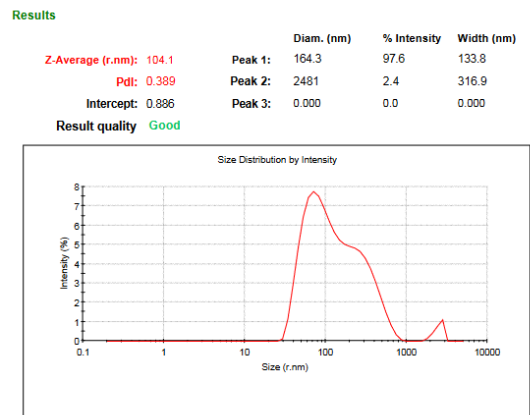
نشان دهنده متحنی اندازه ذره ای نمونه بهینه است. نتایج DLS نشان داد که سایز نیوزوم بهینه سنتز شده ۱۰۴/۱ نانومتر می باشد.

همان طور که اشاره شد، اندازه و پراکنندگی ذرات توسط دستگاه نانوتاسایزر DLS مورد ارزیابی قرار گرفت. شکل شماره ۲

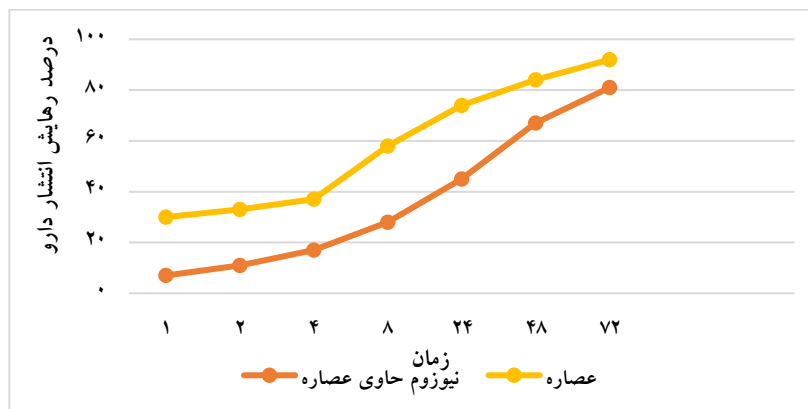
اثرات ضدسرطانی نیوزوم انکپسوله شده بر درمنه گندواش در سرطان، ...

بررسی الگوی رهایش دارو

شکل شماره ۳ روند آزاد شدن تجمعی فرم محلول عصاره تنها و نیوزوم حاوی عصاره درمنه در محیط آزادسازی PBS-SDS را در مدت زمان ۷۲ ساعت نشان می‌دهد. برای شبیه‌سازی به شرایط واقعی و درون‌تنی، از محیط آزادسازی PBS برای فاز گیرنده استفاده شد و همان‌طور که در شکل شماره ۳ مشخص است، آزادسازی دارو از فرم نانوحامل (۱۱ درصد) کمتر از محلول عصاره (۹۲ درصد) طی مدت زمان ۷۲ ساعت بود. در آزادسازی محلول عصاره، ۵۸ درصد عصاره طی ۸ ساعت اول در محیط آزاد شد؛ ولی برای نانوحامل حاوی عصاره، طی ۸ ساعت آزادسازی مقدار ۲۸ درصد عصاره از نانوحامل نیوزوم انجام شد.



شکل شماره ۲- منحنی اندازه ذره‌ای نمونه بهینه نانوحامل نیوزوم بارگذاری شده با عصاره گیاه درمنه گندواش توسط دستگاه نانوزتاسایزر DLS؛ همان‌طور که در شکل مشخص است، میانگین سایز ذرات نمونه بهینه ۱۰۴/۱ نانومتر گزارش شده است.



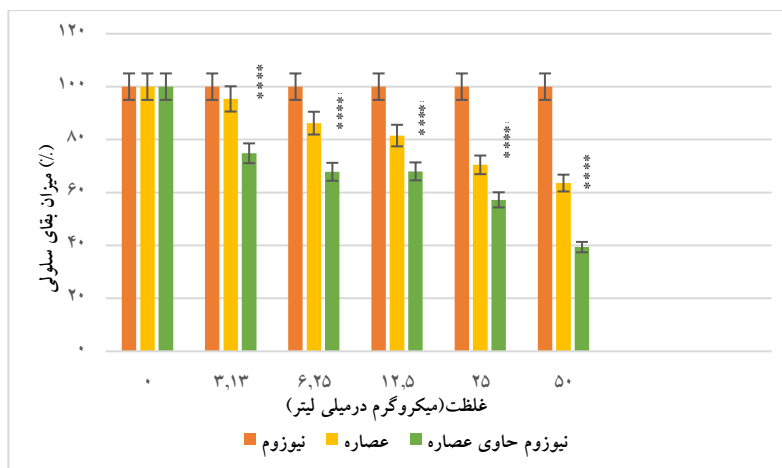
شکل شماره ۳- منحنی رهایش عصاره نانوحامل نیوزومی بارگذاری شده با عصاره درمنه گندواش و عصاره تنها در بافر PBS با استفاده از کیسه دیالیز

منحنی نارنجی مربوط به نیوزوم حاوی عصاره درمنه گندواش و منحنی زرد مربوط به عصاره تنها است.

بررسی اثرات سمیت سلولی جهت بررسی اثرات سمیت سلولی نانوحامل نیوزوم حاوی عصاره و عصاره تنها علیه رده سلولی MCF-7 از روش MTT استفاده می‌شود. تیمار سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های مختلف ۳/۱۳، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۵۰، ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوحامل نیوزومی حاوی عصاره درمنه با استفاده از تست MTT در مدت زمان ۲۴ ساعت به ترتیب سبب کاهش بقای سلول‌ها تا $74/83 \pm 7/35$ ، $67/99 \pm 1/80$ ، $67/83 \pm 2/92$ و $39/37 \pm 5/09$ و $57/23 \pm 3/30$ درصد (نمودار شماره ۱).

بررسی اثرات سمیت سلولی

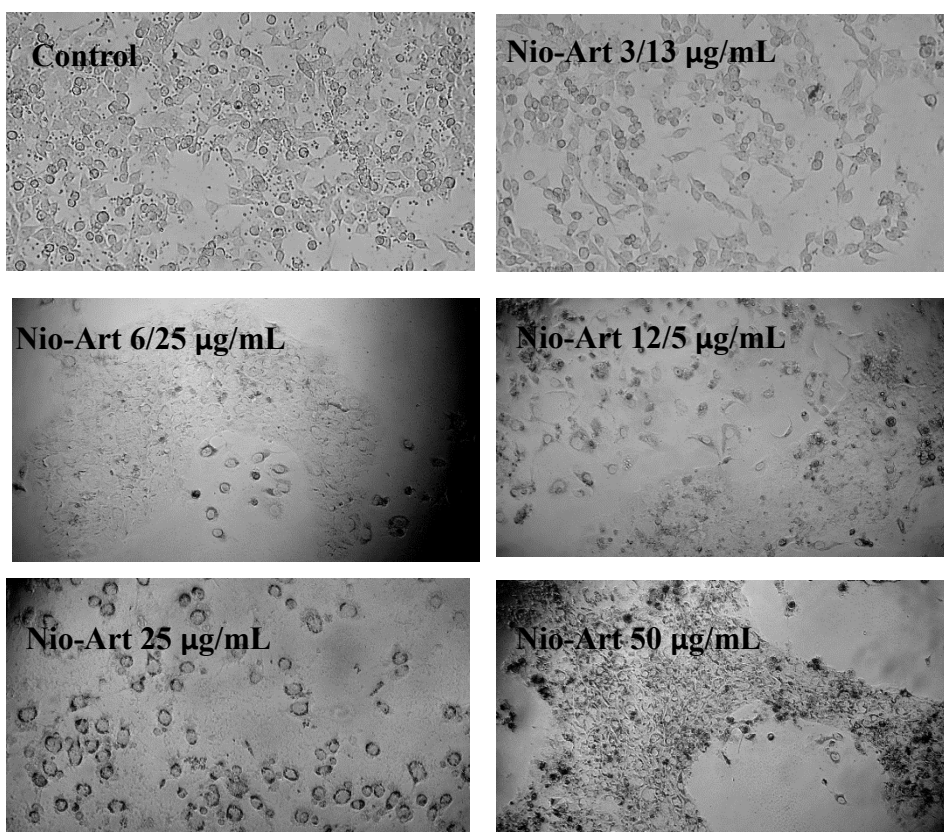
می‌شود که نسبت به گروه کنترل معنادار است ($P < 0/05$). نتایج نشان داد که سمیت سلولی نیوزوم حاوی عصاره درمنه گندواش وابسته به دوز می‌باشد؛ همچنین نتایج سمیت سلولی عصاره تنها نشان می‌دهد که تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ۳/۱۳، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۵۰، ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بقای سلول‌ها شده است و در نهایت نتایج تست MTT نشان داد که نانوحامل نیوزوم فاقد عصاره به تنهایی فاقد سمیت سلولی معناداری است.



نمودار شماره ۱- نمودار ستونی درصد بقای سلول‌های MCF-7 در برابر غلظت‌های مختلف (۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۳) میکروگرم بر میلی‌لیتر نیوزوم حاوی عصاره درمنه و عصاره تنها در مدت زمان ۲۴ ساعت؛ داده‌ها به صورت درصد میزان بقای سلولی \pm انحراف معیار در مقایسه با نمونه کنترل تعریف شده است ($P < 0.0001$, $N=3$).

که در شکل شماره ۴ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت نیوزوم حاوی عصاره، میزان بقای سلولی کاهش می‌یابد که نسبت به گروه کنترل از لحاظ آماری معنادار است.

پس از انجام تست MTT از نیوزوم حاوی عصاره درمنه تهیه شده با غلظت‌های (۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۳) میکروگرم بر میلی‌لیتر توسط میکروسکوپ نوری عکس برداری صورت گرفت. همان‌طور



شکل شماره ۴- میکروگراف میکروسکوپ نوری از سنجش تست MTT با غلظت‌های مختلف (۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۳) میکروگرم بر میلی‌لیتر نیوزوم‌های سنتز شده حاوی عصاره درمنه گندواش؛ تصاویر نشان می‌دهد که افزایش غلظت نیوزوم حاوی عصاره درمنه موجب کاهش بقای سلولی می‌شود و نتایج وابسته به دوز و نسبت به گروه کنترل معنادار می‌باشد.

بحث

پیشرفت‌های سریع ابزارهای متعدد نانوتکنولوژی در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان به کار گرفته شده است. سرطان یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های جهان است و هر ساله بیش از ده میلیون مورد جدید سرطان شناسایی می‌شود. سازمان بهداشت جهانی تخمین می‌زند که مرگ‌ومیر ناشی از سرطان تا سال ۲۰۳۰ به حدود ۱۳/۱ میلیون افزایش یابد. محصور کردن داروها به وسیله نانوکپسول‌ها سیستم بسیار امیدوارکننده‌ای را در پیشرفت نانوپزشکی ارائه می‌دهد. نانوتکنولوژی در بهبود کارایی دارورسانی و همچنین در رفع برخی از محدودیت‌های دارورسانی در سرطان استفاده می‌شود [۲۷]. یکی از جایگزین‌های مناسب برای درمان سرطان، استفاده از عصاره‌های گیاهی می‌باشد. در این مطالعه، به منظور افزایش اثرات ضدسرطانی عصاره گیاهی درمنه، از نانوساختار نیوزوم به منظور دارورسانی استفاده شد. نیوزوم‌ها برای اولین بار در دارورسانی برای داروهای ضدسرطان مورد استفاده قرار گرفتند. نیوزوم‌ها قادر به تغییر مشخصات فارماکوکینتیک، توزیع دارو در اندام و حتی متابولیسم دارو هستند. در این مطالعه، عصاره گیاه درمنه گندوش به وسیله نانوحامل نیوزوم از طریق روش هیدراتاسیون لایه‌نازک بارگذاری شد؛ سپس نانوحامل نیوزوم با نسبت‌های مولی ۵۰:۵۰ (Span60 / Tween60) و ۱:۱ (سورفکتانت / کلسترول) و با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره درمنه گندوش سنتز شد. نیوزوم‌ها حاوی دو جزء اصلی از جمله کلسترول و سورفکتانت‌های غیریونی هستند. در سورفکتانت‌های غیریونی، جزء اصلی مورد استفاده در تهیه نیوزوم یک عامل فعال سطحی غیریونی است. این عوامل فعال سطحی، باعث همولیز و تحریک کمتری در سطوح سلولی می‌شوند و می‌توانند برای افزایش نفوذپذیری و بهبود حلالیت، به عنوان عوامل مرطوب‌کننده و امولسیون‌کننده استفاده شوند. کلسترول یک افزودنی مهم در فرمولاسیون نیوزوم‌ها است و می‌تواند بر نفوذپذیری و سفتی غشا، راندمان به دام افتادن، سهولت آبرسانی مجدد نیوزوم‌های یخ‌زده، پایداری، زمان نگهداری و سمیت آن‌ها تأثیر بگذارد. افزودن کلسترول باعث افزایش ویسکوزیته و در نتیجه سفتی آماده‌سازی می‌شود [۲۸]. در این مطالعه خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نیوزوم‌های سنتز شده توسط روش هیدراتاسیون لایه‌نازک، و زیکول‌های چندلایه با سایز ۲۰۸/۱ نانومتر گزارش شد که برای پراکندگی ذرات مناسب هستند. میزان رهایش عصاره نانوحامل نیوزومی نسبت به عصاره تنها، رهایش آهسته‌ای داشت که از نظر فارماکولوژی بسیار حائز اهمیت است. مطالعات مختلفی در زمینه سنتز و فرمولاسیون‌های مختلف نیوزومی برای عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی انجام شده است. Ying-QiXu و همکاران در

سال ۲۰۱۶، بالانوکارپول را در ساختار نیوزوم انکپسوله کردند و اثرات سمیت سلولی رده‌های سرطان‌های تخمدان و پستان انسان را مورد ارزیابی قرار دادند. هدف این مطالعه بهبود ویژگی‌های بالانوکارپول و بهبود فعالیت ضدسرطانی آن از طریق کپسوله‌سازی آن در ساختار دولایه یک سیستم دارورسانی نانوذرات مبتنی بر لیپیدی بود و همچنین هدف، بهبود ویژگی‌های دارویی بالانوکارپول با افزایش سمیت سلولی آن در برابر سلول‌های سرطانی از طریق کپسوله‌سازی آن در ساختار دولایه‌ای از یک سیستم دارورسانی نانوذره نیوزومی است. در این مطالعه، فرمولاسیون نانوذرات نیوزوم برای کپسوله‌سازی و تحویل بالانوکارپول در مقایسه با بالانوکارپول آزاد، اثر ضدسرطانی برتری را نشان داد و این مشخص می‌کند که استفاده از نیوزوم‌ها به عنوان یک سیستم تحویل برای کپسوله‌کردن بالانوکارپول با موفقیت، سمیت بالانوکارپول را روی سلول‌های سرطانی همراه با بهتر شدن حلالیت در آب بهبود می‌بخشد. در این مطالعه، نحوه کپسوله‌سازی نیوزوم با مطالعه حاضر تشابه داشت؛ اما نحوه عصاره‌گیری متفاوت بود. نقطه نظر تشابه این مطالعه و پژوهش حاضر، افزایش اثرات ضدسرطانی عصاره‌های گیاهی پس از انکپسوله‌کردن با نیوزوم می‌باشد [۲۹]. بارانی و همکاران در سال ۲۰۱۸ عصاره حنا را در ساختار نیوزوم انکپسوله کردند و فعالیت ضدتوموری آن در رده سلولی MCF_7 سرطان سینه مورد ارزیابی قرار گرفت و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن مانند مورفولوژی و اندازه به ترتیب توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و DLS اندازه‌گیری شدند. نیوزوم‌ها دارای شکل‌های کروی بودند و ذرات، اندازه‌ای به قطر حدود ۲۵۰ نانومتر داشتند. میزان بازدهی کپسوله‌سازی حدود $70 \pm 1/02$ درصد بود؛ در صورتی که میزان بازدهی کپسوله‌سازی مطالعه حاضر ۶۲/۳۵ می‌باشد. مطالعه نشان داد که عصاره حنای انکپسوله‌شده در نیوزوم اثرات سمیت سلولی را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد که بیانگر اثرات ضدسرطانی معنادار در مقایسه با عصاره آزاد می‌باشد. از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که نیوزوم‌ها می‌توانند ترکیبات فتوشیمیایی را محصور نمایند و همچنین کارایی نانوحامل را به صورت کنترل شده بهبود بخشند و به شیوه‌ای پایدار برای درمان سرطان عمل کنند [۳۰]. بارانی و همکاران در سال ۲۰۲۰ عصاره چای سبز را به وسیله PEG (پلی اتیلن گلیکول) پوشش داده شده با نیوزوم، انکپسوله کردند و اثرات ضدسرطانی را در برابر خطوط سلولی مختلف مورد ارزیابی قرار دادند و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن، مانند مورفولوژی و اندازه را به ترتیب توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و تکنیک پراکندگی دینامیک نور (DLS) اندازه‌گیری نمودند. میانگین اندازه نیوزوم پس از بارگذاری با عصاره به طور قابل توجهی افزایش

کپسوله نسبت به شرایط کپسوله‌نشده بر رده سلولی MCF_7 سرطان پستان بیشتر است [۲۶]. دباغیان امیری و همکاران در سال ۲۰۲۱ عصاره گیاه درمنه بابونه‌ای را در ساختار نیوزوم انکپسوله کردند و اثرات بیولوژیکی بر بیان ژن‌های آپوپتوزی Bax و Bcl2 را علیه رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) مورد بررسی قرار دادند. نانوحامل نیوزومی با استفاده از روش فیلم لایه‌نازک ساخته شد و عصاره گیاه درمنه بابونه در آن بارگذاری گردید. به‌دنبال آن، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن با استفاده از میکروسکوپ‌های الکترونی FTIR، SEM و DLS مورد تأیید قرار گرفت. در انتها، اثرات ضد میکروبی و ضدسرطانی آن علیه رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) بررسی شد و میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی Bax و Bcl2 مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوحامل نیوزوم سنتز شده حاوی عصاره، دارای ساختار کروی می‌باشد و اندازه آن کمتر از ۲۰۰ نانومتر است. همچنین مشخص شد که نانوحامل نیوزوم حاوی عصاره، دارای اثرات ضد میکروبی و ضدسرطانی معناداری نسبت به عصاره آزاد می‌باشد؛ در نتیجه این مطالعات نشان دادند که نانوحامل نیوزوم یکی از بسترهای مناسب برای دارورسانی جهت اهداف سمیت سلولی و ضد میکروبی می‌باشد و می‌توان در آینده با مطالعات بیشتر به‌عنوان نانوحامل برای رساندن عصاره به سلول هدف استفاده نمود [۳۴]. تفاوت پژوهش حاضر با سایر مطالعات، انکپسوله‌کردن عصاره درمنه گندواش در سیستم نیوزوم می‌باشد که این ساختار اولین بار است که صورت گرفته است و همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نیوزوم حاوی عصاره دارای افزایش اثرات ضدسرطانی معناداری نسبت به عصاره آزاد می‌باشد که این خود نشان‌دهنده دارورسانی دقیق و هدفمند به محل مورد نظر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

باتوجه به این مطالعه، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که نیوزوم حاوی عصاره گیاه درمنه گندواش اثرات ضدسرطانی را به‌طور معناداری افزایش می‌دهد و در نتیجه می‌توان در آینده با تحقیقات گسترده‌تر از نیوزوم به‌عنوان سیستم دارورسانی هدفمند جهت اهداف ضدسرطانی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

از استاد بزرگوار دکتر خسروی‌نژاد و کلیه پرسنل شرکت دانش‌بنیان بافت و ژن پاسارگاد و به‌خصوص از دکتر محمد قادریان به‌خاطر همکاری همه‌جانبه در اجرای این تحقیق تشکر می‌گردد.

یافت. میزان بازدهی کپسوله‌سازی بین ۷۰ تا ۸۰ متغیر بود. در این مطالعه، نحوه عصاره‌گیری با مطالعه حاضر تفاوت داشت و نیوزوم به‌وسیله پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) پوشش داده شده بود. سنجش سمیت سلولی به‌وسیله MTT صورت گرفت و محیط کشت DMEM بود که با مطالعه حاضر تشابه داشت [۳۱]. حاجی‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۸ عصاره سیب‌زمینی (Diosgenin) را در ساختار نیوزوم، انکپسوله کردند و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن، مانند مورفولوژی و اندازه را به‌ترتیب توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و DLS سنجیدند و همچنین سمیت سلولی (MTT) را مورد ارزیابی قرار دادند. راندمان بارگذاری و نرخ رهاسازی Diosgenin از نیوزوم با کیسه دیالیز و طیف‌سنجی مرئی UV ارزیابی شد. روش سنجش سمیت سلولی به‌کار رفت و در نهایت جذب با استفاده از صفحه الایزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و اندازه نیوزوم‌های حاوی عصاره سیب‌زمینی افزایش یافت. در نتیجه آزمون MTT ثابت کرد که سمیت سلولی در عصاره فاقد نیوزوم معنی‌دار نیست؛ یعنی ۶۰ درصد از سلول‌ها زنده ماندند، در حالی که در عصاره دارای نیوزوم ۲۸ درصد از سلول‌ها زنده ماندند. پس عصاره حاوی نیوزوم، اثر ضدسرطانی قابل‌توجهی در رده سلولی سرطانی HepG2 دارد [۳۲]. Sharma و همکاران در سال ۲۰۱۶ عصاره لیکوپین را در ساختار نیوزوم انکپسوله کردند و فعالیت ضدسرطانی آن را علیه رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) و رده سلولی سرطان دهانه رحم مورد ارزیابی قرار دادند و نیوزوم سنتز شده را از نظر شکل، سایز، پتانسیل زتا، بازدهی کپسوله‌سازی آن و الگوی رهایش مطالعه نمودند. اندازه ذرات و نیوزوم‌های حاوی عصاره لیکوپین از ۱۷۰ تا ۲۳۰ نانومتر بود. میزان بازدهی کپسوله‌سازی در این مطالعه $62/76 \pm 2$ درصد بود. نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که نانونیوزوم‌های حاوی عصاره لیکوپین به‌عنوان طیف وسیعی از عوامل ضدسرطانی می‌باشند و می‌توانند به‌عنوان کاربردهای مختلف درمانی مفید واقع شوند و مورد استفاده قرار گیرند [۳۳]. عسگری و همکاران در سال ۲۰۱۸ اثرات ضدسرطانی نیوزوم حاوی عصاره پوست انار را علیه رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) مورد ارزیابی قرار دادند و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی را با استفاده از دستگاه‌های زتاسایزر و FT-IR و SEM سنجیدند و میزان رهایش عصاره را در دماهای 37°C و 42°C محاسبه نمودند. نتایج پژوهش نشان می‌دهد که نانوحامل نیوزومی در دماهای 37°C و 42°C دارای رهایش کنترل‌شده است. مطالعه FT-IR و SEM نیز عدم برهم‌کنش عصاره با سامانه و مورفولوژی کروی سامانه را تأیید می‌کند. در پایان مشخص شد که میزان سمیت عصاره پوست انار در شرایط

References:

- [1] Bunggulawa EJ, Wang W, Yin T, Wang N, Durkan C, Wang Y, et al. Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *J Nanobiotechnol* 2018; 16(1): 1-13.
- [2] Khan I, Khan M, Umar MN, Oh D-H. Attenuation and production of the amphotericin B-resistant *Leishmania tropica* strain. *Jundishapur J Microbiol* 2016; 9(6).
- [3] Mirzaie A, Diba H, Khosravi-Nejad F, Javanmardi H. Synergistic cytotoxicity of bevacizumab and silver nanoparticles on ovarian cancer cell line (A2780) and analysis of Bcl-2 and caspase 3 apoptotic genes expression. *J Cell Tissue* 2021; 12(2): 72-87.
- [4] Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MDP, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnol* 2018; 16(1): 1-33.
- [5] Yeo PL, Lim CL, Chye SM, Ling APK, Koh RY. Niosomes: a review of their structure, properties, methods of preparation, and medical applications. *Asian Biomedicine* 2017; 11(4): 301-14.
- [6] Osanloo M, Assadpour S, Mehravaran A, Abastabar M, Akhtari J. Niosome-loaded antifungal drugs as an effective nanocarrier system: A mini review. *Curr Med Mycol* 2018; 4(4): 31.
- [7] Qamar Z, Qizilbash FF, Iqbal MK, Ali A, Narang JK, Ali J, et al. Nano-based drug delivery system: recent strategies for the treatment of ocular disease and future perspective. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2019; 13(4): 246-54.
- [8] Paolino D, Muzzalupo R, Ricciardi A, Celia C, Picci N, Fresta M. In vitro and in vivo evaluation of Bola-surfactant containing niosomes for transdermal delivery. *Biomed Microdevices* 2007; 9(4): 421-33.
- [9] Raju SR, Balakrishnan S, Kollimada S, Chandrashekar K, Jampani A. Anti-tumor effects of *Artemisia nilagirica* extract on MDA-MB-231 breast cancer cells: Deciphering the biochemical and biomechanical properties via TGF- β upregulation. *Heliyon* 2020; 6(10): e05088.
- [10] Akbarzadeh I, Shayan M, Bourbour M, Moghtaderi M, Noorbazargan H, Eshrati Yeganeh F, et al. Preparation, optimization and in-vitro evaluation of curcumin-loaded niosome@ calcium alginate nanocarrier as a new approach for breast cancer treatment. *Biology* 2021; 10(3): 173.
- [11] Yan L, Xiong C, Xu P, Zhu J, Yang Z, Ren H, et al. Structural characterization and in vitro antitumor activity of A polysaccharide from *Artemisia annua* L. (Huang Huahao). *Carbohydrate Polymers* 2019; 213: 361-9.
- [12] Teimouri M, Khosravinejad F. Inhibitory effects of Behind the scenes medicine extract (*Physalis alkekengi*) on prostate cancer caused by DMBA injection in mice. *Devel Biol* 2021; 13(2): 31-8.
- [13] Lang SJ, Schmiech M, Hafner S, Paetz C, Steinborn C, Huber R, et al. Antitumor activity of an *Artemisia annua* herbal preparation and identification of active ingredients. *Phytomedicine* 2019; 62: 152962.
- [14] Charlie-Silva I, Fraceto LF, de Melo NFS. Progress in nano-drug delivery of artemisinin and its derivatives: towards to use in immunomodulatory approaches. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018; 46(Sup3): S611-S20.
- [15] Meng Y, Ma N, Lyu H, Wong YK, Zhang X, Zhu Y, et al. Recent pharmacological advances in the repurposing of artemisinin drugs. *Med Res Reviews* 2021; 41(6): 3156-81.
- [16] Ekiert H, Świątkowska J, Klin P, Rzepiela A, Szopa A. *Artemisia annua*—Importance in Traditional Medicine and Current State of Knowledge on the Chemistry, Biological Activity and Possible Applications. *Planta Med* 2021; 87(08): 584-99.
- [17] Taleghani A, Emami SA, Tayarani-Najaran Z. *Artemisia*: a promising plant for the treatment of cancer. *Bioorganic Med Chem* 2020; 28(1): 115180.
- [18] Rashidian S, Bagheri KA, Mirzaie A. Antibacterial and anticancer activities of biosynthesized silver nanoparticles using *Artemisia khorassanica* extract: Bax and Bcl2 apoptosis gene expression analysis. 2019.
- [19] Taebpour M, Majdzadeh M, Haghirsadat BF. Fabrication and characterization of liposomal nanoparticles containing hydroalcoholic extract of *Artemisia absintium* and its toxicity on MCF-7 breast cancer cell line. *IQ J Breast Dis* 2021; 14(1): 64-77.
- [20] Moalemzadeh S, Rajabbeigi E, Montazeri M. Investigation on cytotoxic effect of hydroalcoholic extract of *Artemisia sieberi* on SKBr3 cell line. *J Cell Tissue* 2019; 10(4): 252-60.
- [21] Sofalian O, Zare N, Latifi S, Hasanpour K, Motalebinia S. Evaluation of anticancer effect of *Mentha longifolia* and *Artemisia persica* hydro-alcoholic extracts against human gastric cancer cells (AGS). *Genetic Engineering Biosafety J* 2020; 9(1): 1-10.
- [22] Tabatabaei Yf, Alizadeh Bb, Alghooneh A, Zanganeh H. Optimization Of Extraction Of *Mespilus Germanica* By Mixture Design And Investigation Of Its Effect On Infectious Microorganisms “In Vitro”. 2016.
- [23] Sahab-Negah S, Ariakia F, Jalili-Nik M, Afshari AR, Salehi S, Samini F, et al. Curcumin loaded in niosomal nanoparticles improved the anti-tumor effects of free curcumin on glioblastoma stem-like cells: an in vitro study. *M Neurobiol* 2020; 57(8): 3391-411.
- [24] Wichayapreechar P, Anuchapreeda S, Phongpradist R, Rungsevijitprapa W, Ampasavate C. Dermal targeting of *Centella asiatica* extract using

hyaluronic acid surface modified niosomes. *J Liposome Res* 2020; 30(2): 197-207.

[25] Buttacavoli M, Albanese NN, Di Cara G, Alduina R, Faleri C, Gallo M, et al. Anticancer activity of biogenerated silver nanoparticles: an integrated proteomic investigation. *Oncotarget* 2018; 9(11): 9685.

[26] Askari M, Nikoonahad Lotfabadi N. Evaluation of niosomal nano-carriers capabilities on toxicity preservation and delivery of pomegranate peel extract in cell culture conditions (MCF-7 cell line of breast cancer). *D Med* 2020; 26(5): 9-20.

[27] Montané X, Bajek A, Roszkowski K, Montornés JM, Giamberini M, Roszkowski S, et al. Encapsulation for cancer therapy. *Molecules* 2020; 25(7): 1605.

[28] Bhardwaj P, Tripathi P, Gupta R, Pandey S. Niosomes: A review on niosomal research in the last decade. *J Drug Deli Sci Technol* 2020; 56: 101581.

[29] Obeid MA, Gany SAS, Gray AI, Young L, Igoli JO, Ferro VA. Niosome-encapsulated balanocarpol: compound isolation, characterisation, and cytotoxicity evaluation against human breast and ovarian cancer cell lines. *Nanotechnol* 2020; 31(19): 195101.

[30] Barani M, Mirzaei M, Torkzadeh-Mahani M, Nematollahi MH. Lawsone-loaded Niosome and its

antitumor activity in MCF-7 breast Cancer cell line: a Nano-herbal treatment for Cancer. *DARU J Pharma Sci* 2018; 26(1): 11-7.

[31] Baranei M, Taheri RA, Tirgar M, Saeidi A, Oroojalian F, Uzun L, et al. Anticancer effect of green tea extract (GTE)-Loaded pH-responsive niosome Coated with PEG against different cell lines. *Materials Today Communications* 2021; 26: 101751.

[32] Hajizadeh MR, Parvaz N, Barani M, Khoshdel A, Fahmidehkar MA, Mahmoodi M, et al. Diosgenin-loaded niosome as an effective phytochemical nanocarrier: Physicochemical characterization, loading efficiency, and cytotoxicity assay. *DARU J Pharma Sci* 2019; 27(1): 329-39.

[33] Sharma P, Saxena P, Jaswanth A, Chalamaiah M, Tekade K, Balasubramaniam A. Novel encapsulation of lycopene in niosomes and assessment of its anticancer activity. *J Bioe Bioavaila* 2016; 8(5): 224-32.

[34] Dabaghian Amiri A, Mirzaie A, Ali Asgari E, Mahmoudzadeh A. Preparation of niosome loaded Artemisia chamamelifolia extract: antibacterial and anti-cancer activities and apoptosis gene expression analysis in breast cancer cell line (MCF-7). *Feyz* 2021; 25(2): 839-49. [in Persian]