



Scan online to view this article

Investigation of nanoniosomal formulation containing doxorubicin effect on ovarian cancer cell line (OVCAR-3 cell line)

Mariya Ghashghaei^{1,2}, Milad Akhlaghi^{3,4}, Azim Akbarzadeh Khyavi⁵,
Bibi Fatemeh Haghirosadat^{6*}

1. Department of Biochemistry, Islamic Azad University of Fars, Science and Research Branch, Fars, Iran.
2. Department of Biochemistry, Islamic Azad University Branch Shiraz, Shiraz, Iran.
3. Department of clinical biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
4. Nano-Biotech Foresight Company Biotechnology Campus, Science & Technology Park of Yazd, Yazd, Iran
5. Department of Pilot Nanobiotechnology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
6. Nanotechnology and Tissue Engineering Research Center, Reproductive Sciences Research Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Abstract

Aim and Background: Cancer is a major cause of mortality in the world. Treatment of Cancer through drug therapy/chemotherapy faces the challenges of drug delivery. Drug delivery systems such as niosomes provided high efficiency and targeted treatment. The aim of this study was to prepare a new formula of niosomal nano system containing doxorubicin as the cancer therapy drug. Changing the tissue distribution of drug leads to drug effect improvement and reducing its cytotoxicity.

Materials and Methods: Doxorubicin encapsulated niosomes were synthesized using thin-film method. A certain amount of Span-60 and Cholesterol dissolved by chloroform in a round bottom balloon. Rotary evaporator was used in order to remove the organic solvent and form the thin-film. The thin-film was hydrated by doxorubicin and PBS solution using rotary evaporator in 10°C higher than span-60 transition phase. Entrapment Efficiency and release profile were investigated using dialysis and spectrophotometry. Size reduction was applied by probe sonicating. Nanoparticles average diameter and zeta potential was measured using DLS technique and Zeta sizer. The optimum formula was PEGylated and its cytotoxicity investigated through MTT assay on Ovarian cancer cell line and fibroblast normal cells.

Results: The diameter of optimized and PEGylated niosomal formulation was 172.5 nm and entrapment efficiency of PEGylated doxorubicin system was about 95.83 ± 1.18 . release studies result in PBS buffer at 37°C was the sign of PEGylated nanoniosomes efficiency in controlling the drug release, which the release percent of drug after 48 hours was 20.52 and its cytotoxicity was higher than the free drug.

Conclusion: The study demonstrates using of drug delivery carriers such as synthesized nanoniosomes has an effective role in increasing the efficacy and reducing the consumed dosages of drug.

Keywords: Ovarian Cancer, Nanomedicine, Doxorubicin, Iau Science.

Corresponding author:

Nanotechnology and Tissue Engineering Research Center, Reproductive Sciences Research Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Email: Fhaghirosadat@gmail.com



برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

بررسی اثر فرمولاسیون نانو نیوزومی حاوی داکسوروبیسین بر روی سلول های سرطانی تخمدان (رده OVCAR-3)

ماریا قشقایی^{۱،۲}، میلاد اخلاقی^{۳،۴}، عظیم اکبرزاده خیای^۵، بی بی فاطمه حقیرالسادات^{۶*}

۱. گروه بیوشیمی، پردیس علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران

۲. گروه بیوشیمی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی شیراز، ایران

۳. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۴. شرکت ریز فناوریان فردانگر، مرکز زیست فناوری، پارک علم و فناوری، یزد، ایران

۵. بخش نانو بیوتکنولوژی، پایلوت، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۶. مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی و مهندسی بافت، پژوهشکده علوم تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سرطان از مهم ترین عامل های مرگ و میر در جهان است. درمان سرطان به واسطه دارو درمانی/شیمی درمانی با چالش دارو رسانی هدفمند مواجه است. نانوسامانه های دارورسانی مانند نیوزوم ها درمان پربازده و هدفمندی را فراهم ساخته اند. هدف از این مطالعه تهیه فرمول جدید نانو سامانه نیوزومی حاوی داروی داکسوروبیسین، به عنوان داروی درمان سرطان بوده است، که با تغییر در توزیع بافتی دارو منجر به بهبود اثر دارویی و کاهش سمیت آن شود.

مواد و روش ها: نیوزوم ها استفاده از روش فیلم نازک و توسط مقادیر مشخصی از اسپن ۶۰ و کلسترول به وسیله دستگاه روتاری سنتز شدند. از روش هیدراتاسیون برای بارگیری دارو درون نیوزوم ها استفاده گردید. بازده درون گیری و پروفایل رهایش با استفاده از روش های اسپکتروفتومتری و دیالیز صورت پذیرفت. قطر میانگین نانوذرات و پتانسیل زتا با استفاده از تکنیک DLS و دستگاه زتاسایزر اندازه گیری شد. فرمولاسیون بهینه پگیله شده و سمیت آن از طریق آزمون MTT بر روی رده سلولی سرطان تخمدان و سلول های طبیعی فیبروبلاستی بررسی گردید.

یافته ها: اندازه قطر فرمولاسیون نیوزومی بهینه و پگیله ۱۲۷/۵ نانومتر و راندمان بارگذاری سامانه داکسوروبیسین پگیله شده حدود ۱/۱۸±۹۵/۸۳٪ بود. نتایج مطالعه های آزادسازی در بافر PBS در ۳۷ درجه سانتی گراد نشانه کارایی نانونیوزوم های پگیله شده در کنترل رهش دارو بود، که درصد آزاد سازی دارو تا ۴۸ ساعت ۲۰/۵۲ و اثر سیتوتوکسیک آن بیش تر از فرم معمولی دارو بود.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که استفاده از حامل های دارورسانی مانند نانو نیوزوم های سنتز شده در افزایش کارایی دارو و کاهش دوز مصرفی آن مؤثر بود.

واژگان کلیدی: سرطان تخمدان، نانو نیوزوم، داکسوروبیسین، Iau Science.

مقدمه

نویسنده مسئول:

مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی و مهندسی بافت، پژوهشکده علوم تولید

مثل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد

پست الکترونیکی: Fhaghirosadat@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۲

سرطان حاصل تقسیم کنترل نشده سلولی است و در حال حاضر یکی از مهم ترین علل مرگ و میر در جهان است (۱). سرطان نوعی بیماری است که در آن سلول ها توانایی تقسیم و رشد عادی خود را از دست داده و این موضوع منجر به تسخیر، تخریب و فاسد شدن بافت سالم می شود (۲). بدین سبب درمان های جدید و هدفمند سرطان که

و نیوزومها اشاره کرد (۹). نیوزومها و بهطور کلی نانوحاملهای دارویی ویژگیهای منحصر به فردی دارند که استفاده از آنها را برای اهداف مختلف بهخصوص در زمینه داروای شیمی درمانی هم چون داکسوروبیسین مناسب می نماید. نیوزومها با تغییر توزیع زیستی داروها، غلظت تجمعی دارو را در بافت هدف افزایش داده و از تجمع دارو در بافتهای غیر هدف و سالم جلوگیری به عمل می آورند. بدین ترتیب تأثیر درمانی دارو افزایش یافته و از طرف دیگر سمیت و عوارض جانبی ناشی از جذب ناخواسته در بافتهای غیر هدف کاهش می یابد (۱۰). در این مطالعه، داکسوروبیسین درون نانوحاملهای نیوزومی پگیله محصور شده و مشخصه یابی های فیزیکوشیمیایی آن اعم از میزان درون گیری دارو، پروفایل رهایش دارو از نانوسامانه، سایز، شاخص پراکندگی، مورفولوژی ساختاری، طیف IR و سمیت سلولی بررسی گردید. از جنبه های نوآوری این مطالعه می توان به سنتز فرمولاسیون های متعدد نیوزومی و بهینه سازی آن با استفاده پلیمر (DSPE-mPEG (2000 و بررسی آن بر روی سلول های رده سرطان تخمدان (OVCAR-3) اشاره داشت.

مواد و روش ها

مواد

مواد مورد استفاده در این مطالعه شامل اسپن ۶۰، پلی-اتیلن گلیکول ((DSPE-mPEG (2000)، کلسترول، حلال های کلروفرم، DMSO و ایزوپروپیل از شرکت مرک خریداری شد. داکسوروبیسین هیدروکلراید از شرکت Cell pharma GmbH خریداری گردید. کیسه دیالیز (cut off: ۱۴-۱۲ kDa) و رنگ Dil از شرکت سیگما خریداری شد. مواد مرتبط با کشت سلول نظیر محیط کشت DMEM, FBS, Streptomycin, Penicillin, Trypsin, Amphotericin B, رنگ DAPI و MTT همگی از برند Gibco شرکت ThermoScientific خریداری گردیدند. سلول های سرطانی رده OVCAR-3 و سلول سالم فیبروپلاست از انستیتو پاستور خریداری و تهیه گردیدند.

سنتز نانوحامل های نیوزومی (MLV)

سنتز نانوحامل های نیوزومی طی فرمولاسیون های متعدد (F1-F4) با نسبت لیپید/دارو ۱:۳۰ و درصدهای وزن مولی ۹۰:۱۰، ۸۰:۲۰، ۷۰:۳۰ و ۶۰:۴۰ از اسپن ۶۰ و کلسترول به روش فیلم نازک صورت پذیرفت. روش فیلم

منجر به اختصاصیت درمان تومور و کاهش سمیت ناشی از جذب سیستمیک ناخواسته عوامل دارویی می شوند، مورد بررسی های فراوان قرار گرفته است (۳). تخمین زده می شود که در سال ۲۰۳۰ حدود ۱۵ میلیون مورد مرگ و میر ناشی از سرطان گزارش خواهد شد (۴). اگر چه انواع مختلف شیمی درمانی کمک مؤثری در درمان سرطان است، ولی بروز مقاومت چندگانه دارویی (MDR¹) در سلول های سرطانی و نیز بروز عوارض جانبی داروهای ضد سرطان از مهم ترین محدودیت های شیمی درمانی است؛ چرا که یکی از علل مهم شکست درمان های ضد سرطان است (۵). سرطان تخمدان به رشد سلول های سرطانی که در تخمدان رخ می دهد اشاره دارد. بیش تر سرطان های تخمدان از اپیتلیوم^۲ ایجاد می شوند. با استناد به آمار جامعه سرطانی آمریکا، سرطان تخمدان هشتمین سرطان رایج در میان زنان ایالات متحده آمریکا و پنجمین عامل رایج مرگ و میر سرطان در زنان سراسر دنیا است. در شیمی درمانی، به عنوان یکی از استراتژی های سرطان درمانی؛ با استفاده از داروهای شیمیایی و سمی از تقسیم و رشد سلول های سرطانی جلوگیری به عمل آورده می شود (۶). یکی از داروهای متداول شیمی درمانی، داروی داکسوروبیسین است. داکسوروبیسین از خانواده آنتراسایکلین ها بوده و عامل شیمی درمانی رایج در درمان تومورهای جامد و بدخیم است که با القاء استرس اکسیداتیو دو رشته DNA را می شکند (۷). هم چنین با کاهش بیان ژن توپوایزومراز II باعث جلوگیری از پدیده همانند سازی DNA می شود. اگر چه مکانسیم اصلی عملکرد داکسوروبیسین تخریب DNA از طریق مهار توپوایزومراز II است، اما اثر القای آپوپتوز نیز تأیید شده است (۸). اما استفاده از این دارو با محدودیت های دوز مصرف، القای MDR و عوارض جانبی بسیار نظیر مشکلات قلبی عروقی همراه است. بهره گیری از حامل های دارویی یا سیستم انتقال دارو از روش های جدید دارو درمانی سرطان است. نانوذرات به عنوان حامل های دارویی، شکل جدیدی از رسانش دارو به سلول های سرطانی از طریق ورود به روزه های موجود در مویرگ های توده سرطانی را ارائه می دهند که این حالت سبب رسانش غلظت بالایی از دارو به طور اختصاصی به سلول های سرطانی هدف شده و آثار تخریبی بر روی بافتهای سالم را کاهش می دهد. از انواع نانو سامانه ها می توان به نانوکره ها، نانوکپسول ها، امولسیون ها، میسل ها، لیپوزوم ها

¹ Multiple Drug Resistance

نازک دارای دو فاز آلی و آبی است. در فاز آلی ابتدا مقادیر وزنی کلسترول و اسپن با استفاده از حلال کلروفرم داخل یک بالن ته گرد حل گردیده و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه؛ حلال با استفاده از دستگاه روتاری (Heidolph, Heivap)؛ (دما ۵۰ °C، دور ۱۵۰ rpm) و برقراری شرایط خلاء حذف گردید. پس از تبخیر کلروفرم در انتهای بالن فیلم نازک لیبیدی شکل می گیرد. به منظور حذف کامل کلروفرم، داخل بالن به مدت چند ثانیه با گاز نیتروژن هوادهی شده و ۲۴ ساعت در دمای ۴ °C، نگهداری گردید. افزودن دارو و درون گیری آن در فاز آبی و به شکل غیرفعال صورت می پذیرد. بدین منظور؛ فیلم نازک با استفاده از محلول داروی داکسوروبیسین با غلظت ۰/۵ mg/mL محلول در بافر PBS (pH=۷)، توسط دستگاه روتاری (دما ۶۰ °C، دور ۱۵۰ rpm) و مدت زمان ۶۰ دقیقه هیدراته گردید. در این فاز نیوزوم های چند لایه (MLV^۳) حاوی داروی داکسوروبیسین شکل گرفته اند.

پس از تهیه فرمولاسیون های متعدد F1-F4 (جدول ۱) و آنالیزهایی که در ادامه توضیح داده می شود؛ فرمولاسیون پگیله با کد F5 به عنوان فرمولاسیون بهینه در این مطالعه انتخاب گردید.

سونیکاسیون: همگن سازی

به منظور کاهش اندازه نیوزوم ها از تیپ چند لایه (MLV) به تیپ (SUV^۴) به مدت ۴۵ دقیقه از سونیکیت پروبی (توان ۶۰٪، ۱۰ ثانیه روشن، ۱۵ ثانیه خاموش) استفاده شد (ChromeTech, UH1200B). به منظور انجام سونیکیت؛ پروب داخل به میزان ۲ سانتی متر داخل محلول نیوزومی حاوی دارو قرار گرفته و برای جلوگیری از بالا رفتن دمای نمونه؛ بشر محتوی محلول نیوزومی در ظرف حاوی یخ قرار گرفت.

جدول ۱- درصد ترکیب های تشکیل دهنده فرمولاسیون های نیوزومی

Code	Span 60: Cholesterol: DSPE-mPEG (2000) (%) mol
F1	۹۰:۱۰
F2	۸۰:۲۰
F3	۷۰:۳۰
F4	۶۰:۴۰
F5	۵/۸۵:۹۰:۵/۵

جداسازی داروی آزاد

فرآیند جداسازی داروی آزاد و انکپسوله نشده در داخل نیوزوم ها توسط فرآیند انتشار و با کمک کیسه دیالیز انجام گرفت. ابتدا کیسه دیالیز به مدت ۱۰ دقیقه با بافر کیسه دیالیز (۱ mM EDTA، سدیم بی کربنات ۲٪) جوشانیده (دما ۸۰ °C) و پرورده گردید. به منظور حذف مواد بافر، کیسه دیالیز به مدت ۱۰ دقیقه دیگر در آب مقطر جوشانده شد. سپس محلول نیوزومی به درون کیسه دیالیز منتقل شده و کیسه دیالیز داخل بشر محتوی بافر PBS (pH=۷) (۱۵۰ برابر حجم نمونه) قرار گرفته و با برقراری دمای ۴ °C استیرر گردید. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه نسبت به تعویض بافر با بافر تازه اقدام گردید و این تعویض تا زمان ثابت شدن جذب دارو در مایع اطراف کیسه دیالیز ادامه یافت. طی این فرآیند؛ داروی انکپسوله نشده از داخل کیسه دیالیز به PBS اطراف کیسه انتشار یافته و داروی کپسوله شده در داخل نیوزوم ها داخل کیسه دیالیز باقی می ماند.

بررسی میزان درون گیری داکسوروبیسین داخل نیوزوم

به منظور بررسی میزان داکسوروبیسین درون گیری شده توسط نیوزوم ها، از محلول ایزوپروپیل استفاده گردید. بدین منظور محلول نیوزومی سنتز شده با نسبت ۱ به ۹ با محلول ایزوپروپیل رقیق گردید. استفاده از ایزوپروپیل سبب هضم و شکستن غشای نیوزومی می گردد و بدین سبب داکسوروبیسین از نیوزوم خارج می شود. سپس جذب نمونه در طول موج ۴۸۰ nm دستگاه اسپکتروفتومتر (PG instruments, T80+ UV/VIS spectrometer) اندازه گیری شده و میزان داکسوروبیسین درون گیری شده با استفاده از معادله خط کالیبراسیون داکسوروبیسین در ایزوپروپیل (نمودار ۱) به دست آمد. برای به دست آوردن بازده درون گیری از رابطه ذیل استفاده شد. تمامی رقت سازی و خوانش جذب ها با سه مرتبه تکرار گردید.

$$\text{مقدار داروی محصور شده} \times 100 = \frac{\text{مقدار داروی اولیه}}{\text{مقدار داروی محصور شده}} \times 100$$

رابطه (۱)

بررسی نحوه رهایش دارویی فرمولاسیون های نیوزومی

برای بررسی الگوی آزاد شدن دارو از نانوحامل نیوزومی مقدار ۱ mL از محلول نیوزومی به درون کیسه دیالیز ریخته شده و به داخل یک فالكون محتوی ۱۰ mL از بافر

³ Multi Lamellar Vesicles

⁴ Single unilamellar vesicles

⁵ Amplitude

سامانه فاقد دارو (F5-Blank) با دستگاه FTIR (Model 8300, Shimadzu Co. Japan) اندازه گیری شد.

بررسی سمیت سلولی (MTT Assay)

سلول های سرطان تخمدان رده OVCAR-3 (آدنوکارسینومای تخمدان، مورفولوژی اپیتلیالی و الگوی رشد چسبنده) و سلول سالم فیبروبلاستی (مورفولوژی دوکی شکل، الگوی رشد چسبنده) در محیط کشت DMEM با (۱۰٪) FBS و آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین (۱٪ W/V) در انکوباتور (Memmert GmbH Co. KG, Germany) (دمای ۳۷ °C، CO₂ ۵٪، و رطوبت ۹۵٪) کشت داده شد.

آزمون MTT که یک آزمون بر پایه رنگ سنجی است. اساس این آزمون احیاء کریستال های زرد رنگ تترازولیوم (فرمول شیمیائی 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]- (2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) توسط ردوکتازهای میتوکندریایی سلول های زنده است. درصد زنده ماندن سلول ها بعد از مجاورت با نیوزوم حاوی داکسوروبیسین با استفاده از آزمون MTT در پلیت ۹۶ خانه و رقت سلولی ۱×۱۰^۴ به ازای هر چاهک (۱۰۰ μL) کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین انجام گرفت. بعد از انتقال سلول به چاهک ها؛ به منظور چسبیدن سلول ها ۲۴ ساعت انکوباسیون صورت گرفت. سپس محیط رویی چاهک ها حذف شده و محیط کشت جدید با غلظت های مندرج در جدول ۲ از داکسوروبیسین به فرم آزاد، سامانه حاوی داکسوروبیسین و سامانه نیوزومی خالی تیمار شدند. بعد از گذشت ۷۲ ساعت؛ ۲۰ μL از محلول MTT با غلظت ۰/۵ mg/mL در (pH=۷) PBS به هر چاهک افزوده شده و انکوباسیون مجدد ۴ ساعت صورت گرفت تا به سلول های زنده فرصت متابولیزه کردن MTT داده شود. بعد از گذشت این مدت؛ محلول داخل چاهک ها را حذف کرده و مقدار ۱۶۰ μL ماده DMSO به منظور حل کردن کریستال های فورومازان به هر چاهک افزوده گردید. محلول موجود در هر چاهک به خوبی پیتاژ گردیده و انکوباسیون مجدد به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت. سپس جذب هر چاهک با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (synergy HTX, Bio Tek, USA) در طول موج های ۵۷۰ و ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. در انتها درصد زنده ماندن برای هر چاهک محاسبه گردید.

(pH=۷) PBS منتقل شد. سپس فالكون داخل حمام با دمای ۳۷ °C به منظور سینک رهایش درون تن استیر گردید. نمونه گیری از محیط PBS اطراف کیسه دیالیز در زمان های ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفت و حجم هر نمونه با همان حجم و دمای یکسان از بافر تازه جایگزین گردید. سپس جذب نمونه ها با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج داکسوروبیسین خوانش شده و با استفاده از معادله کالیبراسیون دارو در PBS (نمودار ۲) مقدار رهایش از سامانه به ازای هر کدام از زمان ها محاسبه گردید.

تعیین سایز، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا (شارژ سطحی) نانو نیوزوم ها

محدوده توزیع اندازه ذرات و هم چنین پیک اندازه ذرات با استفاده از DLS تعیین می شود که بدین منظور از دستگاه نانو سائزر (Corp Brookhaven Instruments) استفاده شد. اندازه گیری نانو نیوزوم ها در یک زاویه ۹۰ درجه و تابش نور لیزر با طول موج ۶۵۷ nm در دمای ۲۵ سانتی گراد صورت گرفت. هم چنین اندازه گیری نمونه ها در ۵ مرتبه و هر مرتبه با مدت زمان ۳۰ ثانیه انجام گردید. جهت تعیین اندازه از ۶۰۰ μL نمونه با غلظت ۱ mg/mL ۰/۵ تا ۰/۱ استفاده شد. تعیین پتانسیل زتا/بار سطحی نانو نیوزوم ها در دمای اتاق با استفاده از ۱۵۰۰ μL نمونه با غلظت ۱ mg/mL ۰/۱ تعیین گردید.

میکروسکوپ الکترونی نمایه

به منظور بررسی مورفولوژی؛ تصویربرداری توسط میکروسکوپ الکترونی نمایه (EM3200 - KYKY - China) فرمولاسیون بهینه سامانه نانو نیوزومی حاوی داکسوروبیسین (F5) با توان ۲۵ kV انجام گرفت. آماده سازی نمونه به منظور تصویربرداری؛ یک قطره از محلول نیوزومی F5 به روی لام قرار داده شده و در مجاورت هوا خشک شده و لامل گذاری گردید.

آنالیز نیوزوم سنتز شده توسط دستگاه طیف سنجی مادون قرمز FTIR

به منظور بررسی هرگونه تراکنش میان دارو و حامل دارویی از طیف سنجی مادون قرمز/طیف IR استفاده گردید. پیک های به دست آمده در طیف IR نشان دهنده گروه های عاملی نمونه هستند. بدین ترتیب طیف IR سامانه حاوی دارو (F5)؛ با طیف دارو (داکسوروبیسین) و

جدول ۲- غلظت‌های مورد استفاده از داکس، نیوزوم داکس و نیوزوم بدون دارو در آزمون MTT

ردیف	شرح	مقدار (میکرولیتر)
۱	داکس (غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر)	۲۰
۲	نیوزوم داکس (غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر)	۲۰
۳	نیوزوم بدون دارو	۲۰
۴	کنترل منفی شامل سلول و محیط کشت (تربت نشده)	۲۰

یافته‌ها

تعیین طول موج ماکسیمم داروی داکسوروبیسین با استفاده از طیف جذبی دارو

طیف جذبی داروی داکسوروبیسین در بازه طول موج ۲۰۰-۶۰۰ nm، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر رسم و بر اساس نمودار طول موج ماکسیمم دارو، ۴۸۰ nm تعیین گردید.

نمودار کالیبراسیون داکسوروبیسین هیدروکلراید

نمودار کالیبراسیون دارو در حلال‌های ایزوپروپیل و PBS در تکرارهای سه‌تایی رسم گردید و تکرارپذیری داده‌ها بررسی گردیدند و سپس نمودار نهایی بر اساس میانگین داده‌های تکرارپذیر برای حلال ایزوپروپیل و PBS رسم و معادله خط راست و ضریب رگرسیون دارو تعیین گردید. داده‌های حاصل میزان قابل قبولی از ضریب رگرسیون را گزارش می‌کنند.

تعیین میزان درون‌گیری داروی داکسوروبیسین درون نانوحامل نیوزومی

میزان بازدهی درون‌گیری داروی داکسوروبیسین در تمامی فرمولاسیون‌های سنتزی، با جای‌گذاری در معادله

خط درجه یک بدست آمده از نمودار بالا و استفاده از رابطه اندازه‌گیری راندمان بارگذاری (رابطه ۱) محاسبه گردید (جدول ۱). با توجه به اهمیت میزان درون‌گیری دارو در یک نانوحامل مطلوب، این پارامتر به‌عنوان ملاک انتخاب فرمولاسیون بهینه مدنظر قرار داده شد. با توجه به داده‌های جدول، از میان فرمولاسیون F1 با بالاترین میزان درصد بارگذاری/درون‌گیری دارو به میزان ۹۴/۱۶٪ به‌عنوان فرمولاسیون بهینه جهت پیگیری انتخاب گردید و فرمولاسیون پگیله از منظر میزان درون‌گیری و آزادسازی دارو و همچنین خصوصیت‌های فیزیکوشیمیایی مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت و در ادامه سمیت سلولی نانوحامل پگیله نیز از لحاظ کمی و کیفی ارزیابی گردید.

بررسی سایز، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی نانوحامل‌های نیوزومی حاوی داکسوروبیسین

قطر هیدرودینامیک نانونیوزوم‌ها بهینه تولیدی حاوی داکسوروبیسین با سونیکیت پروبی (توان ۶۰٪) کاهش اندازه داده شد. سپس با استفاده از دستگاه زتاسایزر قطر هیدرودینامیک/سایز، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا تعیین گردید. نتایج در جدول شماره ۳ آورده شده است.

جدول ۳- مقایسه نتایج بررسی چهار فرمولاسیون مختلف نانونیوزوم داکسوروبیسین

کد فرمول	درصد بارگذاری دارو	شاخص پراکندگی	پتانسیل زتا (mV)	سایز (nm)
F1	94.17 ± 5.89	۰/۳۴۵	-۳۶/۳۵	۲۴۳/۱
F2	62.08 ± 5.30	۰/۳۲۳	-۳۰/۶۹	۲۴۵/۴
F3	76.88 ± 5.01	۰/۲۹۷	-۳۱/۷۳	۲۶۴/۸
F4	24.17 ± 8.84	۰/۳۳۸	-۳۸/۱۳	۲۸۷/۲

فرمولاسیون بهینه؛ F5

با توجه به نتایج به‌دست آمده در خصوص بازده درون‌گیری، سایز و پتانسیل زتا (جدول شماره ۴)؛ فرمولاسیون F1 به‌منظور بهینه‌سازی و پیگیری (۵٪) با نام فرمول بهینه F5 انتخاب گردید. سپس بررسی‌های درصد درون-

گیری، پروفایل رهایش، سایز، زتا، مورفولوژی، FTIR و سمیت سلولی بر اساس این فرمول نهایی صورت پذیرفت.

بررسی اثر پیگلیاسیون ((DSPE-mPEG (2000) بر میزان راندمان بارگذاری

فرمولاسیون بهینه با پلی اتیلن گلیکول (PEG) به میزان ۵٪، اصلاح سطحی شده و راندمان بارگذاری اندازه-گیری و میزان ۹۶/۸۷٪ گزارش گردید. با توجه به نتایج گزارش شده، پگیلاسیون توانسته است بازده انکپسولاسیون را به میزان ۲/۷۱٪ نسبت به فرمولاسیون

فاقد پلی مر پگ، افزایش دهد. میانگین قطر نانوحامل F5 حاوی داکسوروبیسین ۲۷/۵ nm، پتانسیل زتا mV ۳۲/۵۴-، شاخص پراکندگی ۰/۲۴۷ گزارش گردید. نمودارهای ۳ و ۴ نشان دهنده سایز و شارژ سطحی فرمولاسیون F5 است.

جدول ۴- فرمولاسیون F5 و ویژگی های آن

کد فرمول	درصد بارگذاری دارو	شاخص پراکندگی	پتانسیل زتا (mV)	سایز (nm)
F5	۹۵/۸۳ ± ۱/۱۸	۰/۲۴۷	-۳۲/۵۴	۱۲۷/۵

گروه عاملی آلکان (RCH₂CH₃) را نشان می دهد. پیک ۱۲۳۴ گروه عاملی فسفونات با پیوند کشتی (P=O) را معرفی می کند و گروه عاملی ۱۰۲۶ گروه عاملی استر فسفات با پیوند شیمیایی (P-OR) را نشان می دهد. بررسی های FTIR نشان از نبود برهم کنش میان دارو و نانوحامل بوده است به گونه ای که خواص دارویی داکسوروبیسین بعد از انکپسوله شدن درون نانوحامل تغییر نیافته است.

بررسی سمیت سلولی

بررسی میزان درصد زنده ماندن سلولی با استفاده از آزمون MTT نشان داد که سامانه نیوزومی حاوی داکسوروبیسین رشد سلول های سرطانی تخمدان را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می دهد (نمودار ۸). همچنین مقایسه دوزهای یکسان در سلول های رده سرطان تخمدان و سالم فیروبلاستی نشان از تأثیر بیش تر سامانه نیوزومی حاوی دارو نسبت به دارو در فرم آزاد بر سلول های سرطانی دارد. علاوه بر آن؛ مقایسه سامانه نیوزومی فاقد دارو/خالی بر سلول های سالم و سرطانی با گروه کنترل این سلول ها؛ نشان از سمیت بسیار ناچیز سامانه نیوزومی فاقد دارو دارد. مقایسه اثرگذاری داروی داکسوروبیسین در فرم آزاد بر روی دو رده سلولی سالم و سرطان تخمدان نشان از تفاوت چندانی در القای سمیت وجود ندارد؛ در حالی که در مقایسه فرم آزاد و نیوزومی مشاهده می شود که نه تنها فرم نیوزومی دارای اثرگذاری به تقریب برابری با داکسوروبیسین آزاد بوده است؛ بلکه توانسته است سمیت بیشتری را در سلول های سرطانی نسبت به سلول سالم القا کند. این امر با عوامل نانومقیاس بودن سامانه، دمای بالاتر و pH اسیدی سلول های سرطانی در مقایسه با سالم توجیه پذیر است. چرا که غشای نیوزومی در چنین محیطی توانسته است با ارائه نرخ رهایش بالاتری از داروی انکپسوله شده؛ سمیت بیشتری را القا کند.

تصویربرداری SEM از نانو نیوزوم پگیله حاوی دارو

در تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ الکترونیکی (SEM) (با توان ۲۵ کیلوولت) نانو نیوزوم تولیدی حامل دارو دارای مورفولوژی کروی، منومر و ساختاری یکنواخت بودند (تصویر ۱)

تعیین میزان رهاسازی داکسوروبیسین از نانو نیوزوم پگیله شده

نتایج حاصل از چهار بار تکرار، بررسی میزان آزادسازی داکسوروبیسین از نانو نیوزوم های پگیله شده محاسبه شد که در شکل ۴-۲۶ نشان داده شده است. مقدار داروی داکسوروبیسین آزاد شده از فرمولاسیون داکسوروبیسین نانو نیوزوم در بافر PBS طی بازه های زمانی ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸ ساعت با استفاده از منحنی استاندارد داکسوروبیسین در PBS محاسبه گردید. حداکثر مقدار داروی آزاد شده از نیوزوم های پگیله (F5) شده در مدت زمان ۴۸ ساعت؛ ۲۰/۵۲ درصد محاسبه گردید. الگوی رهایش دارو مطابق نمودار ۵ است.

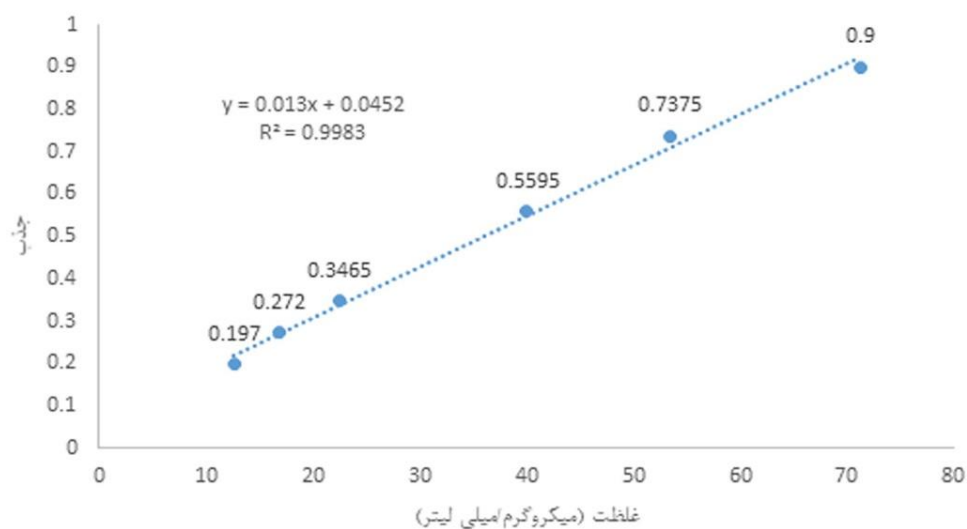
نمودار طیف سنجی FTIR؛ آنالیز نانو نیوزوم سنتز

شده توسط دستگاه طیف سنجی مادون قرمز

در نمودار ۶ و ۷، گراف طیف سنجی FTIR نمونه نیوزومی ساخته شده ارائه گردیده است. در طیف IR گروه های عاملی ترکیب ها و مواد سازنده؛ دارو؛ فرمولاسیون نهایی نانوحامل نیوزومی بررسی گردید. در نمودارهای ذیل طیف داکسوروبیسین (نمودار ۶) و سامانه نیوزومی F5 حاوی داروی داکسوروبیسین (نمودار ۷) نشان داده شده است.

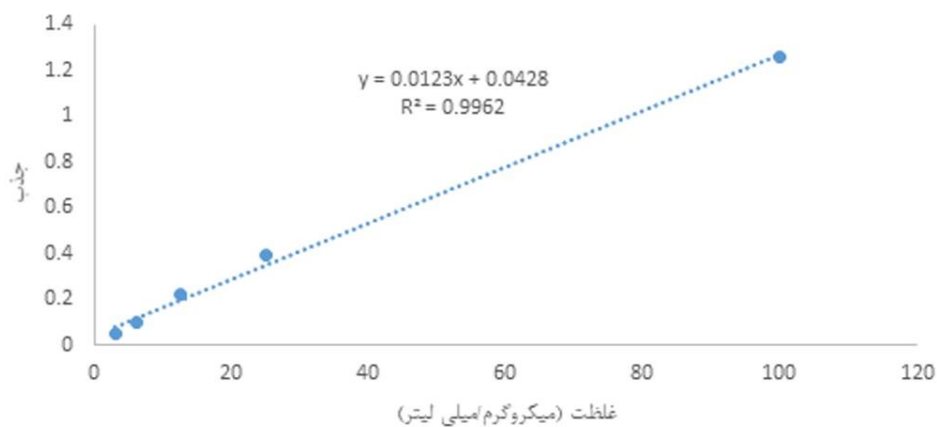
یک شاخص 3410 cm^{-1} نشان دهنده گروه عاملی الکل با پیوند کشتی O-H است. پیک 2924 cm^{-1} و 2848 cm^{-1} معرف گروه عاملی آلکان و پیک 1737 cm^{-1} گروه عاملی استر را معرفی می کند. هم چنین پیک 1639 cm^{-1} گروه عاملی آمین (NH₂) را نشان می دهد. پیک شاخص 1469 cm^{-1} نیز

کالیبراسیون دوکسوروبیسین در بافر PBS

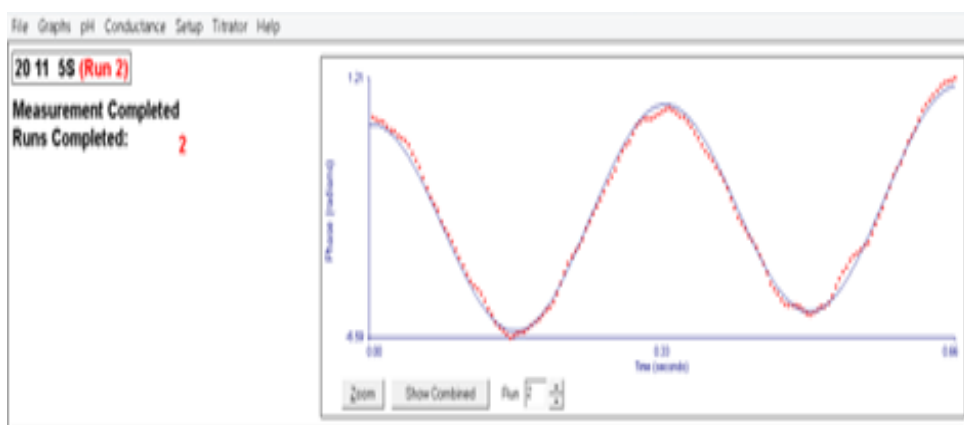


نمودار ۱- کالیبراسیون داکسوروبیسین در بافر PBS

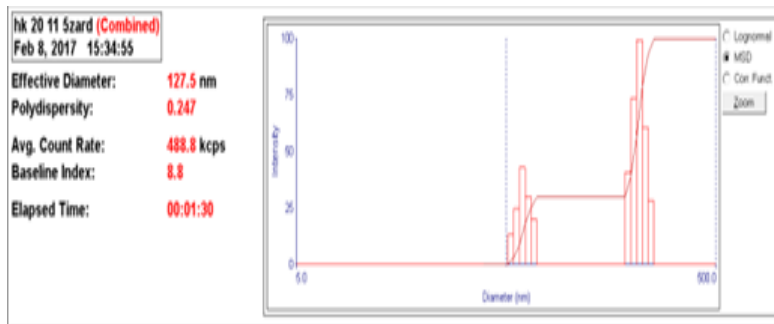
کالیبراسیون دوکسوروبیسین در ایزوپروپیل



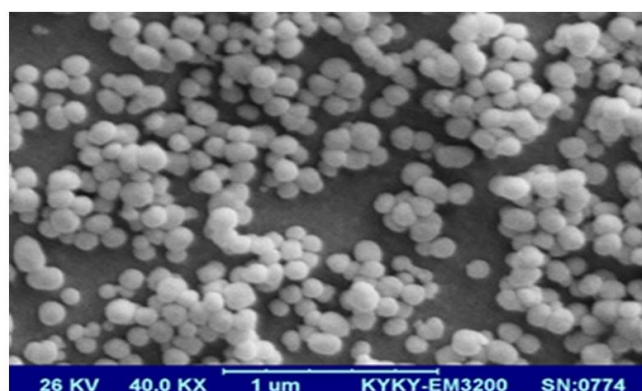
نمودار ۲- کالیبراسیون داکسوروبیسین در ایزوپروپیل



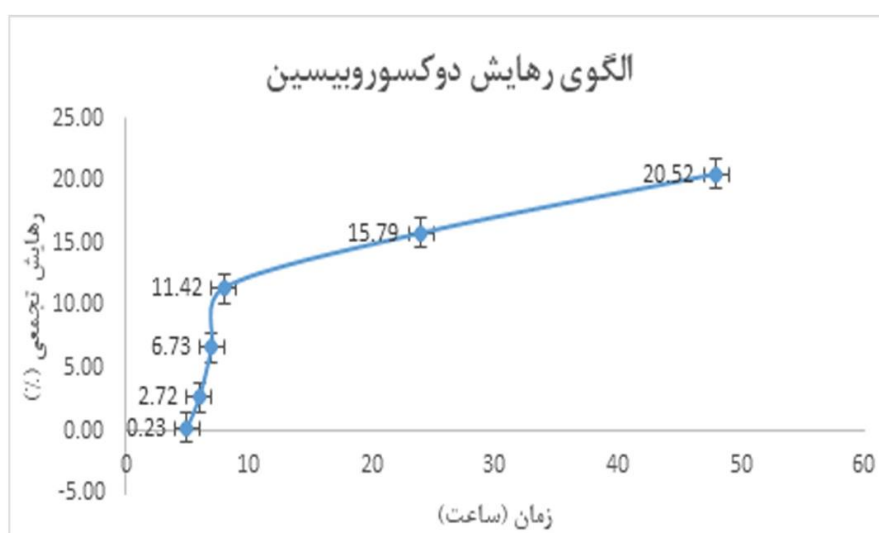
نمودار ۳- نمودار و نتایج پتانسیل زتا (شارژ سطحی) فرمولاسیون F5.



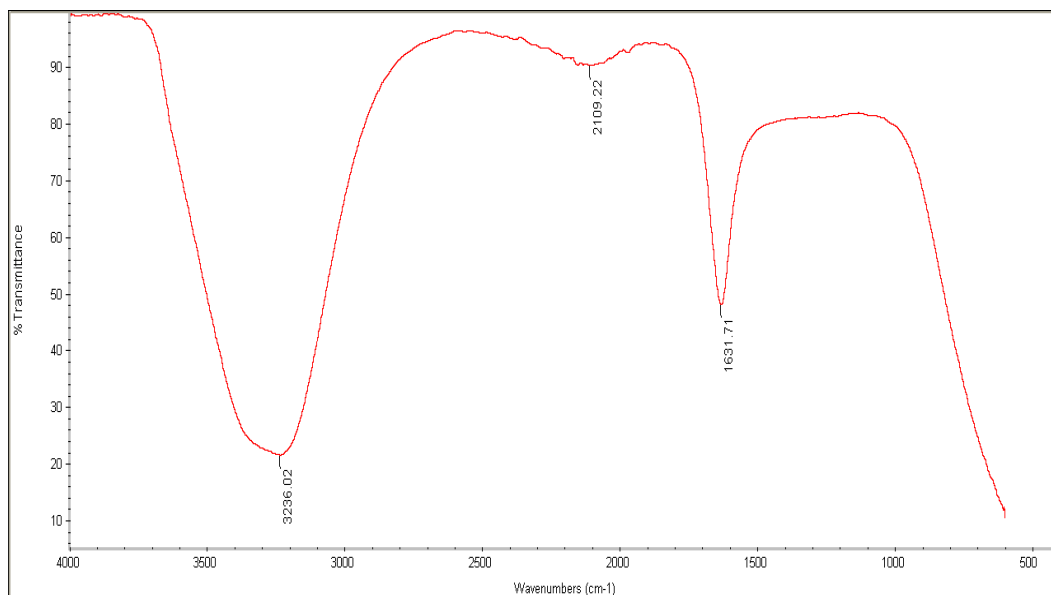
نمودار ۴- نمودار و نتایج حاصل از اندازه گیری سایز فرمولاسیون F5 توسط دستگاه زتاسایزر.



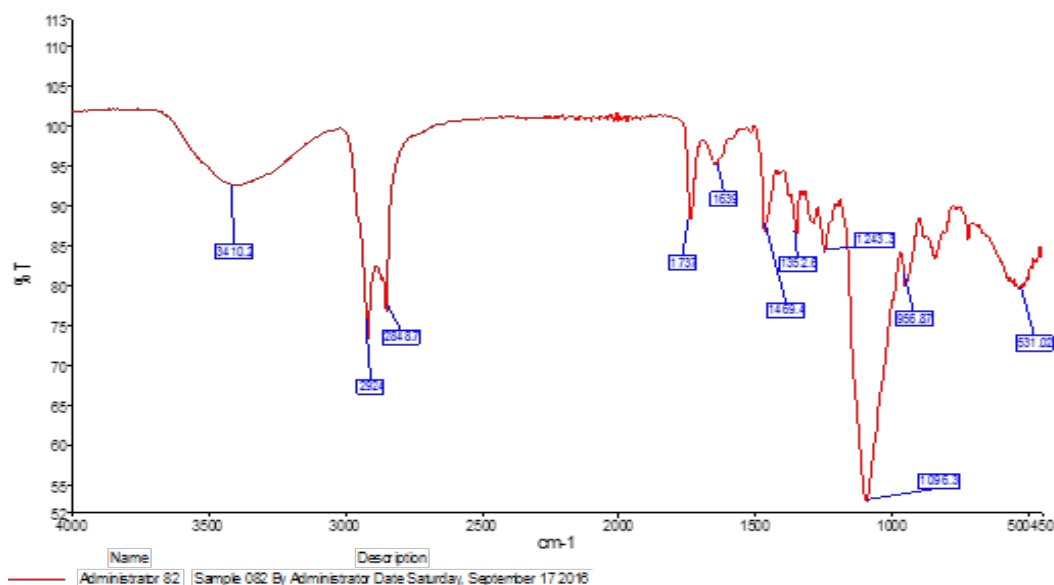
شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی نمایه (SEM) حاصل از تصویربرداری نمونه F5



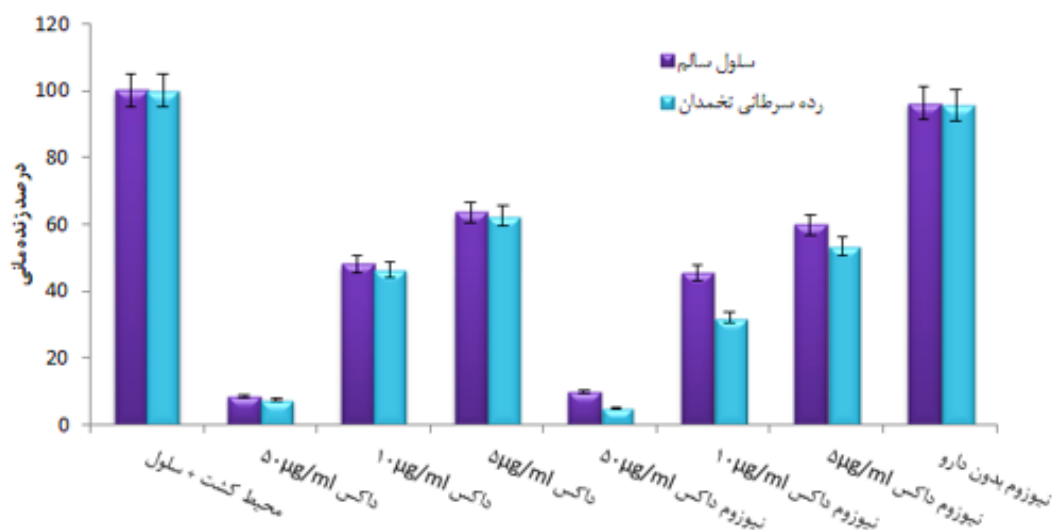
نمودار ۵- الگوی رهایش داکسوروبیسین از فرمولاسیون نیوزومی F5 در محیط بافری PBS طی دمای °C ۳۷ و pH ۷/۴



نمودار ۶- طیف IR داروی داکسوروبیسین هیدروکلراید



نمودار ۷- طیف FTIR سامانه نیوزومی F5 حاوی داکسوروبیسین



نمودار ۸- نتایج آزمون MTT حاصل از تیمار ۳ غلظت ۵۰، ۱۰ و ۵ میکروگرم/میلی لیتر داکسوروبیسین در فرم آزاد و در فرم نانوحامل نیوزومی بر روی دو رده سلولی سالم و رده سلولی سرطان تخمدان.

بحث

موجب افزایش یا کاهش بازده درون‌گیری و قطر هیدرودینامیک سامانه گردد؛ اما این امر به‌صورت یک حقیقت ثابت و پیوسته نیست.

پتانسیل زتا تمامی فرمولاسیون F1-F4 همگی منفی بوده که نشان از سمیت پایین و حلالیت بالای این سامانه‌ها دارد. هم‌چنین قدر مطلق تمامی پتانسیل‌های زتا بیش‌تر از ۳۰ mV است. این موضوع حاکی از پایداری بالا و عدم وقوع aggregation ها با گذر زمان است؛ چرا که این مقدار از شارژ هم‌نام سبب ایجاد فاصله فضایی مناسب حامل‌های دارویی از یکدیگر شده و مانع از چسبیدن و تجمع آن‌ها می‌گردد.

بهینه‌سازی فرمول نهایی F5 با استفاده از ۵٪ پلیمر پلی-اتیلن گلیکول صورت گرفت؛ نتایج حاصل از این بهینه‌سازی شامل افزایش درون‌گیری دارو درون سامانه از ۰/۹۴/۱۷ به ۰/۹۵/۸۳، کاهش شاخص پراکندگی از ۰/۳۴۵ به ۰/۲۴۷ و کاهش قطر میانگین هیدرودینامیک از ۲۴۳/۱ به ۱۲۷/۵ نانومتر بوده است. افزایش درون‌گیری با افزایش فضای آبی به‌دلیل استفاده از پوشش پگ توجیه‌پذیر است؛ لکن این افزایش با کاهش فاصله فضای مایی و به‌دنبال آن کوچک‌تر شدن قطر هیدرودینامیک همراه بوده است.

پگیله نمودن نانوحامل سبب می‌شود تا نیمه‌عمر گردش خون نانوذرات تا چند برابر افزایش یابد. علاوه بر آن؛ این پلیمر از زیست‌سازگار بسیار خوبی نیز برخوردار است. نتایج حاصل از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی مورفولوژی کروی نانوذرات و توزیع یکنواخت آن‌ها را تأیید می‌کند.

نتایج بدست آمده از طیف IR نانوسامانه نشان از عدم وجود کنش‌های شیمیایی منجر به تشکیل پیوند و گروه عاملی جدید میان دارو و حامل بوده است.

بررسی نتایج حاصل از آزمون MTT بر روی رده‌های سلولی سالم و سرطان تخمدان همگی حاکی از اثر بالای این نانوسامانه در رده سلولی سرطانی است؛ به‌طوری‌که این سلول‌ها را در مقایسه با سلول‌های سالم بیش‌تر تحت تأثیر قرار داده است. فرم انکپسوله شده دارو در هر دو رده، مرگ سلولی بیش‌تری را القاء کرده است. فرم نیوزومی نیز در عین ارائه رهاش آهسته و کنترل شده دارو؛ دارای اثرهایی برابر با داروی آزاد در درمان تومور بوده است. بنابراین می‌توان گفت در فرم نیوزومی می‌توان

سرطان اساسی‌ترین مشکل جوامع بشری است. یک راه متداول درمان، شیمی درمانی است. اگرچه انواع مختلف شیمی درمانی کمک مؤثری در درمان سرطان است، ولی بروز مقاومت چندگانه دارویی (MDR) در سلول‌های سرطانی و نیز بروز عوارض جانبی داروهای ضد سرطان از مهم‌ترین محدودیت‌های شیمی درمانی است (۵). یکی از اصلی‌ترین راه‌ها برای مواجهه با این چالش‌ها، درمان با استفاده از سیستم تحویل دارو است که جذب دارو توسط سلول‌های نرمال را به کاهش داده و نفوذ، هم‌چنین بقای دارو در سلول سرطانی را بیش‌تر می‌کند (۱۱). نیوزوم‌ها حامل‌هایی هستند که از خود تجمعی سورفکتانت‌های غیریونی در محیط آبی شکل می‌گیرند و ساختار دو لایه محصور را ایجاد می‌کنند (۱۲). آن‌ها باعث هدایت اختصاصی تر دارو به بافت هدف نظیر تومورها و بافت‌های التهابی شده، در نتیجه غلظت تجمعی و تأثیر درمانی دارو افزایش یافته و کاهش عوارض جانبی (سمیت دارو) مشهود است. نیوزوم‌ها از حامل‌های مناسب در دارو رسانی هستند که توانایی انباشته کردن طیف وسیعی از داروهای آب‌دوست، آب‌گریز و دوگانه دوست را دارند. نیوزوم‌ها تهیه و ذخیره‌سازی آسان‌تری داشته، هم‌چنین زیست تخریب‌پذیر، زیست‌سازگار و غیر ایمونوژن هستند. هم‌چنین؛ آزادسازی کنترل شده و افزایش و پایداری دارو را نیز سبب می‌شوند. هم‌چنین قابلیت نفوذ به پوست را داشته و امکان زیست خوراکی داروها را فراهم می‌کنند (۱۳). داروی داکسوروبیسین هیدروکلراید یک عامل مؤثر شیمی‌درمانی در درمان سرطان است داکسوروبیسین ترکیبی چهار حلقه‌ای از خانواده آنتی‌بیوتیک‌های آنتراسیکلین با طیف وسیعی از عملکرد آنتی‌نئوپلاستیک و ضدسرطانی است. ترکیب‌های این دسته دارویی از باکتری‌های استرپتومایسز^۶ استخراج می‌شوند (۱۴).

در مطالعه حاضر؛ انکپسولاسیون داروی داکسوروبیسین طی طراحی و سنتز ۴ فرمولاسیون نیوزومی صورت پذیرفت. فرمولاسیون دارای بیش‌ترین درصد کلسترول (F4) از کم‌ترین میزان بازده درون‌گیری $(8/84 \pm)$ و بزرگترین قطر $(247/2 \text{ nm})$ برخوردار بوده است؛ اما به‌طور قطع نمی‌توان این موضوع را به‌عنوان رابطه‌ای مستقیم با کلسترول عنوان کرد. اما می‌توان این گونه بیان نمود که افزایش و کاهش کلسترول می‌تواند

⁶ Streptomyces

با انکپسوله نمودن دارو ضمن به کارگیری دوز تجمعی کم-تر و با رهایی پیوسته؛ به نتیجه دلخواه دست یافت و در نتیجه کارایی و به دنبال آن شاخص درمانی را افزایش داد.

استفاده از نیوزومها به عنوان سیستمهایی برای رهایش دارو در محیطهای بیولوژیکی از دهه ۱۹۸۰ تاکنون ادامه داشته و روز به روز بیش تر رواج یافته است. رگرسون و همکارانش (۱۹۹۸) موفق به ساخت نانوکپسولهای نیوزومی شارژ دار حاوی داروی ضدسرطانی شدند. یوچکبو (۱۹۹۶) موفق به نشان دار کردن نانوذرات حاوی داروی ضدسرطانی با استفاده از پلی (اکسی اتیلن) شد. پلی (اکسی اتیلن) میزان به دام افتادن نیوزومها را توسط سیستم طحال و کبد به میزان چشمگیری کاهش داد (۱۵).

در طی چند دهه اخیر نیوزومها به عنوان حاملهای دارویی مفید وارد عرصه تحقیق شده اند و در برخی موارد ادعا شده که این نوع حاملها میتواند جایگزین مناسبی برای حاملهای لیپوزومی باشد (۱۶).

Kubo و همکاران با استفاده از روش تبخیر فاز معکوس، لیپوزومهای مغناطیسی حاوی داکسوروبیسین را آماده سازی کردند. آنها اثر این نانوذرات را بر روی استئوسارکوما بررسی کردند. این نانوذرات به وسیله مسیر مستقل گلیکوپروتئین - ۸ تجمع دارو در سلولهای تومور را افزایش میدهند. نتایج در مقایسه با داروی آزاد نشان-دهنده افزایش آپوپتوز در سلولهای توموری استخوان بوده است (۱۷).

Susa و همکاران به منظور غلبه بر مقاومت دارویی نسبت به بارگذاری داکسوروبیسین در سیستم نانوذرات پلیمری بر پایه لیپید اصلاح شده دکستران اقدام کردند (۱۸).

Srinivas و همکاران مطالعه های فرمول نیوزومی را گسترش دادند. جهت بهتر کردن امکان دسترسی در مطالعه های ارزیابی خود، اثرهای تغییر ترکیب سورفکتانت های غیریونی و کلسترول در ظرفیت کپسوله شدن، اندازه ذرات و رها سازی دارو را مورد مطالعه قرار دادند (۱۹).

Bragagni و همکاران در سال ۲۰۱۲ نسبت به ساخت، توسعه و تعیین خصوصیت فرمولاسیون نیوزومی داکسوروبیسین به منظور دستیابی به دارورسانی بالقوه

مغزی اقدام کردند. فرمولاسیون نهایی و منتخب آنها با نتایج مثبتی همچون قادر بودن به افزایش پایداری و بهبود تحویل دهی داکسوروبیسین به مغز همراه بوده است (۲۰). Tavano و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از Tween-60 و Pluronic-L64 نسبت به طراحی و ساخت داکسوروبیسین انکپسوله شده در سامانه نیوزوم مغناطیسی به منظور دارورسانی هدفمند اقدام کردند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که افزودن ferrofluid مغناطیسی، مورفولوژی و ساختار نیوزومها را تغییر نداده و فرمولاسیون نهایی به مدت طولانی پایدار بوده و رهایش کنترل شده ای را از خود نشان داده است (۲۱).

Askari و همکاران در سال ۲۰۱۹ با انکپسوله کردن عصاره پوسته انار بر در نانو نیوزومها و بررسی تأثیر آن بر سلولهای سرطان پستان نشان کردن نیوزومه کردن عصاره سبب بهبود عملکرد درمانی آن بر روی سلولهای سرطانی می گردد (۲۲).

Karimi-Moghddam و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۹ به تأثیر دادن نانو نیوزومهای حاوی داروی سیلیبنین بر روی سلولهای سرطان سینه تأیید کردند که نانونیوزیمها تأثیر بیشتری نسبت به فرم آزاد دارو بر روی سلولهای سرطان سینه دارند که نتایج کار آنها مطابق نتایج کار ما بود (۲۳).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از اندازه گیری قطر نیوزومها با استفاده از دستگاه زتا سایزر اندازه ذرات در ابعاد نانو را تأیید نمود. تمام نانو حاملهای نیوزومی سنتز شده در محدوده مناسبی از اندازه (کمابیش ۱۲۷/۵ نانومتر) قرار دارند. بررسی میزان بارگذاری دارو نشان میدهد که مقدار قابل توجهی از دارو در داخل وزیکولهای نیوزومی انکپسوله گردیده است. این موضوع میتواند تا حد زیادی مرتبط به نسبت های کنترل شده اسپن، کلسترول، دارو و هم-چنین متد مورد استفاده در سنتز است. بررسی الگوی رهایش داروی نانونیوزومه شده نشان دهنده این است که رهاسازی دارو به نسبت آهسته صورت می گیرد. استفاده از نیوزوم به عنوان عامل دارورسانی نقشی مؤثر در آهسته کردن رهایش دارو و کاهش در دسترس پذیری سریع بافتی آن دارد.

نیوزوم‌های فاقد دارو (کنترل) به‌تنهایی اثری بر سلول‌های سرطانی تخمدان نداشتند و تأثیر فرمولاسیون نیوزومه شده بسیار بیش‌تر از داروی خالص در فرم آزاد بوده است. تمام این نتایج متأثر از نقش حامل‌های دارو رسانی (نیوزوم) در انتقال بهتر دارو و بهبود عملکرد آن است. فرمولاسیون نیوزومی داکسوروبیسین پتانسیل این مهم را دارد تا با کاهش دوز مصرفی سبب افزایش شاخص درمانی شود. با کاهش دوز مصرفی دارو، هزینه درمانی نیز کاهش یافته و عوارض جانبی ناشی از جذب ناخواسته سیستمیک دارو و القای سمیت در تمامی بافت‌ها کاهش می‌یابد.

1. Maman S, Witz IP. A history of exploring cancer in context. *Nature Reviews Cancer*. 2018;18(6):359-76.
2. Qiu L, Hu X, Jing Q, Zeng X, Chan K-M, Han J. Mechanism of cancer: Oncohistones in action. *J. Genetics and Genomics*. 2018;45(5):227-36.
3. Cortez AJ, Tudrej P, Kujawa KA, Lisowska KM. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2018;81(1):17-38.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2019;69(1):7-34.
5. Pokhriyal R, Hariprasad R, Kumar L, Hariprasad G. Chemotherapy resistance in advanced ovarian cancer patients. *Biomarkers in cancer*. 2019;11:1179299X19860815.
6. Armbruster S, Coleman RL, Rauh-Hain JA. Management and treatment of recurrent epithelial ovarian cancer. *Hematology/Oncology Clinics*. 2018;32(6):965-82.
7. Tap WD, Wagner AJ, Schöffski P, Martin-Broto J, Krarup-Hansen A, Ganjoo KN, et al. Effect of doxorubicin plus olaratumab vs doxorubicin plus placebo on survival in patients with advanced soft tissue sarcomas: the ANNOUNCE randomized clinical trial. *Jama*. 2020;323(13):1266-76.
8. Baxter Holland M, Dass CR. Doxorubicin, mesenchymal stem cell toxicity and antitumour activity: implications for clinical use. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2018;70(3):7-320.
9. Gorjian H, Amiri ZR, Milani JM, Khaligh NG. Preparation and characterization of the encapsulated myrtle extract nanoliposome and nanoniosome without using cholesterol and toxic organic solvents: A comparative study. *Food Chemistry*. 2021;342:128342.
10. Gharbavi M, Amani J, Kheiri-Manjili H, Danafar H, Sharafi A. Niosome: a promising nanocarrier for natural drug delivery through blood-brain barrier. *Advances in pharmacological sciences*. 2018;2018.
11. Peng H, Ji W, Zhao R, Yang J, Lu Z, Li Y, et al. Exosome: a significant nano-scale drug delivery carrier. *Journal of Materials Chemistry B*. 2020;8(34):7591-608.
12. Barani M, Mirzaei M, Torkzadeh-Mahani M, Lohrasbi-Nejad A, Nematollahi MH. A new formulation of hydrophobin-coated niosome as a drug carrier to cancer cells. *Materials Science and Engineering: C*. 2020;113:110975.
13. Gharbavi M, Johari B, Mousazadeh N, Rahimi B, Leilan MP, Eslami SS, et al. Hybrid of niosomes and bio-synthesized selenium nanoparticles as a novel approach in drug delivery for cancer treatment. *Molecular Biology Reports*. 2020;47(9):6517-29.
14. Zhao N, Woodle MC, Mixson AJ. Advances in delivery systems for doxorubicin. *Journal of nanomedicine & nanotechnology*. 2018;9(5).
15. Nakamura H, Komatsu H, Yoshio M. Suppression of electrochemical decomposition of propylene carbonate at a graphite anode in lithium-ion cells. *Journal of power sources*. 1996;62(2):219-22.
16. Bartelds R, Nematollahi MH, Pols T, Stuart MC, Pardakhty A, Asadikaram G, et al. Niosomes, an alternative for liposomal delivery. *PLoS One*. 2018;13(4):e0194179.
17. Kubo T, Sugita T, Shimose S, Nitta Y, Ikuta Y, Murakami T. Targeted delivery of anticancer drugs with intravenously administered magnetic liposomes in osteosarcoma-bearing hamsters. *International journal of oncology*. 2000;17(2):309-24.

18. Susa M, Iyer AK, Ryu K, Hornicek FJ, Mankin H, Amiji MM, et al. Doxorubicin loaded polymeric nanoparticulate delivery system to overcome drug resistance in osteosarcoma. BMC cancer. 2009;9(1):1-12.
19. Srinivas S, Hafsa Mohammadi AKY. DESIGNING AND EVALUATION OF ACECLOFENAC NIOSOMES.
20. Bragagni M, Mennini N, Ghelardini C, Mura P. Development and characterization of niosomal formulations of doxorubicin aimed at brain targeting. Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences. 2012;15(1):184-96.
21. Tavano L, Aiello R, Ioele G, Picci N, Muzzalupo R. Niosomes from glucuronic acid-based surfactant as new carriers for cancer therapy: preparation, characterization and biological properties. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2014;118:7-13.
22. 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). Daneshvar Medicine: Basic and Clinical Research Journal. 2020;26(5):9-20.
23. Karimi-Moghddam A, Nikounahad-Lotfabadi N, Haghirsadat BF, Majdizadeh M. Investigating the effect of lipid nanoparticles containing silibinin anti-cancer drug on the growth of breast cancer MCF-7 cell line. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2019;6(4):1-12.

