

Design and Synthesis of a Highly Efficient Niosomal Drug Delivery System for Berberine Delivery to Osteosarcoma Cell Line (Saos-2)

Mohammad Javad Pourmahmoudian¹,
Seyed Mahdi Kalantar²,
Bibi Fatemeh Haghirsadat³

¹ MSc in Biotechnology, Department of Genetics, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

² Professor, Department of Genetics, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

³ Assistant Professor, Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

(Received June 22, 2021 ; Accepted September 11, 2021)

Abstract

Background and purpose: Osteosarcoma, as the most common bone cancer has not shown considerable response to current chemotherapy drugs. New nanotechnology-based drug delivery systems seems to be promising in cancer treatment. The aim of this study was to design and synthesize a niosomal nano-carrier for drug delivery of berberine to Saos-2 cell line, as a model of osteosarcoma.

Materials and methods: Different niosome formulations composed of cholesterol (25%) and different surfactants (75%) were prepared using thin film method. The resulting niosome with optimal properties was pegylated by adding 5% of DSPE-mPEG2000. Finally, the cytotoxicity of free form of berberine and berberine-containing pegylated niosome in normal fibroblast cell line (HFF) and Saos-2 cell line were evaluated by MTT assay.

Results: The niosome made of cholesterol (25%) and Tween 60 (75%) showed the highest drug loading and release rate and was selected as the optimal formulation. Findings showed that the optimized pegylated niosome had high loading efficiency and controlled drug release (79.34% and 66.79%, respectively). Finally, MTT assay showed that the berberine-containing pegylated niosome had more toxicity in Saos-2 cell line than the free form of the drug.

Conclusion: The synthesized niosomal nano-carrier had desirable properties such as high loading efficiency and controlled drug release, which can be used as a favorable drug delivery system with low toxicity and high delivery efficiency in order to increase the effect of the drug while reducing its dose.

Keywords: nano-carrier, niosome, osteosarcoma, drug delivery, berberine, bone cancer

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (202): 25-37 (Persian).

* **Corresponding Author:** Bibi Fatemeh Haghirsadat - School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran (E-mail: Fhaghirsadat@gmail.com)

طراحی و ساخت یک سیستم دارورسانی کارآمد بر پایه نانو حامل‌های نیوزومی جهت انتقال بربرین به رده سلولی استئوسارکوما (Saos-2)

محمد جواد پورمحمودیان¹

سید مهدی کلانتر²

بی بی فاطمه حقیرالسادات³

چکیده

سابقه و هدف: درمان استئوسارکوما، به عنوان شایع‌ترین سرطان استخوان با استفاده از داروهای شیمی‌درمانی پاسخ موفق چشمگیری را نشان نداده است. سیستم‌های نوین دارورسانی مبتنی بر نانوفناوری، یک استراتژی امیدوارکننده در درمان سرطان را نوید می‌دهند. هدف از مطالعه حاضر ساخت نانو سامانه نیوزومی جهت دارورسانی بربرین به رده سلولی Saos-2 به عنوان مدلی از استئوسارکوما بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، فرمولاسیون‌های مختلف نیوزومی با نسبت کلسترو (25 درصد) و سورفکتانت‌های مختلف (75 درصد) از طریق روش فیلم نازک تهیه شدند. نانو سامانه حاصل با ویژگی‌های بهینه، از طریق افزودن 5 درصد از DSPE-mPEG2000 به فرمولاسیون بهینه، پگیله شد. در نهایت اثر سمیت سلولی فرم آزاد بربرین و نانو سامانه نیوزومی پگیله حاوی بربرین در رده سلولی فیبروبلاست نرمال (HFF) و رده سلولی (Saos-2) با استفاده از آزمون MTT ارزیابی شد.

یافته‌ها: نانو سامانه نیوزومی ساخته شده با نسبت کلسترو (25 درصد) Tween 60 (75 درصد) بیش‌ترین میزان بارگذاری و رهایش دارو را از خود نشان داد و به عنوان فرمولاسیون بهینه انتخاب شد. نتایج حاصل نشان داد نانو سامانه بهینه نیوزومی پگیله شده کارایی بارگذاری و رهایش دارو به ترتیب 79/34 و 66/79 درصد دارد. در نهایت، براساس نتایج آزمون MTT، نانو سامانه حاوی بربرین اثر سمیت بیش تری نسبت به فرم آزاد دارو در رده سلولی Saos-2 داشته است.

استنتاج: در مطالعه حاضر، نانو سامانه ساخته شده دارای خصوصیات مطلوبی همچون بارگذاری بالا و رهایش کنترل شده دارو بود که می‌توان از آن به عنوان یک سیستم دارورسانی مطلوب با سمیت کم و کارایی بالا، جهت افزایش اثر دارو در کنار کاهش دوز آن در دیگر مطالعات و پژوهش‌ها استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: نانو سامانه، نیوزوم، استئوسارکوما، دارورسانی، بربرین، سرطان استخوان

مقدمه

استئوسارکوما شایع‌ترین تومور بدخیم استخوانی اولیه در کودکان و نوجوانان می‌باشد و به‌طور میانگین 60 درصد از تومورهای بدخیم استخوانی اولیه را که در دو دهه اول زندگی افراد تشخیص داده شده را تشکیل می‌دهد (1).

E-mail: Fhaghirosadat@gmail.com

مؤلف مسئول: بی بی فاطمه حقیرالسادات - یزد: دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، دانشکده پیراپزشکی

1. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

2. استاد، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

3. استادیار، گروه علوم و فنون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

تاریخ دریافت: 1400/4/1 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/4/9 تاریخ تصویب: 1400/6/20

برای دستیابی به هم‌افزایی در اثر داروها، افزایش جذب سلولی از طریق اصلاح سطح نانوذرات (6،7). نانو سامانه‌ها با افزایش تجمع دارو به صورت هدفمند در بافت تومور، میزان دوز درمانی دارو را کاهش می‌دهند. مکانیسم اصلی افزایش تجمع نانوذرات در بافت تومور افزایش نفوذپذیری و ماندگاری است. در حالی که مولکول‌های کوچک می‌توانند آزادانه از عروق هر بافتی عبور کنند و حرکت نانوذرات محدودتر است. مکانیسم دیگری که توسط آن نانوذرات می‌توانند سمیت داروها را کاهش دهند، مربوط به حمل داروهای آنگریز و انتقال به بافت هدف است (8).

نانوسامانه‌های نیوزومی به دلیل زیست‌تخریب‌پذیری، عدم ایجاد ایمنی‌زایی، سمیت کم، توانایی بارگذاری همزمان داروهای آنگریز و آبدوست، کارایی بالا برای بارگذاری دارو، توانایی اصلاح سطحی آسان و مقرون‌به‌صرفه بودن، در سال‌های اخیر بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته‌اند (9). نیوزوم‌ها، وزیکول‌هایی هستند که از خودتجمعی سورفکتانت‌های غیریونی در محیط آبی تشکیل می‌شوند و ساختار دولایه محصور را ایجاد می‌کنند، بنابراین می‌توان از فضای بین دولایه جهت بارگذاری داروهای آنگریز و از فضای محصور داخل نیوزوم جهت بارگذاری داروهای آبدوست بهره برد (10). نانو سامانه‌های نیوزومی به‌طور کلی از دو ترکیب تشکیل می‌شوند: سورفکتانت‌های غیریونی و افزودنی‌ها، کلسترول و فسفولیپیدها از جمله افزودنی‌هایی هستند که در ساخت نیوزوم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. کلسترول عمدتاً به عنوان پایدارکننده و استحکام ساختار دولایه، به ترکیب نیوزوم اضافه می‌شود (11).

بربرین یک متابولیت ثانویه گیاهی مشتق شده از آلکالوئید ایزوکوئینولین است که در ریشه، ساقه، پوست و ریزوم برخی گیاهان به خصوص گیاهان سرده زرشک یافت می‌شود (12). بربرین یک آلکالوئید قوی با خواص دارویی قابل توجهی است، از جمله خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد دیابتی،

درمان استاندارد استئوسارکوما شامل ترکیبی از جراحی و شیمی‌درمانی است. میزان بهبودی بیماران مبتلا به استئوسارکوما از طریق جراحی، 15 تا 20 درصد برآورد می‌شود، اما در صورت ترکیب جراحی با شیمی‌درمانی میزان بهبودی می‌تواند تا تقریباً 70 درصد افزایش یابد (2). متأسفانه، شیمی‌درمانی مکرر در 40 درصد از بیماران مبتلا به استئوسارکوما پیشرفته، اثرات جانبی بالایی در بیماران ایجاد می‌کند به طوری که تخمین زده می‌شود که تنها کم‌تر از 30 درصد بیماران مبتلا به استئوسارکوما عودکننده، در نهایت بهبود می‌یابند (3). سلول‌های سرطانی ممکن است در برابر یک یا چند عامل شیمی‌درمانی از خود مقاومت نشان دهند که به آن مقاومت چندگانه دارویی یا multidrug resistance (MDR) گفته می‌شود. مقاومت چندگانه دارویی در شیمی‌درمانی بیماران مبتلا به استئوسارکوما از عوامل اصلی است که در میزان موفقیت شیمی‌درمانی و همچنین میزان بهبودی بیماران مبتلا به استئوسارکوما تأثیر می‌گذارد (4). تاکنون مکانیسم‌های مختلفی برای MDR گزارش شده است، که از جمله آن‌ها می‌توان به افزایش سم‌زدایی داروها در بدن از طریق افزایش متابولیسم آن‌ها، کاهش جذب دارو، افزایش پمپ دارو به خارج از سلول، واکنش با نوکلئوفیل‌های افزایش‌یافته داخل سلول، افزایش ترمیم DNA سلول‌های سرطانی که از طریق اثر دارو دچار آسیب شده، اشاره کرد (5).

به منظور غلبه بر MDR، تحقیقات گسترده‌ای در طی سالیان گذشته بر روی سیستم‌های نوین دارورسانی مبتنی بر تکنولوژی نانو، متمرکز شده است. نانوحامل‌های دارویی مزیت‌های متعددی نسبت به تجویز داروی آزاد دارند، از جمله: محافظت از تخریب دارو، طولانی کردن زمان گردش دارو در بدن، افزایش حلالیت برخی داروهای آنگریز، دارورسانی هدفمند و رهایش کنترل شده داروها توسط اصلاح سطحی نانوذرات برای حفظ تعادل غلظت دارو در محل تومور و به حداکثر رساندن اثرات درمانی دارو، امکان تحویل همزمان چند دارو

DMEM high glucose از شرکت (Gibco, USA)، سرم جنین گاوی (FBS)، بافر فسفات سالین (PBS)، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Pen-Strep, 10,000 U/mL-10 mg/mL) و تریپسین EDTA از شرکت زیست‌ایده نو ترکیب (ایران) تهیه و استفاده شد. همچنین رده سلولی Saso-2 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران و رده سلولی فیروبلاست نرمال (HFF) از بانک سلول مرکز تحقیقات بیولوژی سلول‌های بنیادی (یزد، ایران) تهیه گردید.

ترسیم نمودار کالیبراسیون بربرین

غلظت‌های مختلف از بربرین در ایزوپروپانول و بافر فسفات سالین (PBS) به روش رقت‌سازی سریالی تهیه شد. سپس جذب نوری آن‌ها در طول موج 420 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (CECIL 7250, Bio Aquarius, UK) اندازه‌گیری شد (16). در نهایت نمودار کالیبراسیون و معادله خط بربرین با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 به دست آمد و تعیین شد.

سنتز نانوسامانه نیوزومی حاوی بربرین

آب پوشانی لایه نازک یکی از مرسوم‌ترین روش‌های ساخت نیوزوم به شمار می‌رود (17). در پژوهش حاضر نیز از این روش جهت ساخت نانوسامانه نیوزومی حاوی بربرین استفاده شد. به طور خلاصه، ابتدا کلسترول و سورفکتانت‌های غیر یونی مختلف (جدول شماره 1) با نسبت کلسترول (25 درصد) - سورفکتانت (75 درصد) در 10 میلی‌لیتر کلروفورم حل شد تا ترکیب کلسترول - سورفکتانت حاصل شود. سپس داروی بربرین با نسبت دارو (1) - لیپید (10) به محلول قبلی اضافه شد. پس از آن جهت همگن شدن، محلول حاوی کلسترول - سورفکتانت - دارو در روتاری (Heidolph, Germany) در دمای 40 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه قرار گرفت. سپس حلال (کلروفورم) از طریق ایجاد خلأ

محافظت از کبد و خواص ضد سرطانی (13). علی‌رغم خواص قابل توجه بربرین، محدودیت‌هایی در فارماکوکینتیک بربرین وجود دارد، به طوری که جذب آن توسط دیواره روده ضعیف بوده و فراهمی زیستی (Bioavailability) آن پس از مصرف خوراکی اندک است (14). همچنین مصرف خوراکی آن ممکن است باعث عوارض جانبی روده از جمله گرفتگی، ناراحتی معده و تغییر میکروبیوتای روده شود (15). با توجه به این ویژگی‌ها، داروسازی بربرین به محل بافت هدف به طور جدی چالش برانگیز است.

پژوهش حاضر با هدف ساخت و مشخصه‌یابی نانوحامل نیوزومی جهت داروسازی بربرین به رده سلولی Saso-2 به عنوان مدلی از استئوسارکوما انجام گرفت. جهت انجام این موضوع، فرمولاسیون‌های مختلف نیوزومی شامل سورفکتانت‌های غیر یونی مختلف و کلسترول جهت ساخت نانوسامانه نیوزومی مورد ارزیابی قرار گرفت و براساس کارایی بارگذاری و پروفایل رهایش دارو، فرمولاسیون بهینه انتخاب شد. پس از سایر مشخصه‌یابی‌های فیزیکی-شیمیایی آن مانند سایز، شارژ سطحی و مورفولوژی ظاهری میزان سمیت سلولی نانوسامانه نیوزومی بهینه در رده سلولی Saso-2 به عنوان رده سلول سرطانی استئوسارکوما استفاده ارزیابی شد. همچنین برای مقایسه اثر سمیت آن نسبت به بافت‌های سالم از رده سلولی فیروبلاستی نرمال (HFF) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، سورفکتانت‌های غیر یونی (Span80، Span60، Span40)، Tween60 و Tween80، DSPE-mPEG (2000)، کلسترول، نمک¹ MTT، بربرین کلرید و کیسه دیالیز (MWCO 12000 Da) از شرکت (Sigma Aldrich, USA)، کلروفورم، ایزوپروپانول، متانول از شرکت (Merck, Germany)، محیط کشت

1. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

اتاق انکوبه شد. سپس جذب نوری محلول در طول موج 420 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری و مقدار داروی آزاد شده از نانوسامانه با استفاده معادله خط نمودار استاندارد دارو در ایزوپروپانول تعیین شد. در نهایت بازده بارگذاری دارو در نانوسامانه نیوزومی با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید.

$$\text{میزان داروی درون گیری شده} = \frac{\text{میزان داروی اولیه استفاده شده}}{\text{بازده بارگذاری دارو (\%)}}$$

بررسی رهائش داروی برترین از فرمولاسیون های مختلف نانوسامانه های نیوزومی

دیالیز در PBS به مدت 72 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد و $\text{pH}=7/4$ مطابق با شرایط فیزیولوژیک بافت نرمال، جهت تعیین میزان رهائش دارو از فرمولاسیون های مختلف نانوسامانه های نیوزومی استفاده شد. بدین منظور، 10 میلی لیتر از نیوزوم های حاوی دارو، داخل کیسه دیالیز ریخته شد. 1 میلی لیتر از محلول دیالیز در زمان های مشخص، جمع آوری و بلافاصله با همان میزان از PBS تازه جایگزین شد. میزان جذب نوری نمونه ها در طول موج 420 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد و سپس با استفاده از منحنی استاندارد داروی برترین در PBS، میزان رهائش تجمعی دارو در مدت زمان های مختلف، تعیین گردید. لازم به ذکر است که پس از تعیین فرمولاسیون بهینه، رهائش دارو از نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله علاوه بر شرایط فوق، در شرایط شبیه سازی شده فیزیولوژیک بافت توموری ($\text{pH}=6/5$ و دمای 42 درجه سانتی گراد) نیز اندازه گیری و تعیین گردید.

تعیین فرمولاسیون بهینه و سنتز نانوسامانه نهایی نیوزومی حاوی برترین

انتخاب فرمولاسیون بهینه جهت سنتز نانوسامانه نیوزومی حاوی برترین براساس بیشترین میزان بارگذاری و پروفایل رهائش انتخاب شد. سپس به منظور بهبود

حذف و لایه نازک تشکیل شد. لایه نازک تشکیل شده به مدت 24 ساعت تحت گاز N_2 قرار گرفت تا حلال به طور کامل حذف گردد. سپس لایه نازک تشکیل شده با 10 میلی لیتر بافر فسفات (PBS , $\text{pH}=7.4$) در دمای 45 درجه سانتی گراد به مدت 60 دقیقه هیدراته شد تا سوسپانسیون نیوزومی حاوی برترین به دست آید. برای کاهش اندازه نیوزوم های چندلایه و تشکیل نیوزوم های کوچک تک لایه از اولتراسونیک پروبی (UP200Ht , Hielscher, Germany) با توان 60 وات، به مدت 30 دقیقه (15 ثانیه روشن و 10 ثانیه خاموش) استفاده شد. در نهایت به منظور جداسازی ذرات با اندازه بزرگ تر از 200 نانومتر و همگن شدن محلول به دست آمده، فیلتراسیون با استفاده از فیلتر سرسرنگی 0/2 میکرون صورت گرفت.

جدول شماره 1: درصد نسبت های فرمولاسیون های مختلف برای ساخت نانو سامانه های حاوی برترین استفاده شده در مطالعه حاضر

فرمولاسیون	نسبت	کنترل	Tween 80 (درصد)	Tween 60 (درصد)	Span 40 (درصد)	Span 60 (درصد)	Span 80 (درصد)
F1	10	25	75	0	0	0	0
F2	10	25	0	75	0	0	0
F3	10	25	0	0	75	0	0
F4	10	25	0	0	0	75	0
F5	10	25	0	0	0	0	75

حذف داروی بارگذاری نشده و تعیین درصد بارگذاری دارو در نانوسامانه های نیوزومی

حذف داروی آزاد و بارگذاری نشده از طریق دیالیز صورت گرفت. به طور خلاصه محلول نانوسامانه سنتز شده به درون کیسه دیالیز ریخته و کیسه دیالیز به مدت 6 ساعت درون محلول دیالیز (PBS , $\text{pH}=7/4$) در دمای 4 درجه سانتی گراد قرار داده شد و محلول دیالیز هر یک ساعت تعویض گردید تا داروی بارگذاری نشده و آزاد به طور کامل حذف شود. پس از حذف داروی آزاد، میزان بارگذاری دارو از طریق تخریب ساختار نیوزومی با استفاده از ایزوپروپانول انجام پذیرفت. بدین منظور سوسپانسیون نیوزومی با نسبت 1 به 10 با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای

ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی فرمولاسیون بهینه نیوزومی حاصل (کارایی بارگذاری، پایداری و رهایش پیوسته دارو)، به فرمولاسیون نیوزومی بهینه، میزان 5 درصد (DSPE-mPEG(2000) اضافه و نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی بربرین ساخته شد.

تعیین اندازه نانو ذرات، ضریب پراکندگی و پتانسیل زتا نانو نیوزوم ها

قطر هیدرودینامیک، شارژ سطحی و شاخص پراکندگی (PDI) نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله از طریق تکنیک پراش دینامیکی نور (DLS) و با استفاده از دستگاه زتاسایزر (Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical, UK) تعیین گردید. بدین منظور، نمونه رقیق شده با غلظت 0/1 mg/ml تهیه و بلافاصله پس از آماده‌سازی، نور پراکنده در دمای اتاق با زاویه 90 درجه تشخیص داده شد و مورد آنالیز قرار گرفت.

تصویربرداری از نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله

تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) جهت بررسی شکل و مورفولوژی ظاهری نانوسامانه نیوزومی مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور، 10 میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی بربرین و نانوسامانه بدون دارو بر روی لام شیشه‌ای ریخته شد. لام شیشه‌ای در دمای محیط قرار داده شد تا نمونه‌ها خشک شده و یک لایه نازک بر روی لام تشکیل گردد. سپس نمونه‌ها با یک لایه طلا به منظور ایجاد رسانایی، پوشش‌دار شد و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (FEG-SEM MIRA3 TESCAN, Czech Republic) تصویربرداری شد.

بررسی اثر سمیت سلولی نانوسامانه نیوزومی حاوی بربرین با استفاده از آزمون MTT

از آزمون MTT جهت ارزیابی و مقایسه میزان سمیت فرم آزاد داروی بربرین و نانوسامانه نیوزومی

پگیله حاوی بربرین بر روی رده سلولی Saos-2 و همچنین میزان سمیت نانوسامانه نیوزومی پگیله فاقد دارو در رده سلولی Saos-2 و رده سلولی فیروبلاست نرمال (HFF)، استفاده شد. سلول‌های مذکور در محیط کشت DMEM به همراه 10 درصد FBS و 1 درصد Pen-Strep (در انکوباتور با 37 درجه سانتی‌گراد، 5 درصد CO2 و 95 درصد رطوبت) کشت داده شدند. جهت انجام آزمون MTT، سلول‌ها با تراکم 10^4 سلول در هر چاهک پلیت 96 خانه کشت داده شد و به مدت 24 ساعت انکوبه گردید تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. سپس سلول‌ها با حجم یکسانی از محیط کشت تازه (گروه کنترل)، محیط کشت تازه به همراه غلظت‌های مختلف نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله بدون دارو (Blank-Nio)، نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی بربرین (NiO-Ber) و بربرین آزاد (Free-Ber) (گروه تیمار) و در تکرارهای چهارتایی به مدت 48 ساعت تیمار شدند. پس از آن، میزان 10 میکرولیتر از محلول MTT با غلظت 5mg/ml به چاهک‌ها اضافه شد و پس از 4 ساعت انکوباسیون، محیط چاهک‌ها کاملاً دور ریخته شد و 100 میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. در انتها، جذب نوری در طول موج 570nm با استفاده از میکروپلیت‌ریدر (ELx800, Biotek, USA) اندازه‌گیری و درصد زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از معادله ذیل محاسبه شد:

$$100 \times \frac{(\text{میانگین جذب نوری بلانک} - \text{میانگین جذب نوری نمونه})}{(\text{میانگین جذب نوری بلانک} - \text{میانگین جذب نوری کنترل})} = \text{درصد زنده‌مانی سلول‌ها}$$

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی آماری نتایج از نرم افزار Graphpad Prism ورژن 9/1، آزمون ANOVA دوطرفه و آزمون مقایسه میانگین Tukey استفاده شد و سطوح معناداری نتایج برحسب $P < 0/05$ محاسبه و گزارش شد. علاوه‌براین، رگرسیون غیرخطی جهت تعیین میزان IC50 مورد استفاده قرار گرفت.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد تایید شده است (کد اخلاق IR.SSU.MEDICINE.REC.1400.086).

یافته ها

انتخاب فرمولاسیون نیوزومی مناسب

میزان بارگذاری و پروفایل رهایش دارو، از اساسی ترین جنبه‌های کاربردی نانو حامل‌های دارورسانی محسوب می‌شود. در مطالعه حاضر نیز فرمولاسیون‌های مختلف به منظور به دست آوردن فرمولاسیون بهینه میزان بازده بارگذاری و رهایش دارو بررسی شدند (جدول شماره 2). براساس نتایج به دست آمده، فرمولاسیون F1 حاوی Tween 60 (75 درصد) - کلسترول (25 درصد) بیشترین میزان بارگذاری و رهایش در مدت 72 ساعت را از خود نشان داد. در این فرمولاسیون میزان بارگیری دارو 74/6 درصد و رهایش تجمعی دارو در مدت زمان 72 ساعت 75/6 درصد تعیین شد.

جدول شماره 2: بازده بارگیری دارو (EE%) و رهایش دارو (R%) در فرمولاسیون‌های مختلف نیوزومی حاوی داروی بربرین.

فرمولاسیون	بارگیری دارو (%)	درصد رهایش (8 ساعت)	درصد رهایش (24 ساعت)	درصد رهایش (48 ساعت)	درصد رهایش (72 ساعت)
F1	74.6	31.5	46.9	61.5	75.6
F2	38.4	11.6	26.1	43.8	56.8
F3	65.5	12	25.2	37.7	49.1
F4	68.3	13.2	27.6	42.7	56.1
F5	43.9	15.6	30.9	45.8	60

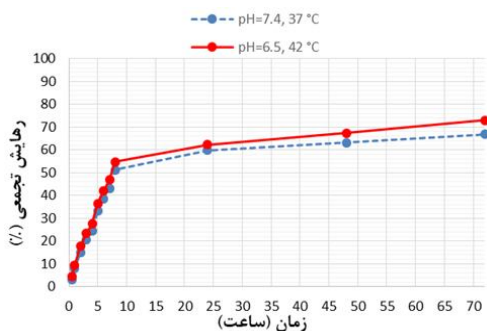
با توجه به اثرگذاری پلی اتیلن گلیکول (PEG)

برافزایش نیمه عمر و پایداری نانو حامل‌های دارویی، در پژوهش حاضر نیز به منظور بهبود ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی نانوسامانه نیوزومی (اندازه ذرات، کارایی بارگیری، رهایش دارو و بهبود ورود به سلول) به فرمولاسیون بهینه (F1) میزان 5 درصد PEG به فرم DSPE-mPEG(2000) اضافه گردید و فرمولاسیون بهینه نیوزومی پگیله شده (F6) حاصل شد. در ادامه، نتایج

نشان داد که فرمولاسیون بهینه نیوزومی پگیله دارای کارایی بارگذاری دارو به میزان 79/34 درصد است.

پروفایل رهایش داروی بربرین از نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله در محیط برون تن (*in vivo*)

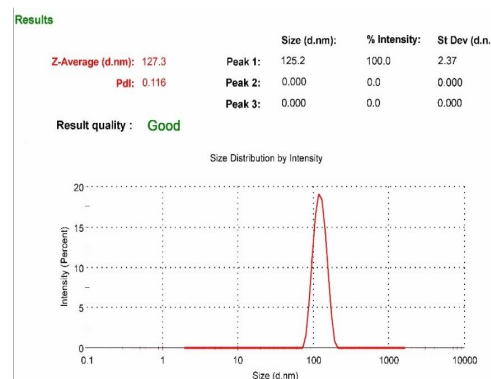
به منظور بررسی پروفایل رهایش داروی بربرین از نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله در هر دو بافت سالم و توموری، شرایط فیزیولوژیک این بافت‌ها شبیه‌سازی شد. بر همین اساس pH=7/4 و دمای 37 درجه سانتی‌گراد برای بافت سالم و pH=6/5 و دمای 42 درجه سانتی‌گراد برای بافت توموری در نظر گرفته شد و الگوی رهایش در هر دو محیط مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که میزان رهایش دارو از نانوسامانه ابتدا به صورت سریع اتفاق می‌افتد به طوری که در 8 ساعت اول، در شرایط شبیه‌سازی شده توموری، بیش از نیمی از داروی بارگذاری شده (54/7 درصد) از نانوسامانه آزاد شد. پس از آن رهایش دارو به صورت کند و پیوسته تا 72 ساعت ادامه پیدا کرد و بیشترین میزان رهایش دارو در مدت زمان 72 ساعت و میزان 72/98 درصد اندازه‌گیری شد. علاوه بر این، پروفایل رهایش دارو از نانوسامانه در شرایط شبیه‌سازی شده نرمال، اندکی کم‌تر از شرایط توموری بود (51/20 درصد در 8 ساعت و 66/79 درصد در 72 ساعت) که حاکی از قابلیت این نانوسامانه جهت استفاده در هر دو شرایط مذکور است (نمودار شماره 1).



نمودار شماره 1: رهایش بربرین از نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله (فرمولاسیون F6)

اندازه شاخص پراکندگی ذرات و پتانسیل زتا

بر اساس نتایج، نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی داروی بربرین میانگین سایز 127/3 نانومتر و شارژ سطحی 9/31- میلی ولت داشت و میزان شاخص پراکندگی آن (PDI) 0/116 بود. این نتایج در نمودار شماره 2 (به ترتیب سایز، PDI و شارژ سطحی) قابل مشاهده است.



نمودار شماره 1: نتایج دستگاه زتاسایزر: سایز، شاخص پراکندگی (PDI) و شارژ سطحی نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی بربرین.

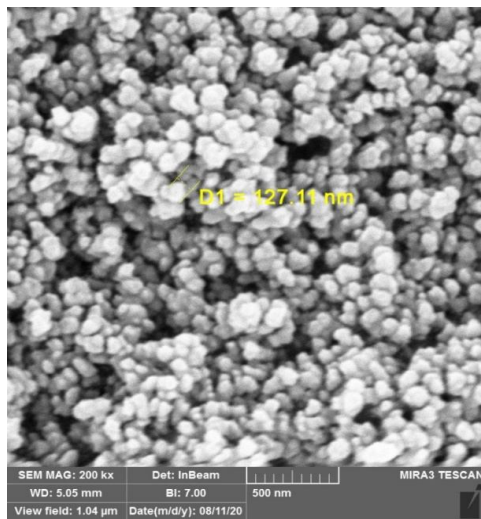
بررسی شکل ظاهری نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی بربرین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

با توجه به تصویر نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی داروی بربرین حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی (تصویر شماره 1)، فرم نانوسامانه‌ها وزیکولی و کروی بوده و سطح وزیکول‌ها صاف و هموار هستند. علاوه بر این، این تصویر نشان می‌دهد نانوسامانه‌های تولید شده از نظر اندازه و شکل، توزیع همگنی دارند.

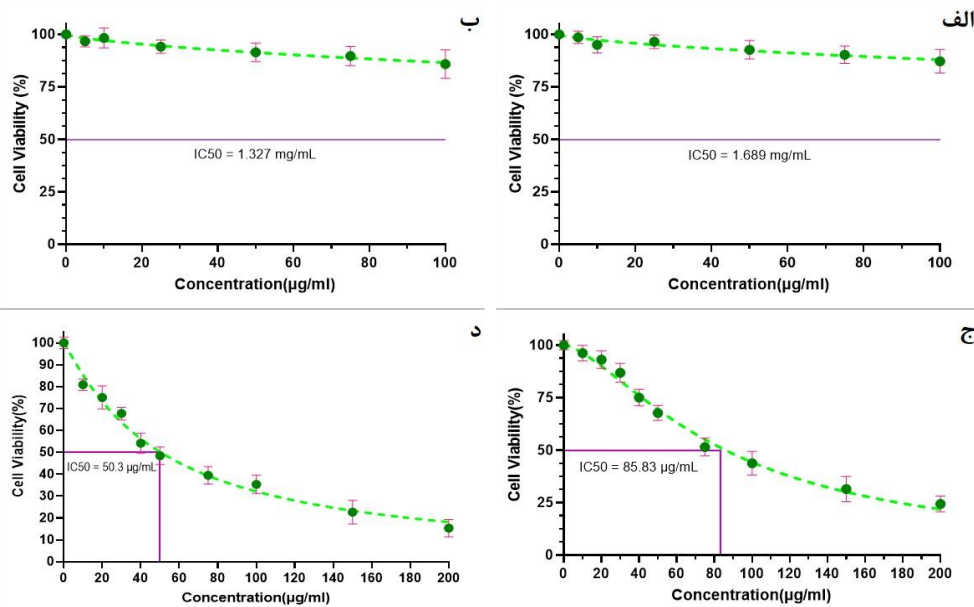
آزمایش سمیت سلولی به روش MTT

نتایج حاصل از بررسی سمیت سلولی با استفاده از آزمون MTT نشان داد که نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله فاقد دارو، چه در رده سلولی فیروپلاست نرمال (HFF) و

چه در رده سلولی Saos-2، اثر سمیت قابل توجهی نداشت، به طوری که IC50 نانوسامانه نیوزومی فاقد دارو در رده سلولی Saos-2 و HFF به ترتیب 1/689 و 1/327 میلی گرم در میلی لیتر تعیین شد و حداکثر غلظتی که از این نانوسامانه در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت، مقدار 100 میکروگرم در میلی لیتر بوده که بیش از 10 برابر کم تر از میزان IC50 آن بوده است (نمودار شماره 3- الف و 3- ب). علاوه بر این، نتایج نشان داد هم فرم آزاد داروی بربرین و هم نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی بربرین در رده سلولی Saos-2 اثر سمیت دارند، با این تفاوت که نانوسامانه نیوزومی حاوی بربرین در حدود 1/7 برابر اثر سمیت بیش تری نسبت به فرم آزاد بربرین داشت (IC50=85.83 µg/ml برای فرم آزاد بربرین در برابر IC50=50.3 µg/ml برای فرم نیوزومی) (نمودار شماره 3- ج و 3- د). مقایسه آماری غلظت‌های مختلف فرم آزاد بربرین و نانوسامانه نیوزومی حاوی آن نشان داد در تمامی غلظت‌های مورد استفاده، نانوسامانه‌های نیوزومی حاوی بربرین به‌طور معنی‌داری اثر سمیت بیش تری نسبت به فرم آزاد دارو داشتند ($P > 0/05$) (نمودار شماره 4).

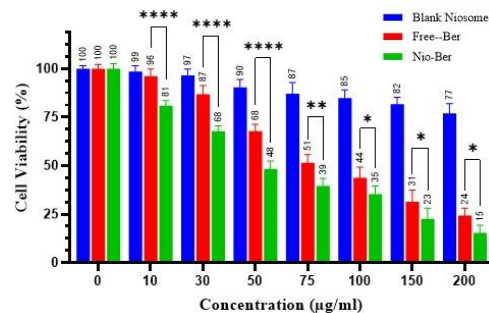


تصویر شماره 1: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی بربرین



نمودار شماره 4: نتایج حاصل از آزمون MTT. الف: اثر سمیت و میزان IC50 نانوسامانه نیوزومی فاقد دارو بر رده سلولی Saos-2، ب: اثر سمیت و میزان IC50 نانوسامانه نیوزومی فاقد دارو در رده سلولی HFF، ج: اثر سمیت و میزان IC50 بربرین آزاد بر رده سلولی Saos-2، د: اثر سمیت و میزان IC50 نانوسامانه نیوزومی حاوی بربرین بر رده سلولی Saos-2.

هموار کرده است (18). از طرف دیگر متابولیت‌های ثانویه گیاهی، با تنوع شیمیایی قابل توجهی که دارند، بیش از نیم قرن است که به‌طور گسترده از نظر خواص ضد سرطانی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (19). بربرین به عنوان یک آلکالوئید یکی از این مواد است که امروزه خواص ضدسرطانی آن به‌خوبی به اثبات رسیده است (20). بر همین اساس در پژوهش حاضر، از نانوسامانه‌های نیوزومی جهت دارورسانی بربرین به رده سلولی Saos-2 به عنوان مدلی از استئوسارکوما استفاده شد. تاکنون مطالعات گسترده‌ای در زمینه دارورسانی به سلول‌های سرطانی با استفاده از نانوسامانه‌های نیوزومی به دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فردی که دارند، صورت گرفته است اما برای اولین بار در این پژوهش به مقایسه انواع سورفکتانت‌ها در میزان لود و رهایش بربرین پرداخته و فرمولاسیون بهینه از میان انواع فرمولاسیون‌ها انتخاب گردید (16-19). در سال 2000 Awate و همکارانش به بررسی و ارزیابی فرمولاسیون نیوزومی بربرین پرداختند. در این



نمودار شماره 5: نمودار مقایسه اثر سمیت فرم آزاد داروی بربرین، فرم نیوزومی آن و نانوسامانه نیوزومی پگیله فاقد دارو در رده سلولی Saos-2. نتایج حاصل از آزمون ANOVA دو طرفه و مقایسه میانگین Tukey نشان داد که در تمامی غلظت‌ها، اثر سمیت در فرم نیوزومی داروی بربرین به‌طور معنی‌داری بیش از فرم آزاد آن بوده است. (*: $P < 0/05$, **: $P < 0/01$, ***: $P < 0/0001$).

بحث

در میان روش‌های درمانی جدید، درمان‌های ضدسرطان مبتنی بر فناوری نانو، راه را برای استراتژی‌های هدفمند جدید در درمان سرطان و به‌ویژه استئوسارکوما

تحقیق با روش فیلم نازک فرمولاسیون‌هایی با نسبت‌های مختلف از Span60 و کلسترول را ساخته و میزان لود و رهایش آن‌ها را بررسی کرده‌اند. فرمولاسیون نسبت Span60 (75 درصد) و کلسترول (25 درصد) دارای بیش‌ترین میزان لود و رهایش بوده که به عنوان فرمول بهینه انتخاب شد (21).

در مطالعه‌ای که توسط Manosroi و همکارانش انجام شد اثر وجود کلسترول در فرمولاسیون نیوزومی حاوی Tween 60 بررسی کردند. نتایج نشان داد که کارایی بارگذاری دارو تحت تاثیر طول زنجیره الکیل سورفکتانت غیر یونی و مقدار کلسترول به کار برده شده در تهیه وزیکول‌ها است. Tween 60 بدون حضور کلسترول امکان تشکیل نیوزوم را ندارد و با اضافه کردن کلسترول، نیوزوم با حداکثر بارگذاری دارو تشکیل می‌شود. به علاوه مشخص شد که سورفکتانت غیر یونی با زنجیره آلکیل 18 کربنه مانند Tween 60 کارایی بارگذاری بالاتری نسبت به سورفکتانت غیر یونی با زنجیره آلکیل 12 کربنه مانند Tween20 دارد. سورفکتانت غیر یونی Tween 60 با کلسترول با نسبت مولی (30:70) بیش‌ترین میزان کارایی بارگذاری دارو را داشتند (22). بدین منظور، فرمولاسیون‌های مختلفی جهت ساخت نانوسامانه‌های نیوزومی با نسبت کلسترول (25 درصد) - سورفکتانت (75 درصد) مورد ارزیابی قرار گرفت. در همین راستا سورفکتانت‌های Tween 60 (فرمول 1)، Tween 80 (فرمول 2)، Span 40 (فرمول 3)، Span 60 (فرمول 4)، Span 80 (فرمول 5) مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد میزان بارگذاری دارو در نانوسامانه‌های ساخته شده با فرمولاسیون 4 (Span 60، C18) از میزان بارگذاری دارو در فرمولاسیون 3 (Span 40، C16) بیش‌تر بوده است. این نتیجه همراستا با سایر مطالعات است که نشان داده‌اند در سورفکتانت‌های غیر یونی، با افزایش زنجیره آلکیلی، میزان بارگذاری دارو نیز افزایش می‌یابد (23). به‌طور کلی چندعامل در خصوصیات فیزیکی شیمیایی نیوزوم‌ها تأثیر دارند که مهم‌ترین آن‌ها

عبارتند از اندازه سر هیدروفیل سورفکتانت‌ها، طول و نوع زنجیره جانبی سورفکتانت‌ها و تعادل لیوفیلی-هیدروفیلی (HLB^2) (10). معمولاً افزایش طول زنجیره جانبی با افزایش میزان بارگذاری دارو در ارتباط است. به‌طور مثال، سورفکتانت‌های غیر یونی با زنجیره‌های استریل (C18) نسبت به سورفکتانت‌های غیر یونی که دارای زنجیره‌های استریل (C12) هستند، بازده بارگذاری داروی بیش‌تری نشان می‌دهند (24). با این وجود نتایج مطالعه حاضر نشان داد نانوسامانه نیوزومی حاصل از Span 80 (فرمول 5) با وجود دارا بودن زنجیره جانبی طویل‌تر، میزان بارگذاری کم‌تری نسبت به Span 60 و Span 40، نشان داد ($Span80 > Span40 > Span60$). این امر می‌تواند به این دلیل باشد که Span 80 گروه اشباع نشده در ساختار خود دارد (25). از طرف دیگر، نانوسامانه ساخته شده با Tween 60، با وجود طول زنجیره جانبی یکسان (C18)، میزان بارگذاری بیش‌تری نسبت به Tween 80 داشت ($Tween60 > Tween80$)، به‌نظر می‌رسد علت این موضوع وجود گروه غیر اشباع در ساختار زنجیره جانبی Tween 80 باشد که موجب خمیدگی در آن و کاهش پایداری نیوزوم ساخته شده می‌شود (11). به‌طور کلی میزان بارگذاری دارو در فرمولاسیون‌های مختلف نشان داد بیش‌ترین میزان بارگذاری در بین تمام فرمولاسیون مربوط به نانوسامانه‌های حاصل از Tween 60 (فرمول 1) و کم‌ترین میزان آن مربوط به نانوسامانه‌های حاصل از Tween 80 (فرمول 2) بود ($Tween60 > Span60 > Span40 > Span80 > Tween80$) بنابراین نتایج، فرمولاسیون F1 ($Tween60:Chol$) به عنوان فرمولاسیون بهینه انتخاب شد و جهت پگیله کردن آن، 5 درصد فسفولیپید پگیله DSPE-mPEG(2000) اضافه شد. اضافه کردن PEG به نانوسامانه‌ها به‌طور کلی، موجب مخفی شدن نانوسامانه از سیستم ایمنی میزبان شده و پاکسازی کلیوی آن‌ها را کاهش می‌دهد،

1. Hydrophilic-Lipophilic Balance

بود. علاوه بر آن چه ذکر شد، نتایج بررسی سمیت سلولی با استفاده از آزمون MTT نشان داد که نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی بربرین به طور قابل توجهی در افزایش سمیت داروی بربرین در عین کاهش غلظت داروی مورد استفاده، مؤثر عمل کرده است به طوری که IC50 نانوسامانه حاوی دارو در حدود 1/7 برابر بیش تر از مقدار IC50 دارو بود، در حالی که نانوسامانه فاقد دارو سمیت قابل توجهی چه در رده سلولی سرطانی Saos-2 و چه در رده سلولی نرمال HFF نداشت. به عبارت دیگر، با استناد به نتایج حاصل از آزمون های سمیت سلولی به نظر می رسد نانوسامانه ساخته شده در این پژوهش توانسته دوز مؤثر دارو را کم کند و در عین حال، خواص دارویی و درمانی آن را بهبود ببخشد.

سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات زیست فناوری پردیس بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد و از اساتید و مسئولین محترم این مرکز در خصوص تسهیل بهره مندی از فضای آزمایشگاهی و دستگاهی تشکر می گردد.

بنابراین نیمه عمر بیش تری را در شرایط درون تن (in vivo) به همراه خواهد داشت (26). علاوه بر این پگیله شدن همچنین موجب کاهش شاخص پراکندگی نیوزوم می شود و احتمال رسوب و تجمع نانوسامانه به صورت توده را کاهش می دهد (27).

اندازه ذرات و شارژ سطحی آن ها، دو مشخصه مهم در سیستم های وزیکولی هستند و اثر این دو پارامتر در افزایش پایداری، تراوش پذیری از رگ ها و جذب سلولی به خوبی شناخته شده است (28).

در مطالعه حاضر، نانوسامانه بهینه نیوزومی پگیله حاوی داروی بربرین میانگین سایز 127/3 نانومتر و شارژ سطحی 9/31- میلی ولت داشت و میزان شاخص پراکندگی آن (PDI) 0/116 بود، که همراستا با مطالعات پیشین است و همچنین اندازه مطلوبی محسوب می شود (17، 29، 30). به طور خلاصه در مطالعه حاضر فرمولاسیون بهینه نیوزومی پگیله (فرمول 6) حاوی Tween 60 (71/25 درصد) - کاسترول (23/75 درصد) - فسفولیپید پگیله DSPE-mPEG(2000) (5 درصد) دارای ویژگی های مطلوبی از جمله سایز کوچک، رهایش کنترل شده دارو و بازده درون گیری بالا

References

- Lin PP, Patel S. Osteosarcoma. In: Bone Sarcoma. New York: Springer; 2013. p. 75-97.
- Schwartz CL, Gorlick R, Teot L, Krailo M, Chen Z, Goorin A, et al. Multiple drug resistance in osteogenic sarcoma: INT0133 from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2007; 25(15): 2057-2062.
- Chou AJ, Gorlick R. Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006; 6(7): 1075-1085.
- Wang J, Seebacher N, Shi H, Kan Q, Duan Z. Novel strategies to prevent the development of multidrug resistance (MDR) in cancer. *Oncotarget* 2017; 8(48): 84559.
- Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Recent advances on the molecular mechanisms involved in the drug resistance of cancer cells and novel targeting therapies. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 83(5): 673-691.
- Chindamo G, Sapino S, Peira E, Chirio D, Gonzalez MC, Gallarate M. Bone diseases: current approach and future perspectives in drug delivery systems for bone targeted therapeutics. *Nanomaterials* 2020; 10(5): 875.
- Cheng H, Chawla A, Yang Y, Li Y, Zhang J, Jang HL, et al. Development of nanomaterials for bone-targeted drug delivery. *Drug Discov*

- Today 2017; 22(9): 1336-1350.
8. Wolfram J, Zhu M, Yang Y, Shen J, Gentile E, Paolino D, et al. Safety of nanoparticles in medicine. *Curr Drug Targets* 2015; 16(14): 1671-1681.
 9. Gharbavi M, Amani J, Kheiri-Manjili H, Danafar H, Sharafi A. Niosome: a promising nanocarrier for natural drug delivery through blood-brain barrier. *Adv Pharmacol Sci* 2018; 2018: 6847971.
 10. Ag Seleci D, Seleci M, Walter JG, Stahl F, Scheper T. Niosomes as nanoparticulate drug carriers: Fundamentals and recent applications. *J Nanomater* 2016; 2016: 7372306.
 11. Bartelds R, Nematollahi MH, Pols T, Stuart MCA, Pardakhty A, Asadikaram G, et al. Niosomes, an alternative for liposomal delivery. *PLoS One* 2018; 13(4): e0194179.
 12. Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. Berberis vulgaris and berberine: an update review. *Phyther Res* 2016; 30(11): 1745-1764.
 13. Gaba S, Saini A, Singh G, Monga V. An insight into the medicinal attributes of berberine derivatives: A review. *Bioorg Med Chem* 2021; 38: 116143.
 14. Ye M, Fu S, Pi R, He F. Neuropharmacological and pharmacokinetic properties of berberine: a review of recent research. *J Pharm Pharmacol* 2010; 61(7): 831-837.
 15. Alolga RN, Fan Y, Chen Z, Liu L-W, Zhao Y-J, Li J, et al. Significant pharmacokinetic differences of berberine are attributable to variations in gut microbiota between Africans and Chinese. *Sci Rep* 2016; 6: 27671.
 16. Koide T, Iwata M, Maekawa K, Saito H, Tanimoto T, Okada S. Berberine Hydrochloride Reference Standard (Control 001) of National Institute of Health Sciences. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyujo Hokoku* 2001; (119): 97-100.
 17. Alemi A, Reza JZ, Haghirsadat F, Jaliani HZ, Karamallah MH, Hosseini SA, et al. Paclitaxel and curcumin coadministration in novel cationic PEGylated niosomal formulations exhibit enhanced synergistic antitumor efficacy. *J Nanobiotechnology* 2018; 16(1): 28.
 18. Wang S-Y, Hu H-Z, Qing X-C, Zhang Z-C, Shao Z-W. Recent advances of drug delivery nanocarriers in osteosarcoma treatment. *J Cancer* 2020; 11(1): 69-82.
 19. Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules* 2016; 21(5): 559.
 20. Och A, Podgórski R, Nowak R. Biological Activity of Berberine—A Summary Update. *Toxins (Basel)* 2020; 12(11): 713.
 21. Awate PS, Pimple TP, Pananchery JF, Jain AS. Formulation and evaluation of berberine hcl as niosomal drug delivery system. *Asian J Pharm Res* 2020; 10(3): 149-159.
 22. Manosroi A, Wongtrakul P, Manosroi J, Sakai H, Sugawara F, Yuasa M, et al. Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2003; 30(1-2): 129-138.
 23. Yoshioka T, Sternberg B, Florence AT. Preparation and properties of vesicles (niosomes) of sorbitan monoesters (Span 20, 40, 60 and 80) and a sorbitan triester (Span 85). *Int J Pharm* 1994; 105(1): 1-6.
 24. Kazi KM, Mandal AS, Biswas N, Guha A, Chatterjee S, Behera M, et al. Niosome: a future of targeted drug delivery systems. *J Adv Pharm Technol Res* 2010; 1(4): 374-380.
 25. Roque L, Fernández M, Benito JM, Escudero I. Stability and characterization studies of Span 80 niosomes modified with CTAB in the presence of NaCl. *Colloids Surfaces A*

- Physicochem Eng Asp 2020; 601: 124999.
26. Garbuzenko O, Barenholz Y, Prieve A. Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer. *Chem Phys Lipids* 2005; 135(2): 117-129.
27. Mohamed M, Abu Lila AS, Shimizu T, Alaaeldin E, Hussein A, Sarhan HA, et al. PEGylated liposomes: immunological responses. *Sci Technol Adv Mater* 2019; 20(1): 710-724.
28. Li-bin Y, Rong H. The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors. [J]. (Section Pharmacy). 2007; 3.
29. Haghirsadat F, Amoabediny G, Naderinezhad S, Forouzanfar T, Helder MN, Zandieh-Doulabi B. Preparation of PEGylated cationic nanoliposome-siRNA complexes for cancer therapy. *Artif cells, nanomedicine, Biotechnol* 2018; 46(sup1): 684-692.
30. Hemati M, Haghirsadat F, Jafary F, Moosavizadeh S, Moradi A. Targeting cell cycle protein in gastric cancer with CDC20siRNA and anticancer drugs (doxorubicin and quercetin) co-loaded cationic PEGylated nanoniosomes. *Int J Nanomedicine* 2019; 14: 6575-6585.