Characterization of PEGylated nano-niosomes containing Gemcitabine and evaluation of their cytotoxicity on human fibroblast (HFF) cell Line and MCF-7 breast cancer cell Line

Mohammad Majdizadeh[1], Lida Eftekhari-Vash[2], Yasaman Zohrab-Beigi[3], Bibi Fatemeh Hghiralsadat [4*], Seyyed Mohammad Sadegh Khadem[5]

1. Nano-Biotech Foresight Company Biotechnology Campus, Science & Technology Park of Yazd, Yazd, Iran.
2. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Maragheh Branch,Islamic, Azad University, Maragheh, Iran.
3. Department of Biology, Yazd University, Yazd, Iran
4. Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
5. Department of Biology, Payame Noor University of Taft, Yazd, Iran

Abstract

Aim and Background: Gemcitabine is one of the most famous chemotherapy drugs and its use is subject to limitations. In the present study, Gemcitabine with the aim of increasing its antitumor properties was injected into the PEGylated niosomal nano-carriers and the toxicity of non-drug niosomes was studied on the fibroblast cell line (HFF) and the toxicity of the drug-containing niosomes to the breast cancer cell line (MCF-7).

Material and Methods: Niosomal vesicles were prepared using span 60(77.5%), cholesterol (17.5%) and polyethylene glycol (5%) by thin-film method and Gemcitabineis were loaded into the niosomes. Drug loading percentage was measured in nano-carriers. Their physicochemical properties were assayed, And the drug release rate was examined at 37 degrees Celsius, pH 7.4 and 42 degrees Celsius, pH 5.4. At the end, the toxicity of non-drug niosomes was studied on the fibroblast cell line (HFF) and the toxicity of the drug-containing niosomes on the MCF-7 breast cancer cell line ().

Results: PEGylated niosomes containing Gemcitabineis showed a size of 126.6nm, 39.1 ± 3.28% drug encapsulation efficiency, -29.91±0.42 mV of zeta potential. The release of the drug from niosomes was slow and morphological examination of the nanoparticles showed that they have a smooth and spherical surface. Cellular studies showed that non-drug niosomes produce little toxicity to HFF cell line and its toxicity are not significant. Also, the toxicity of noisome Gemcitabine compared to non-noisome Gemcitabine on the MCF-7 cell was significantly higher (p-value<0.01).

Conclusion: The results of this study indicate that PEGylated niosomal nano-carriers containing Gemcitabineis having the proper physicochemical properties, can be an appropriate carrier for drug delivery to breast cancer cells.

Key words: Gemcitabine, Nano-Niosome, MCF-7 cells, HFF cells, Breast Cancer, Kinetics of drug release.

Corresponding author:
Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
Email:
Fhaghirosadat@gmail.com

مشخصه‌یابی نانونیوزوم‌های پگیله حاوی جمسیتابین و بررسی سمیت سلولی آن‌ها بر رده سلولی فیبروبلاست انسانی (HFF) و رده سلولی MCF-7 سرطان پستان

محمد مجدی زاده[۱]، لیدا افتخاری وش[۲]، یاسمن ظهراب بیگی[۳]، بی بی فاطمه حقیرالسادات[۴*]، سید محمد صادق خادم[۵]

۱. گروه زیست فناوری، شرکت ریز زیست فناوران فردا نگر، پارک علم و فناوری یزد، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه، مراغه، ایران
۳. گروه زیست شناسی- ژنتیک، دانشگاه یزد، یزد، ایران
۴. گروه علوم و فنون نوین، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۵. گروه زیست شناسی - بیوشیمی ، دانشگاه پیام نور تفت، یزد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: جمسیتابین یکی از مشهورترین داروهای شیمی درمانی است که استفاده از آن با محدودیت‌هایی همراه است. در مطالعهٔ حاضر جمسیتابین با هدف افزایش ویژگی‌های ضد تکثیری، درون نانوحامل‌های نیوزومی پگیله شده قرار داده شد و سمیت نیوزوم‌های فاقد دارو بر رده سلولی فیبروبلاستی(HFF) و سمیت نیوزوم‌های حاوی دارو بر رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) بررسی شد.

مواد و روش‌ها: وزیکول‌های نیوزومی با استفاده از اسپن ۶۰ (۷۷/۵ ٪)، کلسترول (۱۷٪/۵) و پلی‌اتیلن‌گلیکول (۵٪) به روش فیلم نازک ساخته و جمسیتابین درون نیوزوم‌ها قرار داده شد. درصد بارگذاری دارو درون نانو حامل‌ها اندازه‌گیری، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوحامل‌های حاوی دارو سنجیده و میزان رهایش دارو در دما ۳۷ درجه سلسیوس، pH برابر ۷/۴ و دمای ۴۲ سلسیوس، pH برابر ۵/۴ بررسی شد. در پایان، سمیت نیوزوم‌های فاقد دارو بر ردهٔ سلولی فیبروبلاستی(HFF) و سمیت نیوزوم‌های حاوی دارو بر ردهٔ سلولی سرطان پستان(MCF-7) سنجیده شد.

یافته‌ها: نیوزوم‌های پگیله شده حاوی جمسیتابین اندازهٔ ۱۲۶/۶nm، بازده درونگیری ۳۹/۱±۳/۲۸ درصد و پتانسیل زتای ۲۹/۹۱±۰/۴۲mV- را نشان دادند. رهایش دارو از نیوزوم‌های پگیله شده آهسته بود و بررسی مورفولوژیکی نانو ذرات نشان داد که دارای سطحی صاف و کروی هستند. مطالعه سلولی نشان داد که نیوزوم‌های فاقد دارو سمیت بسیار کمی علیه ردهٔ سلولی HFF داشتند و نتایج سمیت آن معنادار نبود. همچنین سمیت جمسیتابین نیوزومه در مقایسه با جمسیتابین غیر نیوزومه بر سلول‌های MCF-7 بصورت معناداری ($p - valu < 0.01$) بیشتر بود.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که نانوحامل‌های نیوزومی پگیله حاوی جمسیتابین با داشتن ویژگی‌های مناسب فیزیکوشیمیایی، می‌توانند حامل مناسبی برای رسانش دارو به سلول‌های سرطانی پستان باشند.

واژگان کلیدی: جمسیتابین، نانو نیوزوم، سلول‌های MCF-7، سلول‌های HFF، سرطان پستان، سینتیک رهایش دارو.

مقدمه

سرطان مجموعه‌ای از بیماری‌ها با منشاء ژنتیکی است که از تکثیر مهارنشدهٔ سلول‌ها پدید می‌آیند. در این بیماری گروهی از سلول‌ها از سازوکارهای عادی تقسیم و رشد سلول‌ها جدا شده و بر اثر تکثیر غیر عادی آن‌ها توده‌ای سلولی بنام تومور ایجاد می‌شود. افزایش برتری رقابتی سلول‌های سرطانی در

نویسنده مسئول:
گروه علوم و فنون نوین، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
پست الکترونیکی: Fhaghirosadat@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۹

مقایسه با سلول‌های سالم باعث می‌شود که مواد مغذی و اکسیژن از دسترس سلول‌ها سالم خارج شده و از رشد این سلول‌ها جلوگیری شود (۱،۲). سرطان پستان از شایع‌ترین سرطان‌هایی است که در زنان به وسیله هورومون‌های جنسی ایجاد می‌شود. هورمون جنسی استروژن نقش مهمی در ابتلا به سرطان پستان ایفا می‌کند. بنابراین تمام فاکتورهایی که بدن انسان را با میزان بیشتری از این هورمون و به مدت طولانی‌تر مواجهه می‌کند، می‌تواند از ریسک فاکتورهای ابتلا به سرطان پستان باشد (۳). برای درمان سرطان از شیوه‌های مختلفی از جمله شیمی درمانی، پرتو درمانی، درمان هورمونی و ایمونوتراپی استفاده می‌شود (۴). در شیمی درمانی، از داروهایی با هدف نابود کردن سلول‌ها و متوقف کردن تقسیم سلولی استفاده می‌گردد که سرانجام به پیشگیری از رشد و گسترش سلول‌های سرطانی می‌انجامد (۵). جمسیتابین نوعی داروی ضد سرطان است که در درمان سرطان‌هایی نظیر پروستات، ریه، تخمدان و پستان کاربرد دارد. این آنتی متابولیت ضد سرطان، سلول‌های سرطانی را در مرز فازهای G و S متوقف کرده و بدین گونه از پیشرفت سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند.

در سطح مولکولی، جمسیتابین بوسیلهٔ ناقل‌های نوکلئوزیدی وارد سلول می‌شود و تحت تاثیر آنزیم دئوکسی سیتیدین کیناز دارای یک گروه فسفات شده و در ادامه با عمل آنزیم پریمیدین نوکلئوزید فسفات کیناز تبدیل به جمسیتابین دی فسفات می‌شود که این مولکول دو فسفاته در عملکرد آنزیم ردوکتاز اختلال ایجاد می‌کند که باعث کاهش غلظت نوکلئوتیدهای سیتیدین در سلول می‌شود. در نهایت جمسیتابین دو فسفاته بر اثر آنزیم نوکلئوزید دی فسفات کیناز، سه فسفاته شده و تبدیل به جمسیتابین تری‌فسفات می‌شود. جمسیتابین تری فسفات با نوکلئوتیدهای سیتیدن بر سر قرار گرفتن در زنجیره پلی نوکلئوتیدی، هنگام همانند سازی، رقابت نموده و با توجه به کاهش غلظت نوکلئوتید سیتیدین در سلول بر اثر اختلال در عملکرد آنزیم ردوکتاز، جمسیتابین سه فسفاته در ساختمان رشته پلی نوکلئوتیدی DNA قرار می‌گیرد و از آنجا که برای آن در سلول نوکلئوتید مکملی وجود ندارد، ادامهٔ ساخت رشته پلی نوکلئوتیدی متوقف و سلول به سمت آپوپتوز سوق داده می‌شود (۶،۷). بیماران معمولاً، پاسخ اولیه خوبی را به شیمی درمانی با جمسیتابین می‌دهند اما به مرور زمان، مقاومت دارویی جمسیتابین می‌تواند، ادامه درمان را محدود کند (۶).

اما این دارو هنوز هم با وجود محدودیت‌هایی که دارد، یک داروی محبوب در میان داروهای شیمی درمانی محسوب می‌شود. بنابراین لازم است که یک سیستم تحویل مؤثر که بتواند از پدیده مقاومت دارویی عبور کند و شاخص درمانی را بهبود بخشد، مورد نیاز است. نیوزوم‌ها، یکی از حامل‌های دارویی محبوب هستند که از خودتجمعی سورفکتانت‌های غیرآلی و کلسترول در یک فاز آبی بصورت دولایه لیپیدی تشکیل می‌شوند. نیوزوم‌ها، زیست‌تخریب‌پذیر، زیست‌سازگار و غیرایمونوژنیک هستند. آن‌ها دارای نیمه عمر طولانی و پایداری بالا بوده که تحویل دارو را در محل هدف کنترل می‌کنند (۸). در سال‌های اخیر، پتانسیل نیوزوم‌ها بعنوان حامل دارو به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است (۹). هدف از پژوهش حاضر، ساخت نانو نیوزوم‌های پگیله حاوی جمسیتابین و بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن‌ها از منظر بازده درون گیری، الگوی رهایش دارو، اندازه، بار سطحی و شکل ظاهری می‌باشد که در پایان علاوه بر بررسی سمیت سامانه نیوزومی فاقد دارو با غلظت‌های مختلف بر سلول‌های سالم رده‌ی HFF، سمیت جمسیتابین نیوزومه، جمسیتابین نیوزومه نشده و سامانه نیوزومی فاقد دارو بر رده‌ی سلولی MCF-7 سرطان پستان ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر نوعی مطالعه آزمایشگاهی بوده که طی ۶ ماه در پردیس بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد و شرکت دانش بنیان ریز زیست فناوران فردانگر یزد به انجام رسیده است.

مواد شیمیایی

داروی جمسیتابین بصورت پودر لیوفیزه شده سفید رنگ که در ویال‌های ۱۰۰۰ میلی گرم یکبار مصرف متعلق به برند Pharma Resources GmbH آلمان، اسپن ۶۰ و کلسترول متعلق به شرکت Merck آلمان، پلی اتیلن گلیکول (DSPE-PEG 2000) متعلق به شرکت Lipoid آلمان و قرص Phosphate Buffered Saline(PBS) با کد P4417 از شرکت Sigma ایالات متحده آمریکا تهیه و خریداری شد. همچنین مواد شیمیایی استفاده شده در آنالیزهای سلولی شامل محیط کشت آماده DMEM، سرم جنین گاوی (FBS) و تریپسین به همراه آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین متعلق به شرکت GIBCO ایالات متحده آمریکا خریداری و آماده‌سازی شده‌اند.

بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی داروی جمسیتابین

الف) بررسی خصوصیات فیزیکی دارو و انتخاب حلال مناسب: داروی جمسیتابین، یک داروی آنتی‌متابولیت ضد سرطانی است که برای درمان سرطان‌های تخمدان، سرطان ریه و پانکراس و مثانه در مراحل پیشرفته استفاده می‌شود. حلال مورد استفاده برای این دارو با توجه به ساختار هیدروفیل آن، آب می‌باشد. این دارو با شناسه ۶۰۷۵۰ در پایگاه داده PubChem مشخصه‌یابی شده است.

ب) اسپکتروفتومتری دارو برای تعیین طول موج بیشینه و رسم نمودار استاندارد دارو در ایزوپروپیل و بافر فسفات سالین: ابتدا استوک دارو در حلال مناسب آبی در غلظت‌های متفاوتی تهیه گردیده و طیف آن در بازه طول موج ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر رسم گردید. سپس بیشترین میزان جذب این دارو که در تمامی طیف‌ها تکرار پذیر بوده است بررسی و طول موج بیشینه دارو انتخاب گردید. به منظور رسم نمودار استاندارد دارو و بدست‌آوردن معادله خط آن، غلظت‌های متعدد وزنی – حجمی از دارو به روش سری استاندارد در ایزوپروپیل و بافر فسفات سالین ساخته شد. سپس جذب نوری آن‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج بیشینه و تکرارهای ۳ تایی (محدوده تابعیت رابطه جذب و غلظت از قانون Beer-Lambart) اخذ گردیده و بر اساس آن نمودار استاندارد، معادله خط و ضریب رگرسیون تعیین شد (۱۰).

طراحی فرمولاسیون نیوزومی و اقدام جهت آماده‌سازی و سنتز آن

در این مطالعه، با توجه به امکانات آزمایشگاهی موجود، روش سنتز فیلم نازک لیپیدی با استفاده از دستگاه روتاری و حلال کلروفرم بعنوان یک حلال مناسب جهت محلول‌سازی نمونه‌ها و تبخیر مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اهداف پروژه، دو سامانه نیوزومی با ترکیب اسپن ۶۰ و کلسترول با درصد مولی ۷۰:۳۰ (فرمولاسون F_1) و ۸۰:۲۰ (فرمولاسون F_1) و غلظت اولیه دارو ۰/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر ساخته شد که خلاصه آن به شرح زیر است:

ساخت فیلم نازک لیپیدی

ابتدا اسپن ۶۰ و کلسترول را با درصد مولی که در بالا اشاره شد، در حلال کلروفرم و در دمای ۴۵ درجه سلسیوس بر روی روتاری (هایدولف، آلمان) با ۱۵۰ دور در دقیقه حل شده و تحت شرایط خلأ، فیلم نازک خشک تهیه گردید.

هیدراته کردن فیلم نازک لیپیدی و افزودن دارو: هیدراته کردن با افزودن مقدار مشخصی آب مقطر استریل به همراه داروی جمسیتابین، طی مدت ۶۰ دقیقه و در دمای ۵۵ درجه سلسیوس انجام گردید. سپس نانوذرات تهیه شده، با استفاده از سونیکاتور پروبی کاهش سایز داده شد (۱۰).

بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوسامانه نیوزومی

الف) بررسی میزان داروی بارگذاری شده در حامل‌های نیوزومی و انتخاب فرمولاسون مناسب به منظور بهینه سازی با پلی اتیلن گلیکول(PEG):

برای این منظور ابتدا نانو نیوزوم‌ها را بعد از کاهش سایز وارد کیسه دیالیز نموده و به مدت یک ساعت درون بشری با ۴۵۰ سی سی از بافر فسفات سالین و در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد تا جمسیتابین آزاد و درونگیری نشده حذف گردد. سپس نمونه نیوزومی حاوی دارو با استفاده از حلال ایزوپروپیل، رقیق و زمان کافی داده شد تا نیوزوم شکسته شده و دارو آزاد شود. در ادامه میزان جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج بیشینه جمسیتابین تعیین گردید و با توجه به معادله خط تعیین شده در نمودارستاندارد دارو در حلال ایزوپروپیل و رابطه ۱، میزان بارگذاری دارو تعیین گردید (۱۰،۱۱).

$$Entrapment\ Efficiency(EE\%) = \frac{Encapsulated\ Drug\ Concentration \times 100}{Primary\ Drug\ Concentration}$$

رابطه ۱

در پایان این مرحله، فرمولاسیون مناسب بر اساس میزان بارگذاری دارو انتخاب گردید و با ۵٪ پلی اتیلن گلیکول بهینه شد. برای این منظور اسپن ۶۰، کلسترول و پلی اتیلن گلیکول را در حلال کلروفرم حل نموده و بعد از تهیه فیلم نازک، با افزودن آب مقطر به همراه داروی جمسیتابین عمل هیدراته به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس انجام شد.

ب) بررسی الگوی رهایش دارو از سامانه نیوزومی پگیله در شرایط برون تنی:

به منظور شبیه سازی رهایش دارو از حامل نیوزومی در محیط درون تنی(*in vivo*)، از PBS استفاده گردید. ابتدا ۰/۵ میلی لیتر از نمونه نیوزومی به کیسه دیالیز منتقل می‌شود و کیسه دیالیز به همراه مگنت مغناطیسی برای ایجاد لرزش مناسب کیسه بر روی دستگاه استیرر، به فالکونی ۱۰ سی سی که دارای فسفات سالین است، منتقل می‌شود. فالکون در ظرف حاوی آبی که شرایطی مشابه سلول سالم (دمای ۳۷ درجه

سلسیوس و pH برابر ۷/۴) و شرایطی مشابه سلول سرطانی (دمای ۴۲ درجه سلسیوس و pH برابر ۵/۴) بصورت جداگانه تنظیم شده است بر روی استیرر قرار گرفت. طی زمان‌های ۰/۵، ۱، ۳، ۴، ۵، ۶، ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت (برای بررسی رهایش در شرایط مشابه سلول‌های سالم) و ۰/۵، ۱، ۳، ۴، ۵، ۶، ۹، ۲۴ و ۴۸ ساعت (برای بررسی رهایش در شرایط مشابه سلول‌های سرطانی)، از بافر اطراف کیسه، نمونه برداشته و به همان مقدار از نمونه برداشته شده، بافر تازه جایگزین شد. جذب نمونه در زمان‌های مختلف با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد و با جای‌گذاری در معادله خط بدست آمده از نمودار استاندارد دارو در بافر PBS، درصد رهایش تجمعی دارو در زمان‌های مختلف مشخص و نمودارهای رهایش تجمعی در برابر زمان، در شرایط مشابه سلول سالم و سرطانی رسم گردید (۱۰،۱۱).

پ) مدل پیش‌بینی سینتیک رهایش دارو:

رهایش دارو از فرمول پگیله شده با استفاده از مدل‌های ریاضی مرتبه صفر، مرتبه اول، هیگوچی و کورسمیر-پپاس برآورد شد. همچنین تحلیل رگرسیون غیرخطی در پایتون برازش و برای هر مدل R^2 (ضریب رگرسیون) محاسبه گردید.

الف) مدل درجه صفر: مدل مرتبه صفر نوعی مدل خطی برای توصیف رهایش دارو است که با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$C_0-C_t= K_0t$$

که C_t مقدار داروی آزاد شده در زمان t، C_0 مقدار داروی اولیه و K_0 ثابت انتشار مرتبه صفر است.

ب) مدل مرتبه یک: مدل ریاضی مرتبه اول نیز برای توصیف جذب و یا حذف دارو استفاده می‌شود. فرمول انتشار دارو که از این مدل پیروی می کند بصورت زیر است:

$$\mathrm{LogC= LogC_0 - \frac{Kt}{2.303}}$$

که در آن C_0 غلظت اولیه دارو، K_t ثابت سرعت، و t زمان است.

ج) مدل هیگوچی: فرمول پیش بینی سنتیکی رهایش دارو بر اساس این مدل بصورت زیر است:

$$Q = K_H \times t^{0.5}$$

که Q مقدار داروی آزاد شده در زمان t است و K_H ثابت مدل هیگوچی است.

د) مدل کورسمیر-پپاس: نوعی مدل ساده برای پیش بینی رهایش از دارو از سیستم‌های پلیمری است که از معادله زیر محاسبه می شود:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n$$

که M_t مقدار آزاد شدن دارو در زمان، M_∞ مقدار آزاد شدن دارو در زمان بی نهایت، K ثابت کوسمایر-پپاس، n توان انتشار کورسمایر-پپاس و t زمان انتشار است (۱۲).

ت) تعیین اندازه نانو ذرات و پتانسیل زتا نانو ذرات نیوزومی پگیله شده حاوی دارو:

پتانسیل زتای (Zeta-Potential) فرمولاسیون‌های نیوزومی و سایز آن‌ها، با استفاده از دستگاه زتا سایزر شرکت Malvern Instruments مدل Nano-Zeta Sizer ES در دمای اتاق و زاویه ۹۰° اندازه‌گیری گردید.

ت) تصویربرداری از نانو سامانه نیوزومی پگیله شده:

مقدار ۲۵ میکرو لیتر از نمونه نیوزومی بر روی یک لام ریخته و محلول در مجاورت هوا خشک شد. نمونه‌ها چند ثانیه با طلا پوشش داده شده تا رسانا شوند. سپس مورفولوژی سطحی نانوحامل‌ها با استفاده از میکروسکوپ FE-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscope) بررسی گردید.

آنالیز سلولی

الف) رده سلولی و محیط کشت

در مطالعه حاضر از رده‌ی سلولی MCF-7 سرطان پستان و رده سلولی سالم فیبروبلاستی HFF به منظور بررسی میزان القای سمیت استفاده شد که از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران تهیه و خریداری گردید. هر دو رده سلولی اپیتلیالی بوده و الگوی رشد چسبنده داشتند و جهت آماده‌سازی و پاساژ سلول‌ها از محیط کشت DMEM high glucose همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، استفاده گردید.

ب) تعیین سمیت سلولی نیوزوم‌های پگیله شده

سمیت سلولی با روش MTT برای فرمولاسیون بهینه شده به کار گرفته شد. به منظور اندازه گیری سمیت، سلول‌ها به طور جداگانه با غلظت ده هزار در هر چاهک در پلیت ۹۶ تایی به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با حجم یکسانی از محیط کشت تازه، تیمار شدند. به محیط کشت سلول‌های فیبروبلاستی سالم HFF به ترتیب غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۰۰ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از سامانه نیوزومی فاقد دارو و به محیط کشت سلول‌های سرطان پستان رده MCF-7، بصورت جداگانه غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۲۵۰

میکروگرم بر میلی لیتر نیوزوم حاوی دارو، نیوزوم فاقد دارو و داروی آزاد (غیر نیوزومه) به صورت سه بار تکرار افزوده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. بعد انکوبه شدن، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. بعد از آن مایع رویی خارج شد و به منظور حل کردن کریستال‌های فورمازون ۱۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید. در هر مرحله برای خارج کردن مایع رویی، سانتریفوژ صورت گرفت و جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر ثبت گردید. و در نهایت با توجه به رابطه ۲ درصد زنده مانی سلول‌ها محاسبه شد.

$$\frac{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت} - \text{میانگین جذب نوری در گروه آزمون}}{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت} - \text{میانگین جذب نوری در گروه کنترل}}$$

رابطه ۲

نرم افزارهای مورد استفاده

در پژوهش حاضر به منظور تفسیر داده‌های عددی حاصل از آزمون‌ها، انحراف معیار و انحراف از میانگین داده‌های هریک از آزمون‌ها در محیط نرم افزار Excel ورزن ۲۰۲۴ محاسبه و نمودارهای مرتبط با رهایش دارو و استاندارد در محیط Excel رسم گردید. همچنین به منظور بررسی‌های آماری و معنادار بودن داده‌ها و رسم نمودارهای زنده مانی سلولها از نرم افزار گراف پد پریسم ورژن ۱۰,۴,۱,۶۲۷ استفاده گردید. همچنین به منظور مدلسازی ریاضی داده‌های رهایش از محیط پایتون استفاده شد.

نتایج

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی داروی جمسیتابین

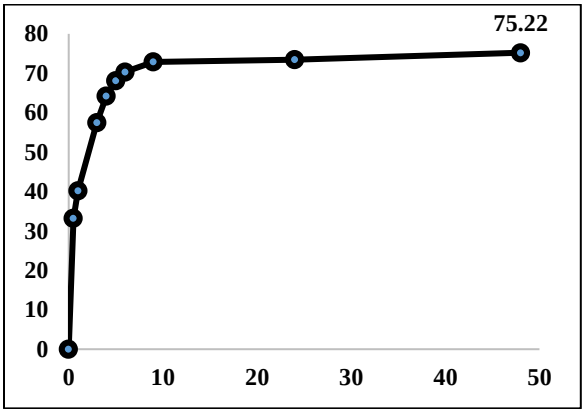
طیف اسپکتروفتومتری داروی جمسیتابین در بازه طول موج ۲۰۰-۸۰۰ نانومتر رسم گردید و مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت. با توجه به بررسی‌های صورت گرفته در طیف‌های حاصل از رقت‌های مختلف دارو، طول موج بیشینه، ۲۷۲ نانومتر تعیین گردید و با طول موج رفرنس در پایگاه‌های اطلاعاتی معتبر، سنجیده شد. نمودار استاندارد جمسیتابین در ایزوپروپیل با استفاده از روش سری استاندارد، رسم شد. این نمودار که نشان دهنده رابطه خطی میان جذب دارو و غلظت آن می‌باشد، دارای ضریب رگراسیون ۰/۹۹۴۹ و معادله خط حاصل درجه یک y=۰/۰۴۱۱x -۰/۰۵۵۷ بوده که صحت رابطه خطی جذب دارو و غلظت را تأیید می‌کند. همچنین نمودار استاندارد دارو در حلال PBS، دارای ضریب رگراسیون ۰/۹۹۶۲ و معادله خط درجه یک y=۰/۰۳۳۹x +۰/۰۰۵۱ می‌باشد.

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانو سامانه نیوزومی

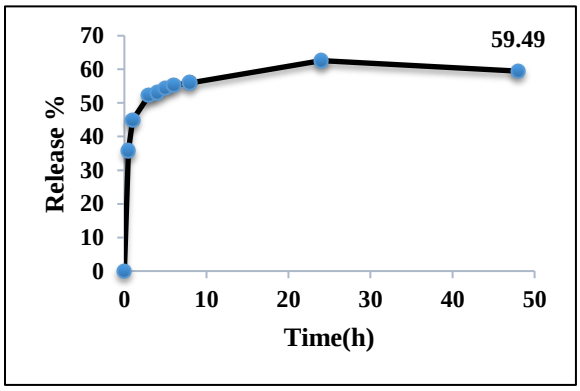
میزان درون‌گیری داروی جمسیتابین با استفاده از معادله خط حاصل از نمودار استاندارد دارو در حلال ایزوپروپیل و با استفاده از رابطه ۱، برای فرمولاسیون F_1، ۱۲/۷۹±۳۴/۱ و برای فرمولاسون F_2، ۷۳/۶۳±۳۶/۱ درصد تعیین شد.

با توجه به بارگذاری بالاتر دارو در نیوزوم‌های حاصل از فرمولاسیون F_2، فرمولاسیون F_2، جهت بهینه سازی و انجام مراحل بعدی آزمایش انتخاب گردید. همچنین بررسی میزان بارگذاری دارو در سامانه پگیله شده نشان داد که میزان بارگذاری دارو در این سامانه نیوزومال،۳/۲۸±۳۹/۱ درصد می‌باشد. میزان رهاسازی دارو از نانوحامل نیوزومی پگیله شده، طی ۴۸ ساعت در شرایطی مشابه سلول سالم (۳۷ درجه سلسیوس و pH برابر ۷/۴) و شرایطی مشابه سلول سرطانی (۴۲ درجه سلسیوس و pH برابر ۵/۴) اندازه گیری و منحنی‌های درصد رهایش تجمعی دارو در برابر زمان برای بررسی الگوی رهایش، رسم گردید (نمودار ۱ و ۲). بررسی الگوی رهایش داروی جمسیتابین طی ۴۸ ساعت مشخص می‌کند که الگوی رهایش داروی جمسیتابین از نانوحامل نیوزومی در شرایط مشابه سلول سرطانی و سالم کنترل شده و پیوسته و آهسته می‌باشد. حداکثر رهایش دارو در شرایط مشابه سلول سالم و سرطانی به ترتیب ۵۹/۴۹ و ۷۵/۲۲ درصد می‌باشد.

نمودار ۱- نمودار رهایش داروی جمسیتابین طی ۴۸ ساعت از سامانه نیوزومی پگیله در دمای ۳۷ سلسیوس و pH برابر ۷/۴



نمودار ۲- نمودار رهایش داروی جمسیتابین طی ۴۸ ساعت از سامانه نیوزومی پگیله در دمای ۴۲ سلسیوس و pH برابر ۵/۴

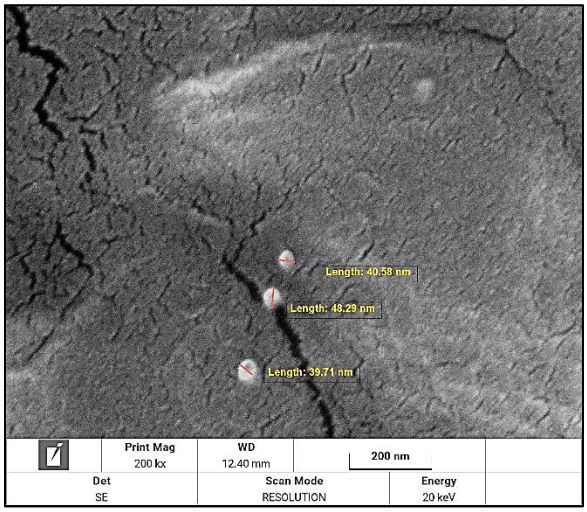


همچنین نتایج حاصل از مدلسازی ریاضی داده های رهایش در جدول ۱ گزارش شده است.

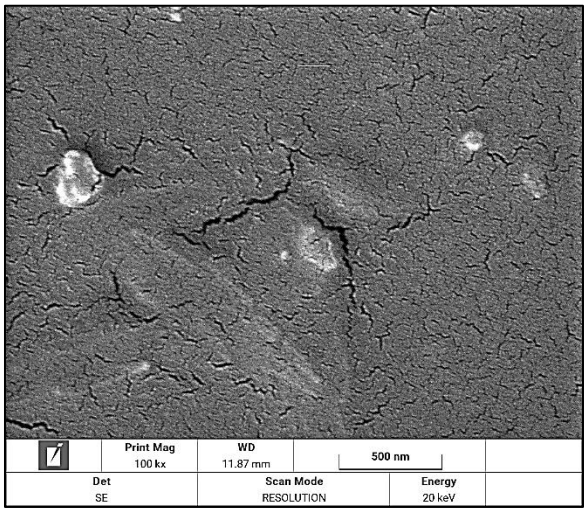
	pH برابر ۷/۴ دما: ۳۷ درجه سلسیوس	pH برابر ۵/۴ دما: ۴۲ درجه سلسیوس
مدل مرتبه صفر	R^2= ۰/۲۳۶	R^2= ۰/۲۶۸
مدل مرتبه اول	R^2= ۰/۸۲۹	R^2= ۰/۶۴۸
مدل هیگوچی	R^2= -۰/۸۴۲	R^2= -۰/۲۸۷
مدل کورسمیر- پپاس	R^2= ۰/۹۷۸ n= ۰/۰۹۷ K= ۴۴/۶۷	R^2= ۰/۹۱۴ n= ۰/۱۴۲ K=۴۸/۲۸

جدول ۱- پارامترهای سینتیکی و مقادیر آماری مدل‌های مختلف ریاضی

نتایج حاصل از DLS میزان اندازه را برای نانوذره قبل از درون گیری دارو ۸۴/۵ نانومتر و برای نانوذره بعد از درون گیری دارو ۱۲۶/۶ نانومتر را نشان می‌دهد. مقایسه این دو عدد مشخص می‌کند که درون گیری دارو سبب شده است که قطر نانوذره به میزان تقریبی ۴۲/۱ نانومتر، افزایش یابد که می‌تواند ناشی از ورود دارو به سامانه باشد. بار سطحی نانوحامل قبل از درون‌گیری، ۰/۴۶±۴۶/۱۱- میلی‌ولت و بعد از درون گیری عدد ۰/۴۲±۲۹/۹۱- میلی ولت را نشان می‌دهد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که درون گیری دارو در سامانه سبب مثبت‌تر شدن نانوحامل شده است. تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی (تصاویر ۱ و ۲) نشان می‌دهد نانو ذرات نیوزومی تشکیل گردیده و مورفولوژی نانوذرات نیوزومی پگیله شده در هردو شرایط (قبل و بعد از بارگذاری دارو)، کروی بوده و سطح آن‌ها صاف و هموار است و همچنین نانوذرات هیچ گونه تجمع ناخواسته‌ای که سبب آگلومره شدن و ایجاد رسوب و ناپایداری گردد، نشان نمی دهند. همچنین خط اندازه‌گیری رسم شده در تصویر قبل از بارگذاری دارو، اندازه زیر ۱۰۰ نانومتر را برای نانوذرات نشان می‌دهد که نزدیک به ابعاد اندازه گیری شده با دستگاه DLS است.



تصویر ۱- تصویر FE-SEM از نانوسامانه نیوزومی پگیله قبل از بارگذاری دارو



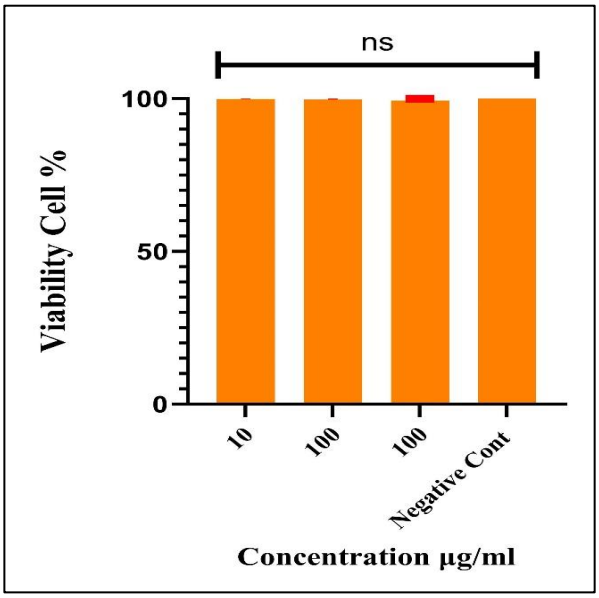
تصویر ۲- تصویر FE-SEM از نانوسامانه نیوزومی پگیله بعد از بارگذاری دارو

بررسی سمیت نانوسامانه نیوزومی پگیله حاوی داروی جمسیتابین

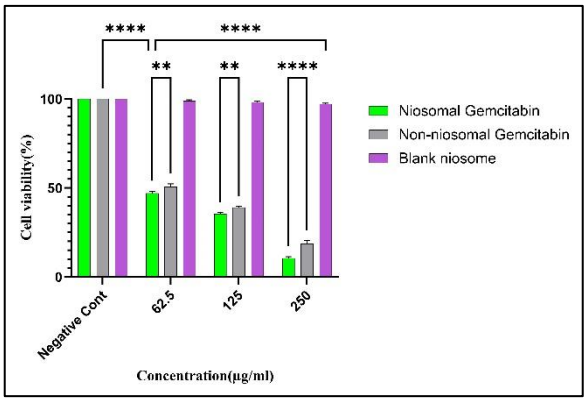
اثر سمیت سلولی دارو بر سلول‌های سرطان پستان رده MCF-7 در دو حالت آزاد و نانوحامل، بررسی گردید و همچنین سمیت سلولی نانوحامل فاقد دارو نیز بر سلول‌های سالم رده

HFF، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی سمیت فرمولاسیون نیوزومی بدون دارو بر روی سلول‌های سالم رده HFF در ۳ غلظت ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان می‌دهد که این نانو حامل نیوزومی سمیت کمی بر رده سلولی HFF دارد، که در مقایسه با گروه کنترل، معنادار نیست (نمودار ۳). همچنین بررسی بقای سلولی بعد از تیمار رده سلولی MCF-7 سرطان پستان با غلظت ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی آزاد، ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از سامانه حاوی دارو و ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از سامانه فاقد دارو نشان می‌دهد که سامانه نیوزومی فاقد دارو از سمیت کمی بر رده سلولی MCF-7 برخوردار است و سامانه نیوزومی حاوی دارو نسبت به داروی آزاد دارای سمیت بالاتری بر رده سلولی MCF-7 است. نتایج کامل سمیت و معناداری نتایج در نمودار ۴ گزارش شده است.

نمودار ۳- سمیت سامانه نیوزومی بدون دارو بر رده سلولی HFF



نمودار ۴- سمیت سامانه نیوزومی پگیله حاوی دارو، داروی آزاد(نیوزومه نشده) و سامانه پگلیه فاقد دارو بر رده سلولی MCF-7
(عدم معناداری :ns و $p - valu < 0.01$:**)



بحث

اهداف نهایی یک پروژه، پس از انتخاب روش مناسب، در سنتز یک نانوحامل بهینه با خصوصیات مطلوب و مطابق با استانداردهای علمی دنیا، از ضروریات مطالعاتی است که در ساخت نانوحامل‌ها صورت می‌پذیرد. پژوهش حاضر منتهی به ساخت سامانه نیوزمی پگیله حاوی داروی جمسیتابین با بازده درونگیری ۳۹/۱ درصد، اندازه ذرات ۱۲۶/۶ نانومتر و پتانسیل زتای ۰/۴۲±۲۹/۹۱- میلی ولت با سمیت بالا بر رده سلولی MCF-7 سرطان پستان گردید. یکی از شاخصه‌های مهم نانوحامل‌های دارویی، بازده درونگیری دارو می‌باشد. باید توجه داشت که عوامل متعددی از جمله طول زنجیره‌های آبگریز لیپیدهای موجود در ساختار سامانه لیپیدی، درصد مولی کلسترول موجود در ساختمان سامانه لیپیدی، اندازه سر آبدوست سورفکتانت، نسبت لیپید به ماده فعال، روش تولید و پگیله کردن سامانه نیوزومی بر میزان بارگذاری دارو درون سامانه‌های نیوزومی تاثیرگذار می‌باشند (۱۳). در پژوهش حاضر از اسپن ۶۰، کلسترول و پلی اتیلن گلیکول(PEG) برای ساخت نانو حامل‌های نیوزومی پگیله استفاده شد. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که اسپن ۶۰ با داشتن دمای انتقال فاز بالا، می‌تواند بارگذاری بهتری را برای دارو فراهم نماید و در نهایت باعث بهبود درصد درونگیری دارو گردد (۱۴، ۱۵). عامل تأثیرگذار دیگر در میزان بازده درون‌گیری دارو درصد مولی کلسترول می‌باشد. در واقع حضور کلسترول با غلظت‌های مولی پایین در غشا باعث افزایش پایداری و استحکام غشا می‌شود، بنابراین از گسیختگی و فروپاشی غشا می‌کاهد و بدین ترتیب از نشت دارو به بیرون غشا جلوگیری نموده و بازده درونگیری را افزایش می‌دهد. از طرفی اگر افزایش میزان کلسترول موجود در غشا از حد معینی بیشتر شود، میزان سیالیت غشا افزایش یافته، بنابراین میزان نفوذپذیری غشا زیاد و بازده درونگیری دارو کاهش می‌ابد (۱۳، ۱۶، ۱۷). فاکتور دیگر تاثیر گذار بر میزان بارگذاری دارو، استفاده از پلیمر PEG است که در ساخت سامانه نیوزومی پژوهش حاضر نیز استفاده شده است. پژوهش‌هایی از جمله Haghiralsadat و همکاران در سال ۲۰۱۷ و ساسانی و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان می‌دهند که حضور PEG در ساختار سامانه‌های لیپیدی منجر به افزایش بارگذاری دارو می‌گردد (۱۷،۱۸).

شاخصه دیگری که در این پژوهش بررسی شد، الگوی رهایش دارو از سامانه نیوزومی پگیله در شرایط مشابه سلول سالم و سرطانی بود. رهایش دارو از نانوسامانه در این پژوهش آهسته می‌باشد، این پدیده مناسب می‌تواند ناشی از غلظت مولی مناسب کلسترول و حضور پلیمر PEG در ساختمان سامانه حاوی دارو باشد. به گونه‌ای که برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد که افزایش کلسترول به دلیل زیاد نمودن سیالیت غشا باعث افزایش رهایش دار و استفاده از PEG باعث کنترل رهایش می‌گردد (۱۰،۱۶). همچنین در پژوهش حاضر میزان رهایش دارو از نیوزوم‌ها در شرایط سلول‌های سرطانی بیشتر از شرایط سلول‌های سالم است، که این خود نشان دهنده‌ی تحویل هدفمندتر دارو در شرایط سلول‌های سرطانی است (۱۰). مجدی زاده و همکاران در ۲۰۱۸، موسوی‌زاده و همکاران در ۲۰۱۹، شاهی و همکاران در ۲۰۱۹ و Ebrahimpour و همکاران در ۲۰۲۲، رهایش آهسته، پیوسته و دوفازی را برای سامانه‌های لیپیدی حاوی دارو گزارش نموده‌اند (۲۰، ۱۹، ۱۱، ۱۰). مدلسازی ریاضی داده‌های رهایش نشان می‌دهد که مدل کورسمیر-پپاس نسبت به مدل‌های دیگر می‌تواند فرآیند رهایش دارو از سامانه پگیله نیوزومال را با دقت بالاتری در شرایط مشابه سلول‌های سالم و سرطانی پیش بینی نماید. همچنین با توجه به مقدار n بدست آمده از این مدل می توان نتیجه گرفت که انتشار دارو از سامانه لیپیدی، در شرایط مشابه سلول‌های سالم و سرطانی از قانون فیک پیروی می کند (۱۲). از فاکتورهای مهم در بررسی نانوذرات لیپیدی، میزان پایداری نانو ذرات می‌باشد که یکی از عوامل موثر بر آن پتانسیل زتا نانو ذرات است. میزان پتانسیل زتا در پژوهش حاضر برای سامانه‌ی نیوزومی قبل و بعد از درون‌گیری دارو به ترتیب ۴۶/۱۱- و ۲۹/۹۱- میلی‌ولت اندازه گیری شد. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که با افزایش میزان پتانسیل زتا، پایداری نانوذرات افزایش می‌یابد (۲۰-۲۲). همچنین بار سطحی منفی نانوسامانه‌های پژوهش حاضر، با توجه به اینکه پتانسیل زتای اکثر سلول‌های بدن بین ۱۹/۴- تا ۳۱/۸- میلی ولت است (۲۴)، نشان می‌دهد که ممکن است، سامانه های نیوزومی پژوهش حاضر از ایمونوژنیسیتی کمی برخوردار باشد. هرچند تایید این نتیجه نیازمند آزمایش‌های تکمیلی است. از سوی دیگر با افزوده شدن دارو به نانو سامانه، مقدار بار سطحی نانوسامانه مثبت‌تر شده است. برخی از پژوهش‌ها نظیر

حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۸، گزارش نموده‌اند که، حامل‌های دارویی با بار مثبت، نسبت به سامانه‌های خنثی و منفی سمیت بیشتری برای سلول‌های سرطانی دارند (۲۵). این بخش از پژوهش حاضر با پژوهش مجدی زاده و همکاران در سال ۲۰۱۸، ساسانی و همکاران در سال ۲۰۲۰، میرزایی و همکاران در ۲۰۲۱ و Siyadatpanah و همکاران ۲۰۲۲، همخوانی دارد. در این پژوهش‌ها برای نانوذرات لیپیدی حاوی دارو، بار سطحی منفی گزارش شده است (۲۸-۲۶، ۱۱).

نتایج پژوهش حاضر در بخش سلولی، نشان می‌دهد که سامانه نیوزومی پگیله از سمیت ناچیزی بر رده سلولی HFF برخوردار است. نتایج این بخش از این پژوهش با نتایج نفیسی مقدم و همکاران و همکاران در سال۲۰۲۴، همخوانی دارد (۱۲). همچنین پژوهش حاضر نشان می‌دهد که داروی جمسیتابین نیوزومه شده در غلظت‌های مختلف، بصورت معنادار، نسبت به داروی آزاد سمیت بیشتری برای سلول‌های MCF-7 سرطان پستان ایجاد نموده است. بهرامی بنان و همکاران در سال ۲۰۱۸، طائب پور و همکاران در سال ۲۰۲۱، افتخاری وش و همکاران در ۲۰۲۴ و مجید زاده و همکاران در سال ۲۰۲۵، در پژوهشهای خود گزارش نمودند که سامانه های لیپیدی می‌تواند سمیت ماده بارگذاری شده را نسبت به ماده آزاد بر سلول‌های سرطانی افزایش دهند (۳۲-۲۹).

پژوهش حاضر اگرچه منتهی به سامانه نیوزومی پگیله شده حاوی جمسیتابین با ویژگیهای مناسب فیزیکوشیمیایی شد، ولی دارای کاستی‌هایی است. عدم بررسی سامانه بر رده‌های سلولی سرطانی مختلف، عدم بررسی فرمولاسیونهای نیوزومی متنوع، از پلاسمای خون به جای PBS در فرآیند رهایش و عدم بررسی غلظتهای مختلف سامانه نیوزمی در فرآیند MTT از جمله کاستی‌های پژوهش حاضر میباشد که انجام و برطرف نمودن آن، به پژوهشگران بعدی پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

سرطان پستان یکی از رایج‌ترین انواع سرطان‌هایی است که بخشی قابل توجهی از جامعه زنان را تحت تاثیر قرار می‌دهد و برای درمان آن معمولا از جراحی، شیمی درمانی و پرتو درمانی استفاده می‌شود. داروی شیمی‌درمانی جمسیتابین، یک آنتی‌متابولیت ضدسرطانی رایج در درمان سرطان‌های پیشرفته از جمله سرطان پستان است که با تغییر در ساختار DNA، سبب مرگ سلولی و آپوپتوز می‌شود. اما با وجود محبوبیت این دارو، به دلیل اثرات سیتوتوکسیتی دارو و غیر هدفمند بودن شیمی درمانی، استفاده از آن در فرم آزاد، چندان مطلوب نمی‌باشد. سامانه نیوزومی پگیله حاوی جمسیتابین که در پژوهش حاضر ساخته شده است، با برخورداری از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسب (اندازه ذرات در مقیاس نانو، پتانسیل زتای منفی، ذرات کروی با سطوح صاف)، رهایش موثرتر در شرایط مشابه سلول‌های سرطانی نسبت به شرایط مشابه سلول‌های سالم و برخورداری از اثرات ضد تکثیری بالا نسبت به داروی آزاد بر رده سلولی MCF-7 سرطان پستان، می‌تواند حاملی مناسبی جهت رسانش جمسیتابین به سلول‌های هدف باشد. هرچند تایید قطعی این نتیجه نیازمند آزمایشات تکمیلی است.

ملاحظات اخلاقی

ندارد.

سپاسگزاری

کلیه هزینه‌های این پژوهش توسط نویسنده اول و نویسنده مسئول تامین گردیده است. همچنین از همکاری گروه بیوتکنولوژی شرکت دانش بنیان زیست فناوران فردانگر قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض در منافعی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان

نویسنده اول: طراحی آزمایش، آنالیز داده‌ها و نوشتن مقاله – نویسنده دوم: انجام آزمایش، آنالیز داده‌ها و نظارت بر انجام پژوهش – نویسنده سوم: انجام آزمایش و تحلیل داده ها نویسنده چهارم(مسئول مکاتبات) طراحی آزمایش، آنالیز داده‌ها، نظارت بر انجام آزمایش و تایید کننده نهایی مقاله – نویسنده پنجم: انجام آزمایش و آنالیز داده‌ها.

منابع

1. Croce CM. Oncogenes and cancer. The New England journal of medicine. 2008; 358(5):502–11.
2. Hadavand-Mirzaei Z, Irani S, Atyabi F. Comparison of cytotoxicity of chitosan- docetaxel nanoparticles and docetaxel anticancer drug on MDA-MB-231 breast cancer cells. Razi Journal of Medical Sciences. 2016; 23(144): 1-18.
3. Renoir J-M, Marsaud V, Lazennec G. Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. Biochemical pharmacology. Elsevier; 2013;85(4):449–65.
4. Liu H, Lv L, Yang K. Chemotherapy targeting cancer stem cells. American journal of cancer research. 2015;5(3):880.
5. Huang CY, Ju DT, Chang CF, Reddy PM, Velmurugan BK. A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non–small cell lung cancer. Biomedicine. 2017 Dec;7(4).
6. de Sousa Cavalcante L, Monteiro G. Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. European journal of pharmacology. 2014 Oct 15;741:8-16.
7. Rajabpour A, Teimoori Toolabi L. Review of molecular mechanisms underlying gemcitabine resistance in pancreatic cancer. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences. 2017;21(4):65-77.
8. Mahale NB, Thakkar PD, Mali RG, Walunj DR, Chaudhari SR. Niosomes: novel sustained release nonionic stable vesicular systems—an overview. Advances in colloid and interface science. 2012 Nov 15;183:46-54.
9. Tavano L, Gentile L, Rossi CO, Muzzalupo R. Novel gel-niosomes formulations as multicomponent systems for transdermal drug delivery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2013 Oct 1;110:281-8.
10. Shahi Malmir H, Kalantar SM, Sasani E, Asgari M, Majdizadeh M, Haghiralsadat BF. Synthesis and optimization of niosomal carriers containing doxorubicin in order to achieve a final formulation with high potential in cancer cells temperature and acidity. SSU_Journals. 2019 Jan 15;26(10):879-94.
11. Majdizadeh M, Rezaei Zarchi S, Movahedpour AA, Shahi Malmir H, Sasani E, Haghiralsadat BF. A new strategy in improving therapeutic indexes of medicinal herbs: preparation and characterization of nano-liposomes containing Mentha piperita essential oil. SSU_Journals. 2018 Feb 15;25(11):853-64.
12. Moghadam RN, Majdizadeh M, Golbashy M, Haghiralsadat F, Hemati M. Laboratory study: Synthesis and optimization of nano nisomes containing Bunium persicum essential oil and investigating its toxicity on Trichomonas vaginalis parasite and HFF cell line. Heliyon. 2024 Aug 8;10(16):e35967. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e35967. PMID: 39224365; PMCID: PMC11367492.
13. Ghanbarzadeh B, Pezeshky A, Hamishehkar H, Moghadam M. Vitamin A palimitate-loaded nanoliposomes: study of particle size, zeta potential, efficiency and stability of encapsulation. Iranian Food Science and Technology Research Journal. 2016; 12(2): 261-75.
14. Prakash PR, Jayasheela MS, Prasad RR, Chandini P, Praveena A, Lakshmi KS, Ramesh P. Candesertan niosomesformulation and evaluation using Span 60 as non-ionic surafactant. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2015;201(57):940-9.
15. Radha GV, Rani TS, Sarvani B. A review on proniosomal drug delivery system for targeted drug action. J Basic Clin Pharm. 2013 Mar;4(2):42-8. doi: 10.4103/0976-0105.113609. PMID: 24808669; PMCID: PMC3979263.
16. Ohvo-Rekilä H, Ramstedt B, Leppimäki P, Slotte JP. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. Progress in lipid research. 2002 Jan 1;41(1):66-97.
17. Haghiralsadat F, Amoabediny G, Sheikhha MH, Zandieh-doulabi B, Naderinezhad S, Helder MN, Forouzanfar T. New liposomal doxorubicin nanoformulation for osteosarcoma: drug release kinetic study based on thermo and pH sensitivity. Chemical biology & drug design. 2017 Sep;90(3):368-79.
18. Sasani E, Shahi Malmir H, Daneshmand F, Majdizadeh M, Haghiralsadat BF. A new study on synthesize and optimization of PEGylated LipoNiosomal nanocarriers containing curcumin for use in cancer chemotherapy. SSU_Journals. 2018 Oct 15;26(6):528-41.
19. Moosavizadeh S, Baghiani M, Majdizadeh M, Haghiralsadat F, Moosavizadeh S. Experimental study: experimental evaluation of phospholipid system containing doxorubicin HCL for use in chemotherapy. JSSU. 2019; 26 (11) :945-956. http://dx.doi.org/10.18502/ssu.v26i11.548
20. Ebrahimpour, M., Akhlaghi, M., Hemati, M., Ghazanfary, S., Shahriary, S., Jafari Ghalekohneh, S., Raeisi, S., Tofighi, D., Haghiralsadat, B., Oroojalian, F. *In vitro* evaluation and comparison of anticancer, antimicrobial, and antifungal properties of thyme niosomes containing essential oil. *Nanomedicine Journal*, 2022; 9(4): 307-318. doi: 10.22038/nmj.2022.66932.1707.

21. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2013;12(2):265-73.
22. Zhao W, Song Zhuang X-RQ. Comparative study of the in vitro and in vivo characteristics of cationic and neutral liposomes. International journal of nanomedicine. Dove Press; 2011;6:3087.
23. Danhier F, Feron O, Préat V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. Journal of Controlled Release. Elsevier; 2010;148(2):135–46.
24. Bondar OV, Saifullina DV, Shakhmaeva II, Mavlyutova II, Abdullin TI. Monitoring of the Zeta Potential of Human Cells upon Reduction in Their Viability and Interaction with Polymers. Acta Naturae. 2012 Jan;4(1):78-81. PMID: 22708066; PMCID: PMC3372997.
25. Haghiralsadat B F, Naderinezhad S, Amoabediny G, Montazeri F, Zandieh Doulabi B. Evaluation of the effects of surface charge on cytotoxicity of liposomal Doxorubicin on bone cancer cell line (Osteosarcoma). Daneshvar Medicine. 2018; 25 (133) :19-26.
26. Sasani E, Shahi Malmir H, Daneshmand F, Majdizadeh M, Haghiralsadat BF. Synthesis and physiochemical characterizing of Liponiosomal hybrid nano-carriers as carriers for Doxorubicin HCl anti-cancer drug. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences. 2020 Apr 20;27(1):35-47.
27. Mirzaei F, Majdizadeh M, Fatahi-Bafghi A, Ehsani R, Haghiralsadat B F. Fabrication and characterization of liposomal nano-carriers containing essential oils of Trachyspermum ammi to counteract Trichomonas vaginalis. Koomesh. 2021; 23 (2) :283-290. http://dx.doi.org/10.52547/koomesh.23.2.283
28. Siyadatpanah A, Norouzi R, Mirzaei F, Haghirosadat BF, Nissapatorn V, Mitsuwan W, Nawaz M, Lourdes M, Hosseini SA, Montazeri M, Majdizadeh M, S. Almeida R, Hemati M, Wilairatana P, Douglas H. Green synthesis of nano-liposomes containing *Bunium persicum* and *Trachyspermum ammi* essential oils against Trichomonas vaginalis. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2022;1(1): https://doi.org/10.1016/j.jmii.2022.06.006.
29. Bahrami-Banan F, Hasan Sheikhha M, Ghasemi N, Majdizadeh M, Haghiralsadat BF. Preparation and Study of Nano-Niosomes Containing Doxorubicin and Evaluation of its Toxicity on Acute Myeloblastic Leukemia Cell Line KG-1. Journal of Payavard Salamat. 2018 Nov 15;12(4):309-323
30. Taebpour M, Majdizadeh M, Haghiralsadat B F. Fabrication and characterization of liposomal nanoparticles containing hydroalcoholic extract of Artemisia absintium and its toxicity on MCF-7 breast cancer cell line. ijbd. 2021; 14 (1) :64-77. http://dx.doi.org/10.30699/ijbd.14.1.64
31. Eftekhari-VashL, Majdizadeh M. Fabrication and physicochemical characterization of liposome system containing Glycyrrhiza glabra hydroalcoholic extract and evaluation of toxicity of free and liposomal extract on healthy human fibroblast cell line (HFF) and MCF-7 breast cancer cell line. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2024;18(4):59-69. https://doi.org/10.22100/jkh.v18i4.2831
32. Majdizadeh, M., Akbarzadeh, S., H Al-Turnachy, H., Hemati, M., Akhlaghi, M., Haghiralsadat, B. F., Oroojalian, F. Synthesis of nano-liposomes containing Mentha piperita essential oil and investigating their stability, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative properties. Nanomedicine Journal, 2025; 12(1): 122-139. https://doi.org/10.22038/nmj.2024.79435.1960