Original Article

Preparation of niosome loaded *Artemisia chamamelifolia* extract: antibacterial and anti-cancer activities and apoptosis gene expression analysis in breast cancer cell line (MCF-7)

Dabaghian-Amiri A[1], Mirzaie A[2*], Ali-Asgari E[3], Mahmoodzadeh A[4]

1- Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.
2- Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, I.R. Iran.
3- Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.
4- Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, I.R. Iran.

Received: 2020/10/28 | Accepted: 2021/05/1

Abstract:

Background: Niosomes are multi-layered vesicles that are used as one of the new targeted drug delivery systems. This study aimed to synthesize niosome loaded *A. chamamelifolia* extract to investigate its biological effects.
Materials and Methods: In this experimental study, which was conducted at the Islamic Azad University, East Tehran Branch, from January 2019 to September 2020, a niosomal nanocarrier was fabricated using a thin layer-film method, and the *A. chamemifolia* extract was loaded on it. Subsequently, its physical and chemical properties were confirmed using SEM, FTIR and DLS methods. Finally, its antimicrobial and anti-cancer effects against breast cancer cell line (MCF-7) were investigated using micro-dilution and MTT methods, respectively and the expression of *Bax* and *Bcl2* apoptotic genes were studied via quantitative Real Time PCR.
Results: The results of this study showed that the synthesized niosome loaded extract had a spherical structure and its size was less than 200 nm. The results exhibited that niosome loaded extract had significant antimicrobial and anti-cancer effects compared to the free extract and the expression of *Bax* and *Bcl2* genes were decreased and increased, respectively 4.16±0.41 ($P<0.01$) and 0.61±0.17 ($P<0.05$).
Conclusion: it can be concluded that niosome is one of the suitable nanocarriers for drug delivery of *A. chamemifolia* extract for cytotoxic purposes and can be used as an effective nano-carrier to deliver the extract to the target tissue with further studies.

Keywords: Nano-carriers, Niosomes, *Artemisia chamemifolia*, Antibacterial, Anti-cancer

***Corresponding Author**
Email: Amir_mirzaie92@yahoo.com
Tel: 0098 21 5670031
Fax: 0098 21 5670031

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2021; Vol. 25, No 2, Pages 839-849

Please cite this article as: Dabaghian-Amiri A, Mirzaie A, Ali-Asgari E, Mahmoodzadeh 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.

بررسی اثرات بیولوژیکی نانوحامل نیوزوم حاوی عصاره گیاه درمنه بابونه‌ای (*Artemisia chamaemelifolia* Vill) بر بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* در رده سلولی سرطان پستان (MCF-7)

علی دباغیان‌امیری [۱]، امیر میرزایی [۲*]، الهه علی‌عسگری [۳]، افشین محمودزاده [۴]

خلاصه:

سابقه و هدف: نیوزوم‌ها، وزیکول‌های چندلایه‌ای هستند که امروزه به‌عنوان یکی از سیستم‌های نوین انتقال هدفمند دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند. هدف از این مطالعه، سنتز نانوحامل نیوزوم حاوی عصاره گیاه درمنه بابونه‌ای (*Artemisia chamamelifolia*) و بررسی اثرات بیولوژیکی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق از دی‌ماه ۱۳۹۸ تا شهریور ۱۳۹۹ به انجام رسید، نانوحامل نیوزومی با استفاده از روش فیلم لایه نازک ساخته و عصاره گیاه درمنه بابونه‌ای در آن بارگذاری شد. به دنبال آن، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM، FTIR و DLS مورد تأیید قرار گرفت. در انتها، اثرات ضدّمیکروبی و ضدّسرطانی آن علیه رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) بررسی شد و میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان داد که نانوحامل نیوزوم سنتزشده حاوی عصاره، دارای ساختار کروی می‌باشد و اندازه آن کمتر از ۲۰۰ نانومتر است. همچنین مشخص شد که نانوحامل نیوزوم حاوی عصاره، دارای اثرات ضدّمیکروبی و ضدّسرطانی معناداری نسبت به عصاره آزاد می‌باشد و به‌ترتیب باعث افزایش و کاهش بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* به میزان (*P*<۰/۰۱) ۴/۱۶±۰/۴۱ و (*P*<۰/۰۱) ۰/۶۱ ±۰/۱۷ (*P*<۰/۰۵) شد.

نتیجه‌گیری: نانوحامل نیوزوم یکی از بسترهای مناسب برای دارورسانی جهت اهداف سمّیت سلولی و ضدّمیکروبی می‌باشد و می‌توان در آینده با مطالعات بیشتر به عنوان نانوحامل جهت رساندن عصاره به سلول هدف استفاده نمود.

واژگان کلیدی: نانوحامل، نیوزوم، درمنه بابونه‌ای، ضدّباکتریایی، ضدّسرطانی

دو ماه‌نامه علمی – پژوهشی فیض، دوره بیست و پنجم، شماره ۲، خرداد – تیر ۱۴۰۰، صفحات ۸۴۹-۸۳۹

مقدمه

نانوحامل نیوزوم‌ها یا وزیکول‌های سورفکتانت غیریونی، ساختار لایه‌لایه‌ای بسیار کوچکی هستند که از مخلوط سورفکتانت غیریونی آلکیل یا دی‌آلکیل پلی‌گلیسرول اتر، کلسترول و سپس هیدراسیون در محیط آبی به‌دست می‌آیند [۱]. نیوزوم‌ها دارای ساختار منحصربه‌فردند، به‌طوری‌که مواد آب‌گریز را در قسمت لیپیدی خود و مواد آب‌دوست را در داخل هسته آبی کپسول می‌کنند [۲]. نیوزوم‌ها قادرند انواع مختلفی از داروها، پروتئین‌ها و واکسن‌ها را در خود به دام بیندازند و در سال‌های اخیر از جمله سیستم‌های جدید داروسازی می‌باشند که بر روی آن‌ها مطالعات بسیاری انجام شده است [۴،۳].

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

۳. گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴. گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**

تهران-پرند، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۲۱ ۵۶۷۳۳۰۰۱ **دورنویس:** ۰۲۱ ۵۶۷۳۳۰۰۱

پست الکترونیک: Amir_mirzaie92@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۷ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۴۰۰/۲/۱۱

نیوزوم‌ها همانند سایر سیستم‌های وزیکولار، مزایای زیادی، ازقبیل طولانی‌کردن زمان اقامت داروی موجود در سیستم گردش خون، دارورسانی هدفمند به اعضا و بافت‌های مشخص و آزادسازی کنترل‌شده دارو و زیست تخریب‌پذیر بودن و غیرایمونوژنیک بودن دارند [۵]. یکی از کاربردهای مهمّ نانوحامل نیوزوم، رسانش دارو به‌صورت هدفمند به سلول‌های سرطانی و میکروبی می‌باشد [۶]. یکی از سرطان‌های پرشیوع در سرتاسر دنیا، سرطان پستان می‌باشد [۷]. مطالعات نشان می‌دهد که در ایران سالانه هشت هزار نفر به سرطان پستان مبتلا می‌شوند و شیوع ابتلا به سرطان پستان در بین زنان ایرانی حدود ۳۰ تا ۳۵ مورد در ۱۰۰ هزار نفر است [۸]. معمولاً درمان رایج این سرطان سه روش شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و جراحی می‌باشد. استفاده از این روش‌های درمانی، عوارض جانبی زیادی به دنبال دارد که باعث کاهش کیفیت زندگی مبتلایان به سرطان پستان می‌شود [۹]. از این‌رو، محققان به دنبال یافتن راهکارهای جدید و ترکیبات ضدّتوموری دیگر مانند عصاره‌های گیاهی می‌باشند که عوارض کمتری نسبت به روش‌های شیمی‌درمانی دارد [۱۰]. امروزه عصاره‌های گیاهی و مشتقات آن‌ها به عنوان کاندید دارو در کشورهای در حال توسعه ۸۰ درصد را به

خود اختصاص داده است [۱۱]. همچنین یکی دیگر از کاربردهای عصاره‌های گیاهی، اثرات ضدّمیکروبی آن‌ها می‌باشد [۱۲]. مطالعات نشان داده است که ترکیبات ثانویه موجود در عصاره گیاه، مانند آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها، تانن‌ها، گلیکوزیدها، ترپن‌ها و ترکیبات فنلی، مسؤول ایجاد اثرات ضدّباکتریایی می‌باشند [۱۳]. ترکیبات ثانویه مختلفی، مانند camphor، germacrene D، trans-pinocarveol، β-caryophyllene و Artemisia ketone در عصاره جنس این گیاه شناسایی شده‌اند که مسؤول اثرات ضدّباکتریایی هستند [۱۴]. گیاه درمنه بابونه‌ای (*Artemisia chamaemelifolia* Vill) یکی از گیاهان دارویی از خانواده کاسنی (Asteraceae) می‌باشد [۱۵]. این گیاه ۳۰ تا ۵۰ سانتی‌متر ارتفاع دارد و طبّ سنتی از این گیاه، به‌عنوان ضدّعفونی‌کننده، ضدّانگل، تب‌بر و ضدّدرد استفاده می‌کنند [۱۶]. مطالعات مختلفی در زمینه بررسی اثرات سمّیت سلولی و ضدّمیکروبی عصاره گیاهان جنس درمنه انجام شده است. معلّم‌زاده و همکارانش اثرات سمّیت سلولی عصاره گیاه درمنه دشتی (*Artemisia sieberi*) را بر روی رده سلولی سرطان پستان (SKBr3) مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که این عصاره در غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای خاصیت سلول‌کشی ۵۰ درصد می‌باشد و می‌تواند منجر به متوقف شدن چرخه سلولی شود [۱۷]. فتحی و همکارانش در سال ۱۳۹۹ اثرات ضدّمیکروبی و ضدّسرطانی عصاره گیاه درمنه ترکمنی (*Artemisia turcomanica*) را علیه رده سلولی سرطان معده (AGS) مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره گیاه، اثرات ضدّمیکروبی چشمگیری بر روی باکتری اشرشیا کلی دارد و در مدت‌زمان ۲۴ ساعت باعث کاهش بقای سلولی معناداری نسبت به گروه کنترل می‌شود [۱۸]. سفالیان و همکارانش در سال ۱۳۹۹ اثرات ضدّسرطانی عصاره هیدروالکلی گیاه درمنه ایرانی (*Artemisia persica*) را علیه رده سلولی سرطان معده (AGS) مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره درمنه ایرانی دارای سمّیت سلولی وابسته به دوز و زمان می‌باشد و می‌تواند آپوپتوز را القا کند [۱۹]. Risaliti و همکارانش در سال ۲۰۲۰ اثرات ضدّمیکروبی عصاره گیاه درمنه خزری (*Artemisia annua*) انکپسوله‌شده در لیپوزوم را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان انکپولاسیون درحدود ۷۵ درصد می‌باشد و اثرات ضدّمیکروبی و ضدّقارچی معناداری دارد [۲۰]. با توجه به خواص مفید و استفاده از این گیاه در طبّ سنتی و این‌که مطالعات کمی در زمینه اثرات بیولوژیکی عصاره این گیاه انجام شده است، در این مطالعه برای اوّلین‌بار نانوحامل نیوزوم بارگذاری‌شده با عصاره گیاه درمنه بابونه‌ای با هدف بررسی اثرات ضدّمیکروبی و ضدّسرطانی آن سنتز گردید و خصوصیات آن مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مقاله، حاصل پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی‌ارشد تحت‌عنوان سنتز بررسی اثرات ضدّمیکروبی و ضدّسرطانی نانوحامل نیوزومی بارگذاری‌شده با عصاره گیاه درمنه بابونه‌ای می‌باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق با کد ۹۲۴۰۶ و کد اخلاق IR.IAU. TMB.REC. 22.156 مصوب شده است.

جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری

این مطالعه آزمایشگاهی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق از دی‌ماه ۱۳۹۸ تا شهریور ۱۳۹۹ به انجام رسید. گیاه درمنه بابونه‌ای از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران با شماره هرباریومی P ۱۰۰۵۹۳۱ تهیه شد (محلّ رویش اصلی این گیاه سیب شمالی البرز می‌باشد). برای تهیه عصاره اتانولی اندام هوایی گیاه به روش ماسراسیون، میزان ۴۰ گرم از اندام هوایی گیاه را به ۱۰۰ میلی‌لیتر از اتانول اضافه نمودیم و به‌مدت ۲۴ دقیقه در استیرر هم زده شد. عصاره به‌دست‌آمده توسط کاغذ صافی، فیلتر و وارد دستگاه روتاری شد [۲۱].

تهیه نیوزوم‌ها به روش هیدراسیون لایه‌نازک

برای تهیه نمونه‌ها، ابتدا مقادیر مشخص از کلسترول، اسپن ۶۰ و توئین ۶۰ در مخلوط حلال‌های کلروفرم و متانول (نسبت ۲ به ۱) حل شد. سپس محلول حاصل، کاملاً هم زده شد تا اجزا به‌طور کامل حل شوند. سپس در بالن مخصوص روتاری ریخته شد و تحت شرایط موردنظر (دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ rpm) در خلأ قرار گرفت تا حلال کاملاً تبخیر شود. در مرحله هیدراسیون، به فیلم لیپیدی تهیه‌شده، مقدار ۱۰ سی‌سی بافرفسفات حاوی ۱۰ میلی‌گرم عصاره درمنه (۱ mg/mL) در دمای بالای انتقال فاز (۶۰ درجه سانتی‌گراد) اضافه شد و با استفاده از روتاری با سرعت rpm ۱۲۰ به‌مدت نیم‌ساعت برای هیدراته شدن مناسب چرخید. پس از اتمام مراحل هیدراسیون، به‌منظور کاهش اندازه ذرّه‌ای، عمل سونیکاسیون به‌مدت ۷ دقیقه انجام شد [۲۲].

محصورسازی عصاره در نیوزوم و بررسی کارایی محصورسازی

کارایی محصورسازی بیانگر نسبت داروی محصورشده در ساختار نیوزوم نسبت به داروی اوّلیه مورداستفاده است. بدین‌منظور، ابتدا فرمولاسیون نیوزومی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت g ۱۴۰۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه تحت سانتریفیوژ قرار داده شد. نیوزوم حاوی دارو رسوب می‌کند و داروی آزاد در سوپرناتانت باقی می‌ماند. جذب نمونه سوپرناتانت در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط

اسپکتروفتومتر خوانش شد و مقدار عصاره آزاد محاسبه‌شده، از مقدار عصاره اوّلیه کم و از روی آن میزان درصد کارایی محصورسازی محاسبه شد:

میزان عصاره آزاد- میزان عصاره = میزان درصد محصورسازی

اوّلیه/ میزان عصاره اوّلیه × ۱۰۰

همچنین فرمولاسیون‌های مختلف نیوزوم، براساس غلظت مولی Span 60/Tween 60 تهیه گردید و اندازه نیوزوم‌های سنتزشده و میزان درصد انکپسولاسیون نیز به دست آمد [۲۳].

بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نیوزوم‌های سنتزشده

به‌منظور بررسی خصوصیات مورفولوژی نانوحامل نیوزوم سنتزشده بارگذاری‌شده با عصاره از روش میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) استفاده گردید. همچنین به‌منظور تعیین سایز از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) استفاده شد و جهت بررسی گروه‌های عاملی سطح نانوحامل نیوزوم‌های تولیدشده روش آنالیز طیف‌سنجی زیرمادون‌قرمز (FTIR) به کار رفت [۲۳]. جهت اندازه‌گیری قطر دینامیکی نانوذرّات (سایز) از دستگاه زتاسایزر (DLS) استفاده شد. جهت بررسی سایز ذرّات در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد از این دستگاه مجهز به لیزر سبز با طول موج ۶۳۳ نانومتر به روش تفرق دینامیک نور استفاده گردید. اندازه نانوذرّه در واقع میانگین قطر ذرّات است که به‌صورت Z-Average و بر حسب نانومتر نشان داده می‌شود. جهت انجام SEM، سوسپانسیون نانوذرّه تهیه‌شده در آب دیونیزه، با نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد و یک قطره از نمونه بر روی یک فیلم هادی نظیر آلومینیوم پخش شد و در دمای اتاق خشک گردید. در روش FTIR جهت تشخیص شناسایی پیوندهای شیمیایی ایجادشده از دستگاه مادون قرمز (Thermo Nicolet مدل Nexus 870) ساخت کشور آمریکا) استفاده شده است.

بررسی رهایش عصاره

بررسی رهایش عصاره به‌صورت دینامیک مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. بدین‌صورت که در کیسه دیالیز، مقدار ۲ میلی‌لیتر از نانوحامل نیوزومی بارگذاری‌شده با عصاره و همچنین محلول عصاره تنها (به‌صورت جداگانه) قرار داده می‌شود. هر یک از کیسه‌ها به‌صورت معلّق در مزور محتوی ۵۰ میلی‌لیتر PBS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شوند. مزورهای دارای کیسه محتوی نانوحامل نیوزوم حاوی عصاره و محلول عصاره بر روی هم‌زن قرار داده می‌شوند. در ساعت‌های مختلف از مزور نمونه‌گیری انجام می‌شود، بدین‌صورت 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، ۲، ۴، ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) انجام می‌شود. در پایان، جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه UV اسپکتروفوتومتر در طول موج بهینه انجام شد و نمودار درصد آزادسازی تجمعی عصاره از نیوزوم در طی مدت‌زمان ۷۲ ساعت رسم گردید [۲۴].

بررسی اثرات سمّیت سلولی

به‌منظور بررسی اثرات سمّیت سلولی ناحامل‌های بارگذاری‌شده با عصاره علیه رده سلول سرطانی پستان (MCF-7) از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده گردید. به این‌منظور ابتدا رده سلولی MCF-7 از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران (تهران – ایران) تهیه شد. سپس سلول‌های MCF-7 به‌طور جداگانه به میزان 10^4 سلول در هر چاهک در پلیت ۹۶ تایی به‌مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلفی از ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌صورت سه بار تکرار تیمار شدند و پس از ۴۸ ساعت انکوبه‌گذاری، محلول رنگ MTT به چاهک‌ها اضافه گردید و به‌مدت ۳ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. به دنبال آن محلول رویی خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به آن اضافه گردید و میزان جذب تمامی چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانش شد و با توجه به فرمول زیر درصد بقای سلول‌ها محاسبه گردید [۲۵]:

۱۰۰ × (جذب نوری سلول‌های کنترل / جذب نوری سلول‌های

تیمارشده) = میزان درصد بقای سلولی

بررسی میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی

در این مطالعه به‌منظور بررسی میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* از روش Real Time PCR استفاده شد. در ابتدا کلّ RNA سلول‌های تیمارشده و نشده با نانوحامل نیوزومی بارگذاری‌شده با عصاره با استفاده از کیت استخراج RNA (کیاژن، آمریکا) طبق دستورالعمل آن استخراج شد. ساخت مولکول‌های DNA مکمل با کیت سنتز cDNA (Fermentas، لیتوانی) انجام گرفت. جهت انجام Real Time PCR، از پرایمرهای اختصاصی، ژن‌های هدف *Bax* و *Bcl2* بودند و ژن بتااکتین به‌عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. توالی پرایمرهای رفت و برگشت ژن هدف *Bax* به‌صورت 5'- TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG -3' رفت، دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد و 5'- AGCTTCTTGGTGGACGCATC -3' برگشت، دمای ۶۵/۳ درجه سانتی‌گراد بود. توالی آغازگرهای رفت و برگشت ژن هدف *Bcl2* به‌صورت 5'- TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC -3' رفت، دمای ۶۷ درجه سانتی‌گراد و 5'- CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAG -3' برگشت،

دمای ۶۶/۳ درجه سانتی‌گراد و برای ژن مرجع بتااکتین به‌صورت 5'-CGTCTGCCCTATCAACTTTCG-3' رفت، دمای ۶۶/۹ درجه سانتی‌گراد و 5'-CGTTTCTCAGGCTCCCTCT-3' برگشت، دمای ۶۳/۴ درجه سانتی‌گراد است [۲۶].

بررسی اثرات ضدّمیکروبی

به‌منظور بررسی اثرات ضدّمیکروبی نانوحامل نیوزوم بارگذاری‌شده با عصاره، از روش کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) استفاده شد. تست MIC براساس CLSI به‌روش رقیق‌سازی در میکروپلیت به‌صورت سه بار تکرار برای نانوحامل بارگذاری‌شده با عصاره و عصاره تنها علیه سویه‌های میکروبی پاتوژن *Staphylococcus aureus* ATCC 25923، *Enterococcus fecalis* ATCC 29212، *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 و *Escherichia coli* ATCC 25922 انجام شد. به همه چاهک‌ها مقدار ۵ میکرولیتر از کشت میکروبی با غلظت نیم مک فارلند و میزان ۹۵ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث اضافه کردیم. به‌دنبال آن غلظت‌های ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوحامل نیوزوم بارگذاری‌شده با عصاره و عصاره تنها در چاهک‌ها اضافه گردید. در نهایت میزان MIC به‌عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری در نظر گرفته شد. همچنین از محیط کشت مولر هینتون براث فاقد باکتری به‌عنوان کنترل منفی و از چاهک حاوی باکتری استاندارد به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد[۲۷].

آنالیز آماری

آنالیز آماری این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Graph pad Prism نسخه ۸ انجام گردید و داده‌های سمّیت سلولی و بیان ژن با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت و $P<۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

سنتز نانوحامل نیوزومی و بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن در این مطالعه فرمولاسیون بهینه نانوحامل نیوزومی با نسبت مولی ۲:۱ (سورفکتانت/کلسترول) و نسبت مولی ۵۰:۵۰ (Span 60/Tween 60) با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره درمنه سنتز گردید (جدول‌های شماره‌های ۱ و ۲).

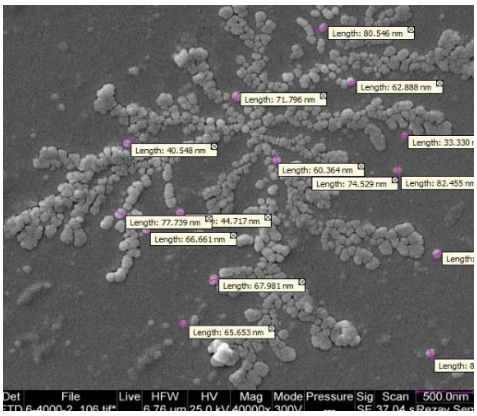
جدول شماره ۱- فرمولاسیون‌های مختلف نیوزوم سنتز شده

Formulation	Span60/Tween60 (mol ratio)	Lipid (µmol)	*Artemisia* (mg/ml)	Surf/Chol (mol ratio)	Sonication time(min)
F۱	۷۵:۲۵	۲۰۰	۱	۱:۱	۷
F۲	۵۰: ۵۰	۲۰۰	۱	۱:۱	۷
F۳	۲۵ :۷۵	۲۰۰	۱	۱:۱	۷
F۴	۷۵ :۲۵	۲۰۰	۱	۲:۱	۷
F۵	۵۰ :۵۰	۲۰۰	۱	۲:۱	۷
F۶	۲۵ :۷۵	۲۰۰	۱	۲:۱	۷

جدول شماره ۲- اندازه و میزان درصد محصورسازی نیوزوم‌های سنتزشده حاوی عصاره

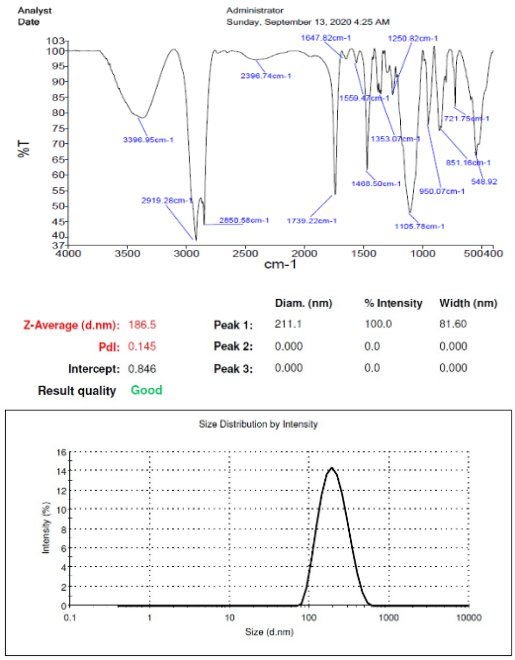
Formulation	Vesicle Size (nm)	EE (%)
F۱	۲۳۳/۹	۵۸/۹۱
F۲	۲۰۴/۱	۶۳/۵۱
F۳	۲۵۷/۹	۵۰/۳۹
F۴	۲۱۰/۵	۶۰/۵۸
F۵	۱۸۶/۵	۶۷/۹۴
F۶	۲۷۷/۲	۵۴/۰۷

در ادامه به‌منظور بررسی خصوصیات مورفولوژی نیوزوم‌های سنتزشده از روش میکروسکوپ الکترونی نگاره و DLS استفاده گردید. نتایج میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان می‌دهد که نیوزوم‌های سنتزشده دارای ساختار کروی می‌باشند (شکل شماره ۱).



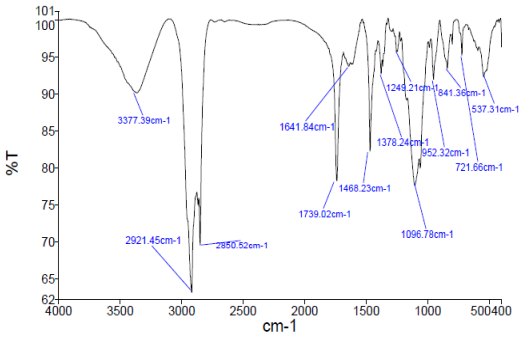
شکل شماره ۱- مورفولوژی نانوحامل‌های نیوزوم بارگذاری‌شده با عصاره. همان‌طور که مشاهده می‌شود، نیوزوم‌ها دارای ساختار کروی هستند.

همچنین نتایج DLS نشان داد که سایز نیوزوم بهینه سنتزشده ۱۸۶/۵ نانومتر می‌باشد (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲- DLS نانوحامل نیوزوم بارگذاری‌شده با عصاره. میانگین سایز نیوزوم‌های سنتزشده ۱۸۶/۵ نانومتر می‌باشد.

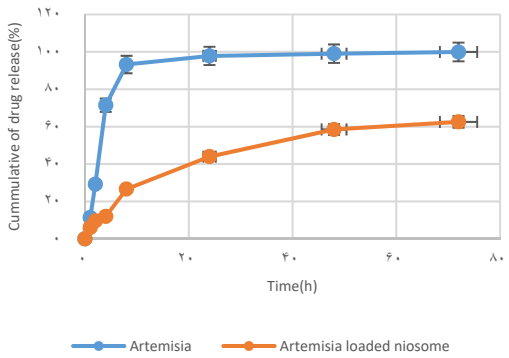
نتایج FTIR پیک‌های شاخص مربوط به گروه‌های عاملی متعلق به ترکیبات تشکیل‌دهنده نیوزوم از جمله پیک $1096\ cm^{-1}$ مربوط به پیوند الکلی C-O کششی در ساختار کلسترول و Span 60 می‌باشد. همچنین پیک‌های $2850\ cm^{-1}$ و $3377\ cm^{-1}$ مربوط به ترکیبات عصاره درمنه می‌باشد (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳- FTIR نانوحامل نیوزوم بارگذاری‌شده با عصاره. تعداد پیک‌های موجود در FTIR نشان‌دهنده وجود ترکیبات ساختار نیوزوم و عصاره گیاهی می‌باشد. A: نیوزوم خالی، B: نیوزوم حاوی عصاره

بررسی الگوی رهایش دارو

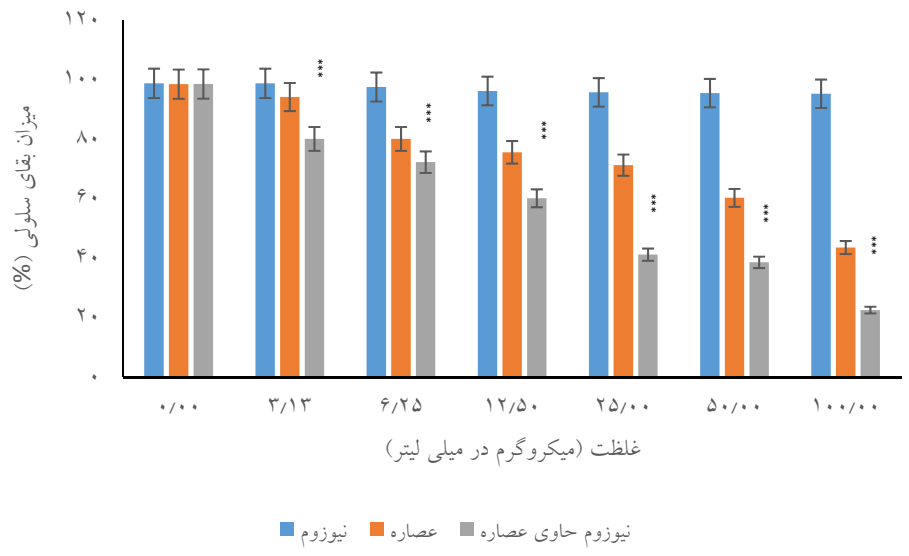
شکل شماره ۴ نشان‌دهنده روند آزادسازی تجمعی فرم محلول عصاره و نانوحامل حاوی عصاره در محیط آزادسازی PBS در طی ۷۲ ساعت می‌باشد. برای شبیه‌سازی و نزدیک کردن محیط آزادسازی برون‌تنی به شرایط واقعی و درون‌تنی از محیط آزادسازی PBS برای فاز گیرنده استفاده شد که همان‌طور که در شکل بالا مشهود است، آزادسازی دارو از فرم نانوحامل (۴۰ درصد) کمتر از محلول عصاره (۱۰۰ درصد) طی مدت ۷۲ ساعت آزادسازی بود. در آزادسازی محلول عصاره، ۹۲ درصد عصاره طی ۸ ساعت اوّل در محیط آزاد شد، ولی برای نانوحامل حاوی عصاره، طی ۸ ساعت آزادسازی مقدار ۲۶ درصد عصاره از نانوحامل نیوزوم انجام شده است.



شکل شماره ۴- الگوی رهایش عصاره از نانوحامل نیوزومی بارگذاری‌شده با عصاره درمنه بابونه‌ای و عصاره تنها

بررسی اثرات سمّیت سلولی

به‌منظور بررسی اثرات سمّیت سلولی نانوحامل بارگذاری‌شده با عصاره و عصاره تنها علیه رده سلولی MCF-7 از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. تیمار سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های مختلف ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوحامل نیوزومی با استفاده از تست MTT طی مدت ۲۴ ساعت منجر به کاهش بقای زیستی سلول‌ها شد که نسبت به گروه کنترل معنادار بوده است ($P<0/05$). همچنین نتایج سمّیت سلولی عصاره تنها نشان می‌دهد که تیمار سلول‌ها با همان غلظت‌ها سبب کاهش بقای سلول‌ها شده است؛ به‌طوری‌که تنها در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل معنادار بوده است ($P<0/01$) (نمودار شماره ۱). همچنین نتایج تست MTT نشان داد که نانوحامل نیوزوم فاقد عصاره به‌تنهایی فاقد سمّیت سلولی معناداری است (شکل شماره ۵).

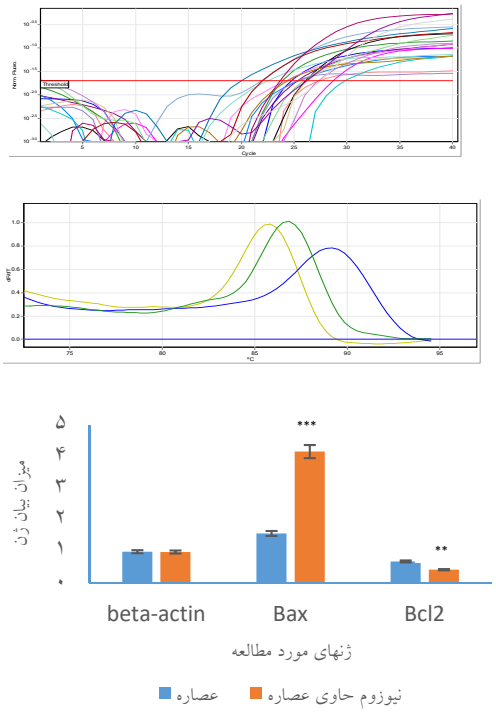


نمودار شماره ۱- نمودار ستونی اثردهی غلظت‌های مختلف نیوزوم بارگذاری‌شده با عصاره، عصاره تنها و نیوزوم فاقد عصاره در مدت‌زمان ۲۴ ساعت. در این نمودار، داده‌ها به‌صورت میانگین درصد زنده ماندن سلولی ± انحراف معیار بیان شده است. (*** P<۰/۰۰۱ : n=۳).

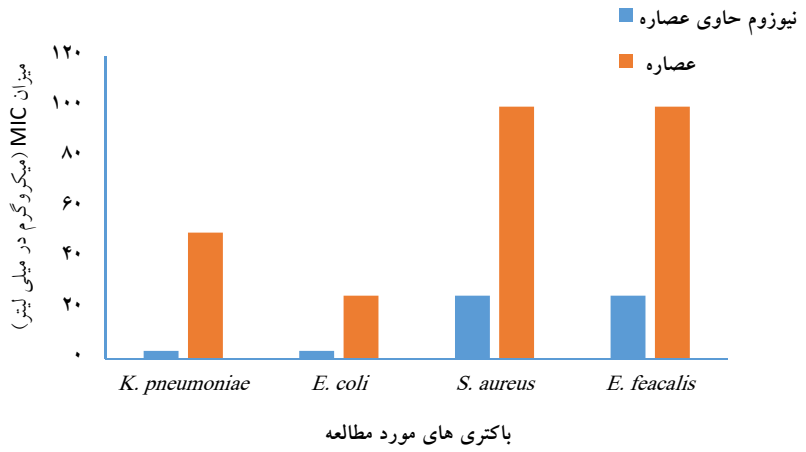
میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی

بررسی بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* در رده سلولی تیمارشده با نانوحامل نیوزومی بارگذاری‌شده با عصاره و عصاره تنها با استفاده از روش Real Time PCR مطالعه شد. نتایج نشان داد که نسبت بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* به ژن مرجع بتااکتین در رده سلولی سرطانی MCF-7 تیمارشده با نانوحامل نیوزوم بارگذاری‌شده با عصاره به‌ترتیب به میزان (P<۰/۰۱) ۴/۱۶±۰/۴۱ افزایش و (P<۰/۰۱) ۰/۴۱±۰/۱۷ (P<۰/۰۵) کاهش یافت. همچنین به دنبال تیمار سلول‌های MCF-7 تیمارشده با عصاره تنها نسبت بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* به ژن مرجع بتااکتین به‌ترتیب به میزان (P< ۰/۰۵) ۱/۶۵ ± ۰/۲۶ افزایش و کاهش (P>۰/۰۵) ۰/۱۹ ± ۰/۶۷ یافته بود (شکل شماره ۵).

به‌منظور بررسی اثرات ضدّمیکروبی از روش رقیق‌سازی در میکروپلیت با هدف تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) استفاده شد. نتایج نشان داد که نانوحامل بارگذاری‌شده با عصاره دارای میزان MIC ۲ تا ۴ برابر کمتر نسبت به عصاره تنها بود. همچنین نتایج نشان داد که نانوحامل نیوزومی بارگذاری‌شده با عصاره، اثرات ضدّمیکروبی معنادارتری علیه باکتری‌های گرم منفی *K. pneumoniae* و *E. coli* داشتند (نمودار شماره ۲).



شکل شماره ۵- a: نمودار تکثیر ژن‌های *Bax*، *Bcl2* و بتااکتین. b: آنالیز منحنی ذوب برای ژن‌های *Bax* (رنگ زرد)، *Bcl2* (سبز) و بتااکتین (رنگ آبی). c: میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* در مقایسه با ژن کنترل بتااکتین. (**: P <۰/۰۱ ، *** P<۰/۰۰۱ : n=۳).



نمودار شماره ۲- بررسی خاصیت مهارکنندگی (MIC) نیوزوم حاوی عصاره و عصاره تنها علیه باکتری‌های مورد مطالعه. همان‌طور که مشاهده می‌شود، نیوزوم حاوی عصاره دارای MIC کمتری نسبت به عصاره تنها می‌باشد که نشان‌دهنده اثرات ضدّباکتریایی معناداری نسبت به عصاره تنها می‌باشد.

بحث

به‌طور کلی عصاره گیاهان دارویی از زمان‌های قدیم در طبّ سنتی جهت اهداف درمانی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۲۸]. در این مطالعه عصاره گیاه درمنه بابونه‌ای جهت بررسی اثرات ضدّمیکروبی و ضدّسرطانی استفاده شد. یکی از محدودیت‌های استفاده از عصاره تام، عدم دارورسانی به بافت هدف است و امروز محققان به دنبال راهکارهای ارسال هدفمند دارو به سمت بافت هدف می‌باشند [۲۹]. یکی از راهکارها، استفاده از نانوحامل‌ها به‌خصوص نیوزوم‌ها می‌باشند که زیست تخریب‌پذیر و غیرایمونوژن هستند [۳۰]. در این مطالعه، عصاره گیاه درمنه بابونه‌ای در نانوحامل نیوزوم با استفاده از روش هیدراسیون لایه‌نازک بارگذاری شد. نانوحامل نیوزوم در نسبت مولی ۵۰:۵۰ (Span 60/Tween 60) و نسبت مولی ۲:۱ (سورفکتانت/کلسترول) با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره درمنه بابونه‌ای سنتز گردید. مطالعات نشان داده است که اثر غلظت کلسترول بر روی میزان محصورسازی دارو به فاکتورهای مختلفی بستگی دارد. با افزایش مقدار کلسترول، خاصیت چربی‌دوستی و پایداری دو لایه افزایش و نفوذپذیری کاهش می‌یابد، بنابراین دارو می‌تواند به‌طور مؤثرتری درون دو لایه وزیکول به دام بیفتد. اما افزایش زیاد مقدار کلسترول باعث رقابت بین دارو و کلسترول برای قرارگیری در فضای بین دو لایه می‌شود و دارو به‌صورت واردنشده در ساختار باقی می‌ماند[۳۱]. در این مطالعه، مورفولوژی نیوزوم‌های تهیه‌شده با میکروسکوپ نگاره نشان داد که نانوحامل نیوزومی تهیه‌شده با روش هیدراسیون لایه نازک، وزیکول‌هایی چند لایه با سایز زیر ۲۰۰ نانومتر و پراکندگی ذرات مناسب هستند. همچنین میزان رهایش عصاره از نانوحامل نیوزومی نسبت به عصاره تنها، آهسته‌رهش بوده که از نقطه‌نظر فارماکولوژی بسیار بااهمیت می‌باشد. مطالعات زیادی در زمینه سنتز نانوحامل نیوزومی حاوی عصاره‌ها و داروهای مختلف به انجام رسیده است. Shah و همکارانش در سال ۲۰۲۰ نانوحامل نیوزومی حاوی withaferin ماده مؤثره عصاره گیاه گیلاس زمستانی (*Withania somnifera*) را به‌منظور افزایش خصوصیات ضدّسرطانی آن سنتز نمودند. نتایج این مطالعه نشان داد که سایز نانوحامل نیوزوم بارگذاری‌شده ۲۷۸±۵ نانومتر با بازدهی بارگذاری ۸۷±۳٪ بود. همچنین نتایج SEM نشان داد که نانوحامل نیوزوم سنتزشده دارای ساختار کروی می‌باشد که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد [۳۲]. Ying-Qi و همکارانش در سال ۲۰۱۵ ماده مؤثره گیاه زردچوبه (*Curcuma longa*) به نام کورکومین را در ساختار نانوحامل نیوزوم بارگذاری نمودند. در این مطالعه به‌منظور سنتز نانوحامل نیوزوم از Span 80، Tween 80 و Poloxamer 188 استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بارگذاری کورکومین به میزان ۹۲/۳±۰/۴ درصد و میزان رهایش کورکومین به‌صورت کنترل‌شده و آهسته‌رهش بوده که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد [۳۳]. بارانی و همکارانش در سال ۲۰۱۸ ماده مؤثره عصاره گیاه برگ حنا (*Lawsonia inermis*) به نام Lawsone را داخل نانوحامل نیوزومی به‌منظور افزایش اثرات ضدّسرطانی بارگذاری نمودند. نتایج نشان داد که نیوزوم‌های سنتزشده دارای اندازه ۲۵۰ نانومتر و دارای پتانسیل زتا منفی بودند و اثرات سمّیت سلولی معناداری علیه رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) داشتند [۳۴]. رئیس‌زاده و همکارانش در سال ۲۰۱۸ با استفاده از سیستم نیوزومی، عصاره گیاه *Myrtus communis* را در آن انکپسوله کردند. ساختار نیوزوم سنتزشده، متشکل از Span 60، Tween

60 و کلسترول بود و اثرات ضدّباکتریایی آن را علیه پاتوژن‌های میکروبی استافیلوکوکوس اورئوس، *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس*، *اشرشیا کلی*، *میکروکوکوس لوتئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره انکپسوله‌شده در نیوزوم خاصیت ضدّباکتریایی بیشتری نسبت به عصاره تنها داشت، به‌طوری‌که میزان غلظت مهارکنندگی به‌طور معناداری کمتر از عصاره تنها بود [۳۵]. نتایج این مطالعه با مطالعه حاضر از این‌جهت هم‌خوانی داشت که عصاره انکپسوله‌شده در نیوزوم دارای خاصیت ضدّمیکروبی معناداری نسبت به عصاره تنها می‌باشد. یکی دیگر از اهداف این مطالعه، بررسی اثرات سمّیت سلولی و بررسی بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* نانوحامل نیوزوم بارگذاری‌شده با عصاره درمنه بابونه‌ای و مقایسه آن با عصاره تنها علیه رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) بود. نتایج مطالعه ما نشان داد که نانوحامل حاوی عصاره نسبت به عصاره، دارای اثرات سمّیت سلولی معنادارتری بود و سمّیت سلولی آن به‌صورت وابسته به دوز است. یکی از مکانیسم‌های اثرات سمّیت سلولی نانوحامل بارگذاری‌شده با عصاره و عصاره تنها می‌تواند به این دلیل باشد که نیوزوم‌ها می‌توانند با غشای سلول هدف فیوژ شوند و عصاره را به‌صورت هدفمند به درون سلول وارد کنند [۳۶]. همچنین نتایج نشان داد که نانوحامل فاقد عصاره، فاقد سمّیت سلولی معناداری می‌باشد که نشان می‌دهد نانوحامل نیوزوم با محیط زیست سازگار است و می‌تواند به‌عنوان نانوحامل جهت اهداف دارورسانی استفاده شود. نتایج مطالعه ما نیز نشان داد که نانوحامل بارگذاری‌شده با عصاره می‌تواند بیان ژن *Bax* را افزایش و *Bcl2* را کاهش دهد که نشان‌دهنده القای آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 می‌باشد. به‌طورکلی، یکی از گزینه‌ها در درمان سرطان، فعال‌کردن مسیرهای آپوپتوز در سلول‌های توموری می‌باشد. تاکنون بسیاری از ترکیبات گیاهی گزارش شده‌اند که به‌دلیل القای آپوپتوز می‌توانند به‌عنوان ترکیب ضدّتوموری مورد استفاده قرار گیرند [۳۷]. Choi و همکارانش اثرات ضدّسرطانی عصاره گیاه درمنه کره‌ای (*Artemisia princeps* var. Orientalis) را علیه رده سلولی HepG2 و Hep3B مورد مطالعه قرار دادند [۳۸]. بررسی اثرات ضدّمیکروبی نانوحامل بارگذاری‌شده با عصاره، یکی دیگر از اهداف مطالعه ما بود. نتایج مطالعه نشان داد که نانوحامل حاوی عصاره، دارای اثرات ضدّمیکروبی معنادارتری نسبت به عصاره تنها بود؛ به‌طوری‌که میزان MIC بین ۲ تا ۴ برابر کاهش یافته بود که این نتایج بیانگر دارورسانی هدفمند توسط نانوحامل نیوزوم بود.

همچنین نتایج نشان داد که میزان اثربخشی نانوحامل نیوزوم بارگذاری‌شده با عصاره نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیشتر بود که به این دلیل می‌باشد که باکتری‌های گرم مثبت دارای پپتیدوگلیکان ضخیم‌تر نسبت به باکتری‌های گرم منفی هستند که مانع نفوذ بیشتر عصاره به درون سلول می‌شود [۳۹]. Donato و همکارانش اثرات ضدّمیکروبی اسانس گیاه درمنه خزری (*Artemisia annua*) را علیه باکتری‌های *E. coli O157*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس این گیاه دارای اثرات ضدّمیکروبی معناداری علیه پاتوژن‌های مورد مطالعه دارد. Vieira و همکارانش اثرات ضدّمیکروبی اسانس گیاه درمنه رومی (*Artemisia absinthium*) را مورد مطالعه قرار دادند. محققان گزارش کردند که اسانس این گیاه دارای اثرات میکروب‌کشی علیه باکتری‌های *Streptococcus mutans* و *Streptococcus mitis* می‌باشد [۴۰]. Cui و همکارانش اثرات ضدّباکتریایی اسانس *Artemisia annua* محصورشده در نانوذرّه کیتوزان را علیه باکتری *Escherichia coli* O157:H7 مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان محصورسازی اسانس در کیتوزان ۶۷/۴۵ درصد می‌باشد و اثرات باکتریواستاتیک دارد و می‌تواند به‌عنوان یک فیلم ضدّمیکروبی مورد استفاده قرار گیرد[۴۱]. نقطه‌نظر مشابه تمامی این مطالعات با مطالعه ما اثرات معنادار عصاره گیاه درمنه می‌باشد که نشان‌دهنده ترکیبات ثانویه فعال در عصاره این گیاه است که می‌تواند اثرات ضدّمیکروبی داشته باشد. یکی از اختلافات مطالعه ما با سایر مطالعات، انکپسوله کردن عصاره در ساختار نیوزومی می‌باشد که برای اوّلین‌بار انجام گرفته است و نتایج مطالعه ما نشان‌دهنده افزایش اثرات ضدّمیکروبی عصاره محبوس‌شده در نیوزوم نسبت به عصاره آزاد می‌باشد که بیانگر دارورسانی هدفمند و افزایش آزادسازی عصاره به درون سلول میکروبی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج مطالعه نشان داد که نانوحامل نیوزوم بارگذاری‌شده با عصاره درمنه بابونه‌ای نسبت به عصاره تنها می‌تواند اثرات ضدّسرطانی و ضدّمیکروبی معنادارتری داشته باشد و نانوحامل نیوزوم تنها فاقد اثرات سمّیت سلولی می‌باشد و می‌توان در آینده با مطالعات بیشتر، از این نانوحامل جهت اهداف دارورسانی هدفمند استفاده کرد.

References:

[1] Hedayati Ch M, Abolhassani Targhi A, Shamsi F, Heidari F, Salehi Moghadam Z, Mirzaie A, et al. Niosome-encapsulated tobramycin reduced antibiotic resistance and enhanced antibacterial activity against multidrug-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. ***J Biomed Mater Res A*** 2020; 2(1): 21-30.

[2] Hemati M, Haghiralsadat F, Yazdian F, Jafari F, Moradi A, Malekpour-Dehkordi Z. Development and characterization of a novel cationic PEGylated niosome-encapsulated forms of doxorubicin, quercetin and siRNA for the treatment of cancer by using combination therapy. ***Artif Cells Nanomed Biotechnol*** 2019; 47(1): 1295-311.

[3] Shabani A, Atyabi F, Khoshayand MR, Mahbod R, Cohan RA, Akbarzadeh I, Bakhshandeh H. Design of experiment, preparation, and in vitro biological assessment of human amniotic membrane extract loaded nanoparticles. ***Curr Pharm Biotechnol*** 2020; 21(3): 256-67.

[4] 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*** 2018; 26(1): 11-7.

[5] Mirzaie A, Peirovi N, Akbarzadeh I, Moghtaderi M, Heidari F, Yeganeh FE, et al. Preparation and optimization of ciprofloxacin encapsulated niosomes: A new approach for enhanced antibacterial activity, biofilm inhibition and reduced antibiotic resistance in ciprofloxacin-resistant methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. ***Bioorg Chem*** 2020; 103: 104231.

[6] Heidari F, Akbarzadeh I, Nourouzian D, Mirzaie A, Bakhshandeh H. Optimization and characterization of tannic acid loaded niosomes for enhanced antibacterial and anti-biofilm activities. ***Adv Powder Technol*** 2020; 4768-81.

[7] Lyons TG. Targeted therapies for triple-negative breast cancer. ***Curr Treat Options Oncol*** 2019; 20(11): 82.

[8] Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Mousavi Jarrahi A, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. ***Breast J*** 2020; 13(4): m383-91.

[9] Rossi L, Mazzara C, Pagani O. Diagnosis and treatment of breast cancer in young women. ***Curr Treat Options Oncol*** 2019; 20(12): 86.

[10] Lee MM, Chan BD, Wong WY, Qu Z, Chan MS, Leung TW, et al. Anti-cancer activity of *Centipeda minima* extract in triple negative breast cancer via inhibition of AKT, NF-κB, and STAT3 signaling pathways. ***Front Oncol*** 2020 9; 10: 491.

[11] Al-Zharani M, Nasr FA, Abutaha N, Alqahtani AS, Noman OM, Mubarak M, Wadaan MA. Apoptotic induction and anti-migratory effects of *Rhazya stricta* fruit extracts on a human breast cancer cell line. ***Molecules*** 2019; 24(21): 3968.

[12] Nazliniwaty N, Laila L. Formulation and antibacterial activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng leaves ethanolic extract as herbal mouthwash against halitosis caused bacteria. ***Open Access Maced J Med Sci*** 2019; 7(22):900-3.

[13] Guo L, Gong S, Wang Y, Sun Q, Duo K, Fei P. Antibacterial activity of olive oil polyphenol extract against *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus:* possible mechanisms. ***Foodborne Pathog Dis*** 2020; 17(6): 396-403.

[14] Singh B, Sharma RA. Secondary metabolites of medicinal plants: ethnopharmacological properties, biological activity and production strategies. ***Daru*** 2020; 3: 10-26.

[15] Abhay K. Pandey and Pooja Singh. The genus Artemisia: a 2012-2017 literature review on chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of essential oils. ***Medicines (Basel)*** 2017; 4(3): 68.

[16] Singh P, Pandey AK. Prospective of essential oils of the genus Mentha as biopesticides*: A Review*. ***Front Plant Sci*** 2018; 9: 1295.

[17] Moalemzadeh Sh, Rajabbeigi E, Montazeri, M. Investigation on cytotoxic effect of hydroalcoholic extract of *Artemisia sieberi* on SKBr3cell line. ***J Cell Tissue*** 2020; 10(4): 252-60.

[18] Fathi N, Tafvizi F, Mirzaie A. Antibacterial and anti-cancer activities of *Artemisia turcomanica* extract on gastric cancer cell line (AGS) and its interaction on cyclin D1 and cyckin E genes. ***J Med Plants*** 2020; 19 (74): 163-76. [in Persian]

[19] 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). ***Gene Eng Biotechnol J*** 2020; 9 (1): 1-10. [in Persian]

[20] Risalitia L, Pinib G, Ascrizzi R, Donato R, Sacco C, Bergonzi MC, et al. *Artemisia annua* essential oil extraction, characterization, and incorporation in nanoliposomes, smart drug delivery systems against Candida species. ***J Drug Del Sci Technol*** 2020; 59: 101849.

[21] Jiang M, Zhao S, Yang S, Lin X, He X, Wei X, et al. An "essential herbal medicine"-licorice: A review of phytochemicals and its effects in combination preparations. ***J Ethnopharmacol*** 2020; 249: 112439.

[22] Ghafelehbashi R, Akbarzadeh I, Tavakkoli Yaraki M, Lajevardi A, Fatemizadeh M, Heidarpoor Saremi L. Preparation, physicochemical properties, in vitro evaluation and release behavior of cephalexin-loaded niosomes. ***Int J Pharm*** 2019; 569: 118580.

[23] Wichayapreechar P, Anuchapreeda S, Phongpradist R, Rungseevijitprapa W, Ampasavate C. Dermal targeting of *Centella asiatica* extract

using hyaluronic acid surface modified niosomes. ***J Liposome Res*** 2020; 30(2): 197-207.
[24] Saeed Shah H, Usman F, Ashfaq–Khan M. Preparation and characterization of anticancer niosomal withaferin–A formulation for improved delivery to cancer cells: In vitro, in vivo, and in silico evaluation. ***J Drug Del Sci Tech*** 2020; 59: 101863.
[25] Xu Y, Chen W, Tsosie J, Xie X, Li P, Wan JB, et al. Niosome encapsulation of curcumin: characterization and cytotoxic effect on ovarian cancer cells. ***J Nano*** 2016; Article ID 6365295
[26] 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*** 2018; 26(1): 11-7.
[27] Bartelds R. Niosomes, an alternative for liposomal delivery. ***PLoS One*** 2018; 13(4): e0194179.
[28] Michel J, Abd Rani NZ, Husain Kh. A Review on the potential use of medicinal plants from Asteraceae and Lamiaceae plant family in cardiovascular diseases. ***Front Pharmacol*** 2020; 12:5-19.
[29] Morteza-Semnani K, Saeedi M, Akbarzadeh M. Essential Oil Composition of *Artemisia chamaemelifolia* Vill. ***J Essential Oil Res*** 2011; 5: 18-26.
[30] Akbarzadeh I, Fatemizadeh M, Heidari F, Mousavi Niri N. Niosomal formulation for co-administration of hydrophobic anticancer drugs into MCF-7 cancer cells. ***Arch Adv Biosci*** 2020; 11(2): 1-9.
[31] Akbari J, Saeedi M, Enayatifard R. Curcumin Niosomes (curcusomes) as an alternative to conventional vehicles: A potential for efficient dermal delivery. ***J Drug Del Sci Technol*** 2020; 60: 102035.
[32] Shaha SH, Usman F. Preparation and characterization of anticancer niosomal withaferin–A formulation for improved delivery to cancer cells: In vitro, in vivo, and in silico evaluation. ***J Drug Del Sci Technol*** 2020; 59: 101863.
[33] Ying-Qi X, Chen W. Niosome encapsulation of curcumin: characterization and cytotoxic effect on ovarian cancer cells***.*** ***J Nano*** 2016; 63: 2-16.
[34] Barani M. In vitro cytotoxicity assay of D-limonene niosomes: an efficient nano-carrier for enhancing solubility of plant-extracted agents. ***Daru*** 2018; 26: 11-7.
[35] Raeiszadeh M. Development, physicochemical characterization, and antimicrobial evaluation of niosomal myrtle essential oil. ***Res Pharm Sci*** 2016; 1: 12-21.
[36] Abdelkader H. Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): self-assembly, fabrication, characterization, drug delivery applications and limitations. ***Drug Del*** 2014; 21: 87-100.
[37] 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): 173-86.
[38] Choi EJ, Kim GH. Antioxidant and anticancer activity of *Artemisia princeps* var. orientalis extract in HepG2 and Hep3B hepatocellular carcinoma cells. ***Chin J Cancer Res*** 2013; 2: 26-28.
[39] Appalasamy S, Yann Lo K. Antimicrobial activity of Artemisinin and precursor derived from in vitro plantlets of *Artemisia annua* L. ***BioMed Res Inter*** 2014; 3: 16-28.
[40] Donatoa R, Santomauroa F. Antibacterial activity of Tuscan *Artemisia annua* essential oil and its major components against some foodborne pathogens. ***Food Sci Technol*** 2015; 64: 1251-4.
[50] Haiying C, Yuan L. Edible film incorporated with chitosan and *Artemisia annua* oil nanoliposomes for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on cherry tomato. ***Inter J Food Sci Technol*** 2017; 5: 687-98.