

Research Article

Synthesis and Characterization of Liposomal Nanocarriers Containing Pomegranate Flower Extract to Investigate Its Toxicity on the MCF-7 Breast Cancer Cell Line

Ayda Shafigh¹, Lida Eftekhari-Vash^{1*}, Ali Akbar Seifi Ashkezar²

1- Department of Microbiology, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran

2- Medical Student, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding author: lidaeftekhariavash@yahoo.com

Received: 2 September 2024

Accepted: 23 December 2024

DOI:

Abstract

Although pomegranate flower extract has anticancer properties, it requires carriers to improve its efficacy by delivering it to the target cells. Therefore, this study focuses on the development of pomegranate flower extract-loaded nanoliposomes and investigates their effects on MCF-7 breast cancer cells. In this study, after extracting the pomegranate flower extract and determining properties such as the maximum wavelength and standard curves, the extract-loaded nanoliposomes were synthesized using the thin-film method. The physicochemical characteristics of the nanoliposomes, including encapsulation efficiency, drug release, size, and zeta potential, were evaluated using spectrophotometry and DLS, while their morphology was studied using Fe-SEM and AFM microscopy. Finally, the antitumor activity of the nanoliposomes containing the extract and the free extract was assessed on MCF-7 cancer cells using the MTT assay. The results showed that the encapsulation efficiency of the synthesized nanostructure was $73.2 \pm 2.6\%$, and the maximum release of the extract under normal and cancerous cell conditions was $51.3 \pm 1.4\%$ and $67.2 \pm 2.6\%$, respectively. The nanoparticle size was 155.7 ± 4.1 nm, their polydispersity index was 0.345, and the zeta potential was -17.1 ± 3.4 mV. Microscopic images indicated that the nanoparticles had a spherical and uniform shape with no aggregation or precipitation. The nanoliposomes containing the extract showed higher toxicity on MCF-7 cells compared to the free extract, exhibiting a lower IC₅₀, while the blank system showed minimal toxicity to healthy fibroblast cells. The nanostructure developed in this study not only demonstrated favorable physicochemical properties but also effectively loaded the pomegranate flower extract and significantly enhanced its antiproliferative effects, making it a promising candidate for breast cancer research.

Keywords: Breast cancer, Pomegranate flower extract, Liposome, MCF-7, MTT.



مقاله پژوهشی

سنتز و مشخصه‌یابی نانوحامل‌های لیپوزومی حاوی عصاره گل انار به منظور بررسی سمیت آن بر روی رده‌ی سلولی MCF-7 سرطان پستان

آیدا شفیق^۱، لیدا افتخاری‌وش^{۱*}، علی اکبر سیفی اشکذری^۲

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران

۲- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: lidaeftekharivash@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۲

DOI:

چکیده

اگرچه عصاره گل انار دارای خواص ضدسرطانی است، اما برای کارایی بهتر نیازمند حامل‌هایی است که آن را به سلول هدف برسانند. بنابراین این مطالعه به ساخت نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گل انار و بررسی اثرات آن بر سلول‌های MCF-7 سرطان پستان می‌پردازد. در این بررسی، پس از استخراج عصاره گل انار و تعیین خصوصیات مانند طول موج ماکسیمم و منحنی‌های استاندارد، نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره با روش فیلم نازک سنتز گردید. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانولیپوزوم‌ها، از جمله میزان انکسولاسیون، میزان رهائش دارو، اندازه و پتانسیل زتا، با اسپکتروفتومتری و DLS بررسی شد و مورفولوژی آن‌ها با میکروسکوپ‌های AFM و Fe-SEM مورد مطالعه قرار گرفت. در نهایت، ویژگی ضدتوموری نانولیپوزوم‌ها حاوی عصاره و عصاره آزاد بر روی سلول‌های سرطانی MCF-7 با روش MTT ارزیابی شد. نتایج نشان می‌دهد که، راندمان انکسولاسیون نانوسامانه سنتز شده $2/6 \pm 73/2$ درصد و حداکثر میزان رهاسازی عصاره در شرایط سلولی نرمال و سرطانی به ترتیب $1/4 \pm 51/3$ و $2/6 \pm 67/2$ درصد است. اندازه نانوذرات $4/7 \pm 155/1$ نانومتر، شاخص پراکندگی آنها $0/345$ و بار الکتریکی نانوذرات $3/4 \pm 17/1$ میلی‌ولت می‌باشد. تصاویر میکروسکوپی نشان داده که نانوذرات دارای شکل کروی و یکنواخت بوده و تجمع یا رسوبی ندارند. نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره نسبت به عصاره آزاد از سمیت بالاتری بر سلول‌های MCF-7 برخوردار بوده و IC_{50} پایین‌تری را نشان دادند در حالیکه سامانه بدون عصاره، سمیت ناچیزی را برای سلول‌های سالم فیروبلاستی ایجاد نموده است. نانوسامانه سنتز شده در این مطالعه علاوه بر داشتن خواص فیزیکوشیمیایی مناسب، توانست به طور موثری عصاره گل انار را بارگیری و به طور چشمگیری خواص ضد تکثیری آن را افزایش دهد، بنابراین می‌تواند در تحقیقات مرتبط با سرطان پستان مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، عصاره گل انار، لیپوزوم، MCF-7، MTT.

مقدمه

در زنان محسوب می‌شود. سرطان پستان از لحاظ خصوصیات پاتولوژیک بسیار ناهمگن است (۴۱). در برخی موارد رشد آهسته با پیش آگاهی بالا و در برخی موارد دیگر تومورهای تهاجمی دارد (۴۸). پیش‌بینی‌ها

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین انواع سرطان‌ها در سراسر جهان است که با نرخ پنج برابری نسبت به سرطان‌های درگیر در حال رشد است. به عبارت دیگر سرطان پستان دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان بعد از سرطان ریه

نشان می‌دهد که نه تنها شیوع سرطان پستان در سراسر جهان بلکه مرگ‌ومیر ناشی از آن نیز در حال افزایش است، به طوری که بر اساس آمار جهانی تا سال ۲۰۵۰ نرخ ابتلا به سرطان پستان به ۳/۲ میلیون مورد جدید در سال می‌رسد که نیاز مبرم به اقدامات پیشگیرانه و درمانی را در حوزه‌ی سلامت جامعه لازم شمرده است (۹). در سال ۲۰۱۵، تقریباً ۶۰۰ هزار مورد فوتی ناشی از آن گزارش شده است. هر سال، بیش از ۱٫۵ میلیون زن، معادل ۲۵ درصد از کل زنان مبتلا به انواع سرطان‌ها، به سرطان پستان دچار می‌شوند (۱۰). در ایالات متحده در سال ۲۰۲۵، تخمین زده می‌شود که ۳۱۶۹۵۰ مورد جدید سرطان پستان مهاجم در زنان و ۲۸۰۰ مورد در مردان تشخیص داده شود (۵). فاکتورهای متعددی از جمله جنسیت، افزایش سن، هورمون‌های استروژن، سابقه خانوادگی، جهش‌های ژنتیکی و سبک زندگی ناسالم وجود دارند که می‌توانند احتمال ابتلا به سرطان پستان را افزایش دهند (۱۸، ۲۷). گزینه‌های فعلی درمانی سرطان شامل جراحی، شیمی درمانی و پرتودرمانی و یا ترکیبی از این گزینه‌ها است (۴) در شیمی درمانی از داروهایی استفاده می‌شود که با تداخل در سنتز DNA و اختلال در تقسیم میتوز، از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌شود. این فرایند می‌تواند علاوه بر سلول‌های سرطانی، به سلول‌های سالم بدن نیز آسیب برساند و عوارض جانبی ناخواسته و نامطلوبی از جمله کاهش اشتها، تهوع، ریزش مو، بیماری‌های قلبی و غیره، ایجاد نماید (۳۲، ۴۷). علاوه بر این، از آنجا که دسترسی زیستی این داروها به بافت‌های تومور نسبتاً ضعیف است، دوزهای بیشتری لازم است که منجر به سمیت زیاد در سلول‌های طبیعی و افزایش بروز مقاومت چندانکه به داروها می‌شود (۲۹). بنابراین، مطلوب است که از روشی استفاده کنیم که بتواند سلول‌های سرطانی را بطور فعال هدف قرار دهد و از این طریق عوارض جانبی را درحین درمان، کاهش دهد. ظهور فناوری نانو در دو دهه گذشته تأثیر عمیقی بر روی درمان‌های بالینی داشته است. در مقایسه با عوامل شیمی درمانی معمولی، ناقلین مواد دارویی نانومقیاس با بهبود اثربخشی درمان، ضمن جلوگیری از سمیت در سلول‌های طبیعی به دلیل ویژگی‌هایی مانند

تجمع انتخابی بالا در تومورها از طریق افزایش نفوذپذیری و احتباس پتانسیل مقابله با برخی از این چالش‌ها را نشان داده‌اند (۱۶، ۴۲). لیپوزوم نوعی نانو حامل لیپیدی است که در سال‌های اخیر توجه بسیاری از پژوهشگران حوزه رسانش هدفمند دارو را به خود جلب نموده است که با توجه به شباهت آن به سیستم‌های بیولوژیکی، از زیست سازگاری بالایی برخوردار است. این مهم نشان دهنده یک پتانسیل امیدوار کننده به عنوان عاملی برای تحویل دارو است. طیف وسیعی از مواد نشان داده شده است که می‌توانند به‌طور مؤثر در لیپوزوم‌ها برای دستیابی به درمانی بهتر کپسوله شوند (۳۴، ۶). گیاهان دارویی و مشتقات آنها مانند عصاره و اسانس آنها از جمله ترکیباتی هستند که می‌توانند درون نانوذرات دارو رسان بارگذاری گردند و تحقیقات زیادی نشان داده است که استفاده از آنها می‌تواند در درمان بیماری‌هایی چون دیابت، بیماری‌های عصبی، بیماری‌های قلبی عروقی و سرطان مفید باشد (۳، ۱۳) این مواد به دلیل ماهیت طبیعی‌شان، زیست‌سازگاری بالایشان با بدن انسان، عوارض جانبی ناچیز و قیمت مناسبشان می‌توانند به عنوان داروهای جایگزین یا مکمل برای داروهای شیمیایی معرفی گردند. انار (*Punica granata*) از قدیمی‌ترین میوه‌های خوراکی است که بخش‌های مختلف آن شامل، پوست، دانه، گل و آب دارای ترکیبات فلاونوئیدی، آلکالوئیدی، اسیدهای آلی و غیره با خواص آنتی‌اکسیدانت، ضد میکروبی، ضد التهابی و ضد سرطانی است (۱۳، ۳۸). عصاره میوه‌ی انار توانایی مهار سیکلین کینازها را دارد که منجر به مهار رشد سلول سرطان و به دنبال آن آپوپتوز سلول‌های سرطانی انسانی می‌شود که با تغییر سطح Bax و Bcl-2 با آپوپتوز سلول سرطانی همراه است (۸) در همین راستا، هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه‌ی خواص ضد سرطانی عصاره هیدروالکلی گل انار لیپوزومال بر روی رده ی سلولی MCF-7 سرطان پستان است.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد: فسفاتیدیل کولین ۸۰ (SPC80)، کلسترول و قرص Phosphate Buffered Saline (PBS) متعلق به

شرکت Sigma آمریکا، ایزوپروپیل، کلروفرم و اتانول متعلق به شرکت Merck آلمان 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.

جمع‌آوری و عصاره‌گیری گل انار: در ابتدا گل انار جمع‌آوری و نوع و گونه‌ی آن به تایید متخصصان گیاه‌شناسی دانشگاه یزد رسید. این گل‌ها سپس در سایه خشک گردیدند و بعد از پودر شدن به وسیله‌ی آسیاب برقی، سایر مراحل به وسیله‌ی پودرهای حاصله انجام شد. برای عصاره‌گیری از دستگاه سوکسله استفاده گردید که خود متشکل از چهار بخش اصلی بالن، هیتز، کندانسور و لوله‌ی خروجی است. برای شروع عصاره‌گیری، ۵۰ گرم از پودر حاصله درون کاغذ کارتوش فشرده و در داخل ستون کندانسور قرار گرفت و با اضافه کردن ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ به بالن سوکسله و اتصال آن به دستگاه فرایند عصاره‌گیری ادامه پیدا کرد. بعد از آن با اتصال منبع ورودی آب و خروجی کندانسور این فرآیند کامل گردید. عصاره‌گیری در شش سیکل انجام گرفت و در آخر عصاره حاصله به وسیله کاغذ صافی واتمن تخلیص گردید. در آخرین مرحله به منظور تبخیر حلال عصاره درون ظروف شیشه‌ای و در دمای محیط قرار گرفتند و بعد، تا زمان استفاده در یخچال نگهداری گشتند (۲).

بررسی طول موج جذبی ماکزیموم عصاره (λ_{max}) و رسم نمودارهای استاندارد در بافر فسفات‌سالین و ایزوپروپیل: به منظور به دست آوردن طول موج جذبی ماکزیموم عصاره در محدوده‌ی نور مرئی از عصاره، محلول استوک به غلظت ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در ایزوپروپیل و بافر PBS ساخته شد. با استفاده از این محلول‌ها و روش سری رقت‌های متوالی، غلظت‌های مختلفی از عصاره در محدوده‌ی ۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تهیه و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Epoch، آمریکا) طول موج جذبی عصاره در محدوده‌ی نور مرئی (۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر) در تمامی غلظت‌های تهیه شده، خوانده شد. در

آخر طول موجی که بیشتر میزان جذب در همه‌ی غلظت‌ها را داشت به عنوان طول موج جذبی ماکزیموم عصاره گل انار انتخاب گردید. این مرحله با سه بار تکرار صورت گرفت. برای رسم منحنی استاندارد عصاره در حلال ایزوپروپیل و PBS نیز با بهره‌گیری از جذب‌های به دست آمده در غلظت‌های مختلف عصاره در هر یک از بافرها و با بهره‌گیری از نرم‌افزار Excel منحنی استاندارد عصاره در بافرهای مذکور رسم و منحنی خط آنها به دست آمد. آزمایشات این مرحله نیز مانند مرحله‌ی قبل با سه بار تکرار صورت گرفت (۲)

روش فیلم نازک و ساخت نانولیپوزوم‌های حاوی

عصاره گل انار: در این مطالعه برای سنتز نانوذرات لیپیدی حاوی عصاره از روش فیلم نازک استفاده گردید که خود شامل چندین مرحله است (۲): مرحله‌ی اول: سنتز فیلم نازک: در مرحله اولیه، SPC80 و کلسترول با نسبت مولی ۷۰:۳۰، وزن‌بندی شده و سپس درون بالن مناسبی که با مقداری کلروفرم پر شده است، حل گردید. غلظت مشخصی از عصاره به مخلوط لیپیدی در بالن افزوده شد. سپس، بالن را روی دستگاه روتاری ایواپراتور (هیلدوف، آلمان) با دمای تنظیم شده ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه قرار دادیم تا طی ۲۰ دقیقه، مخلوط به صورت یکدست و همگن درآید. در ادامه در شرایط خلا، حلال آلی را حذف می‌کنیم و در نهایت، یک لایه نازک لیپیدی در ته بالن تشکیل گردید. مرحله‌ی دوم کاهش سایز با سونیکاسیون حمامی: در این مرحله برای کوچک‌سازی ذرات، از روش سونیکاسیون به حمامی به مدت ۴۰ دقیقه استفاده شد. مرحله سوم همگن سازی با فیلتراسیون: در مرحله فیلتراسیون، برای حذف ناخالصی‌ها و ذرات با اندازه نامطلوب، از فیلترهایی با قطرهای ۰/۴۵ میکرومتر و ۰/۲۲ میکرومتر استفاده شد تا سوسپانسیون نهایی از آن‌ها عبور داده شود. مرحله چهارم: جداسازی عصاره آزاد و بارگیری نشده با روش کیسه دیالیز: برای حذف دارویی که در لیپوزوم‌ها جای نگرفته، از روش دیالیز استفاده شد. کیسه‌های دیالیز با وزن مولکولی ۱۲ تا ۱۴ کیلودالتون به کار رفتند تا داروی آزاد را جدا کنند و میزان رهایش دارو را مورد بررسی قرار دهند. کیسه‌های

و بر اساس منحنی استاندارد عصاره در بافر PBS، نمودار آزادسازی عصاره از نانوذرات ترسیم شد (۲).

تعیین بار الکتریکی سطحی و اندازه نانوذرات: برای تعیین قطر ذرات نانو و بار الکتریکی سطحی آن‌ها (پتانسیل زتا)، از دستگاه زتا سایزر (مدل HORIBA) استفاده شد. اندازه‌گیری‌ها با استفاده از نور لیزر با طول موج ۶۵۷ نانومتر و در زاویه ۹۰ درجه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انجام پذیرفت (۲).

بررسی مورفولوژی نانوذرات: برای تحلیل و مطالعه بار سطحی نانوسیستم لیپوزومی که در این تحقیق ساخته شده است، حجمی معادل ۲۵ میکرولیتر از محلول لیپوزومی بر روی یک شیشه میکروسکوپی قرار گرفت و در معرض هوا خشک شد. سپس نمونه‌ها به مدت کوتاهی با طلا پوشانده شدند تا هدایت الکتریکی پیدا کنند. در نهایت، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی Fe-SEM و با توان ۱۰۰ وات، ویژگی‌های سطحی نانوحامل‌ها از جمله زبری، شکل، همواری و تجمع‌یافتگی مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش، از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) برای مطالعه ویژگی‌های سطحی نانوذرات از جمله زبری، شکل‌گیری و تجمع استفاده شد. میکروسکوپ نیروی اتمی، که یک ابزار دقیق برای تحلیل سطوح با دقت نانومتری است، به ما امکان می‌دهد تا توپوگرافی سطحی نمونه‌ها را با استفاده از یک نوک بسیار تیز با طولی معادل ۲ میکرون و قطری کمتر از ۱۰ نانومتر بررسی کنیم (۲).

رده‌ی سلولی: در این مطالعه از سلول‌های سرطانی سرطان پستان رده‌ی MCF-7 به عنوان سلول‌های سرطانی که از انستیتو پاستور تهران تهیه شدند استفاده گردید. همچنین از سلول‌های سالم فیبروبلاستی پوست ختنگاه انسان رده‌ی HFF که از مرکز ناباروری (IVF) یزد به دست آمدند به عنوان رده سالم و نرمال استفاده گردید. هر دو سلول در محیط DMEM و مطابق با پروتکل کشت سلولی ATCC (American Type Culture Collection) کشت داده شدند.

آماده‌سازی محیط کشت: محلول کشت DMEM طبق دستورالعمل موجود در جدول ۱، با استفاده از ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه و استریل شده تهیه شد. پس از اینکه

دیالیز پیش از استفاده، بین ۲ تا ۱۲ ساعت در آب مقطر ۷۰ درجه سانتی‌گراد خیسانده شدند. سپس، محلول دارویی به درون کیسه دیالیز انتقال یافت و به بشری که حاوی ۱۵۰ برابر حجم نمونه محلول بافر PBS منتقل شد. بشر دارای نمونه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در حمام یخ قرار گرفت و همزن کار گذاشته شد. فرآیند دیالیز در دو مرحله ۳۰ دقیقه‌ای انجام شد و در هر مرحله، بافر تازه جایگزین بافر قدیمی شد.

بررسی راندمان انکپسولاسیون نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره: لیپوزوم‌های حاوی عصاره را با نسبت‌های ۱ به ۱۰، ۱ به ۲۰ و ۱ به ۴۰ با ایزوپروپیل مخلوط کردیم تا دیواره لیپیدی آن‌ها شکسته شود و عصاره محبوس در داخل آزاد گردد. در نهایت، میزان جذب عصاره آزاد شده در رقت‌های مختلف و در طول موج ماکسیمم مشخص شده را با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری کردیم و با بهره‌گیری از منحنی استاندارد عصاره در ایزوپروپیل و رابطه زیر، درصد بارگذاری عصاره در لیپوزوم‌ها را محاسبه کردیم (۲):

$$\text{لیپوزوم‌ها را محاسبه کردیم (۲):} \frac{\text{مقدار عصاره محصور شده}}{\text{مقدار عصاره اولیه}} \times 100 = \text{راندمان عصاره بارگذاری شده}$$

بررسی روند رهایش عصاره از نانوسامانه: مطالعه‌ای بر فرآیند آزادسازی عصاره از نانولیپوزوم‌های تهیه‌شده انجام شد که در آن از تکنیک دیالیز استفاده گردید. در این تکنیک، حجمی معادل ۲۰ میلی‌لیتر از لیپوزوم‌های دارای عصاره در داخل کیسه دیالیز قرار داده شد و برای مدت زمان ۴۸ ساعت در کنار ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر PBS با نسبت ۱ به ۱۰، در شرایط دمایی و اسیدیته متفاوت (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH معادل ۷/۴) (مطابق با شرایط فیزیولوژیک بدن) و (دمای ۴۲ درجه و pH ۵/۴) (شرایط سلول سرطانی) نگهداری گردید. در فواصل زمانی مشخص و دوره‌ای (۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت)، ۱ میلی‌لیتر از محلول بافر اطراف کیسه دیالیز برداشته شده و مقدار مشابهی (۱ میلی‌لیتر) از بافر تازه با دما و pH برابر جایگزین گردید. سپس، میزان جذب نمونه‌های برداشته شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ماکزیموم عصاره اندازه‌گیری

محلول به طور کامل همگن شد، ۵۰۰ میکرولیتر از داروی ضد قارچ آمفوتریسین-B با غلظت ۱ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به محیط اضافه گردید. سپس، محیط کشت با افزودن ۱۰ درصد سرم FBS غنی‌سازی شده و pH آن در محدوده ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم گردید. در نهایت، با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری و رعایت شرایط استریل، محیط کشت زیر هود لامینار استریلیزه شد.

بررسی سمیت سلولی نانوذرات: آزمایش MTT، که بر اساس رنگ‌سنجی عمل می‌کند، بر پایه تبدیل کریستال‌های تترازولیوم زردرنگ (MTT) به فرمازان توسط آنزیم‌های ردوکتاز میتوکندریایی در سلول‌های زنده استوار است. با استفاده از آزمایش MTT، میزان بقای سلول‌ها پس از تماس با نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره در پلیت‌های ۹۶ خانه با تراکم سلولی 1×10^4 برای هر چاهک (۱۰۰ میکرولیتر کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین) سنجیده شد. پس از انتقال سلول‌ها به چاهک‌ها، برای اطمینان از چسبندگی آن‌ها، ۲۴ ساعت انکوباسیون انجام شد. سپس، محیط فوقانی چاهک‌ها خارج و با محیط کشت جدید حاوی فرم آزاد عصاره، عصاره لیپوزومال (غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) و لیپوزوم‌های خالی (با سری رقت-های مشخص) تیمار شدند. پس از ۷۲ ساعت، ۲۰

میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در PBS با pH برابر ۷ به هر چاهک اضافه و ۴ ساعت دیگر انکوباسیون داده شد تا سلول‌های زنده فرصت متابولیزه کردن MTT را داشته باشند. پس از این مدت، محلول داخل چاهک‌ها خارج و ۱۶۰ میکرولیتر DMSO برای حل کردن کریستال‌های فورمازان به هر چاهک افزوده شد. محلول درون چاهک‌ها به خوبی مخلوط و ۳۰ دقیقه دیگر انکوبه شد. در نهایت، جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (مدل Synergy HTX، شرکت Bio Tek، آمریکا) در طول موج‌های ۵۷۰ و ۶۳۰ نانومتر خوانده و درصد بقای سلول‌ها با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (۲).

$$\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت - میانگین جذب نوری در گروه آزمون} \\ = 100 \times \frac{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت - میانگین جذب نوری در گروه کنترل}}{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت - میانگین جذب نوری در گروه کنترل}} \\ \text{میزان زنده‌مانی سلول‌ها (\%)}$$

آنالیز آماری: برای تحلیل داده‌های آماری و تهیه چارت‌ها، از نسخه ششم نرم‌افزار پریسم بهره گرفته شد. تست ANOVA برای مقایسه گروه‌ها با در نظر گرفتن سطح خطای معناداری ۰/۵٪ به کار رفت. مقادیر P که از ۰/۵٪ بیشتر بودند، نادیده گرفته شدند. برای تجزیه و تحلیل نتایج آزمون MTT، از نرم‌افزار مایکروسافت اکسل ورژن ۲۰۱۳ استفاده شد. همچنین، برای بررسی داده‌های FE-SEM، از نرم‌افزار ImageJ استفاده گردید.

جدول ۱- مواد مصرفی به همراه وزن مورد استفاده شده برای ساخت محیط کشت DMEM

Table 1. Ingredients and weight used to make DMEM culture medium

L-Glutamine (g)	Streptomycin (g)	Penicillin (g)	NaHCO ₃ (g)	DMEM (g)
0.146	0.006	0.005	1.85	4.995

نتایج

طول موج ماکزیموم عصاره گل انار: بر اساس روشی که در بخش پیشین آورده شده، نمودار طیفی جذب عصاره گل انار در سطوح متفاوت غلظت، مشابه با نمایش داده شده در شکل ۱ می‌باشد. بیشینه جذب این عصاره در طول موج ۲۲۰ نانومتر رخ می‌دهد. لذا این طول موج به عنوان

طول موج جذبی ماکزیموم در نظر گرفته شد و در سایر تحلیل‌ها از آن استفاده گردید. نمودارهای استاندارد عصاره گل انار در بافرهای فسفات سالین و ایزوپروپانول: با بهره‌گیری از طول موج بیشینه جذبی عصاره گل انار، نمودارهای استاندارد برای این عصاره در محلول‌های ایزوپروپیل و PBS ترسیم شد. در

محلول ایزوپروپیل (شکل ۲)، نمودار استاندارد به صورت خط مستقیم با فرمول $Y=0.0028X-0.0054$ و ضریب رگرسیون (R^2) برابر با ۰٫۹۹۹۸ مشاهده می‌شود. در محلول PBS (شکل ۳) نیز، نمودار به صورت خط مستقیم با فرمول $Y=0.01118X-0.003406$ و ضریب رگرسیون ۰٫۹۹۹۶ است.

اندازه و بار الکتریکی سطحی نانوسامانه ستر شده حاوی عصاره گل انار: جهت بررسی سایز نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره از دستگاه زتا سایز استفاده گردید. نتایج نشان داد که سایز نانوذرات برابر با $155/1 \pm 4/7$ نانومتر است، که از نظر عددی در محدوده‌ی مناسبی قرار می‌گیرد. همچنین شاخص پراکندگی (PDI) برابر با ۰٫۳۴۵ است. بار سطحی نانوذرات نیز به وسیله‌ی دستگاه DLS اندازه‌گیری گردید. بر اساس آن داده‌ها می‌توان اینگونه استنباط کرد که پتانسیل زتای نانوذرات برابر با $3/4 \pm 17/1$ و نانو ذرات آنیونی هستند. نتایج اندازه ذرات و پتانسیل زتای نانو حامل‌ها در جدول ۲ گزارش شده است.

میزان درونگیری نانو سامانه و میزان رهائش عصاره: در نانوسیستم تولید شده، میزان بارگیری عصاره گل انار با بهره‌گیری از منحنی کالیبراسیون مربوطه در محیط ایزوپروپیل و با استفاده از فرمولاسیون مشخص، محاسبه شده و به طور میانگین $73/2$ درصد با انحراف معیار $2/6$ درصد به دست آمده است. تحلیل روند آزادسازی عصاره در شرایط متغیر دما و pH و در بازه‌های زمانی متفاوت با استفاده از داده‌های استاندارد عصاره این گیاه در محلول PBS انجام پذیرفته و در نمودار مربوطه (شکل ۴) نمایش داده شده است. مطالعه الگوی آزادسازی عصاره از نانوسیستم حاکی از آن است که سیستم مورد نظر دارای آزادسازی تدریجی و دو مرحله‌ای می‌باشد و در برابر عوامل محرک مختلف مانند دما و pH واکنش‌های متفاوتی را نشان می‌دهد. بالاترین میزان آزادسازی، که در طی ۴۸ ساعت در شرایط فیزیولوژیک بدن به میزان $51/3$ درصد با انحراف معیار $1/4$ درصد رخ داده، در حالی که در شرایط سرطانی با دمای بیشتر و pH پایین‌تر، این میزان به $67/2$ درصد با انحراف معیار $2/4$ درصد می‌رسد. بر اساس نمودار به دست آمده، آزادسازی عصاره از سیستم در دو مرحله

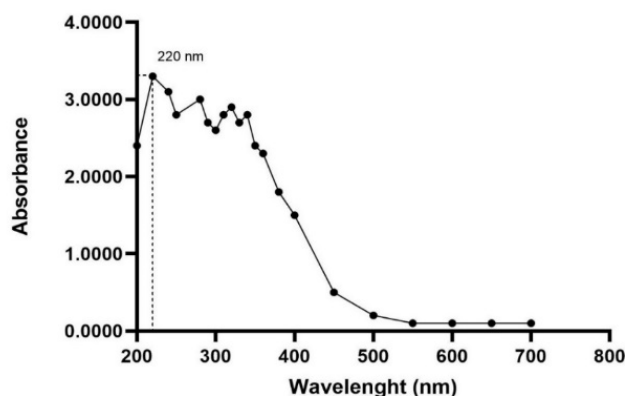
انجام می‌شود؛ مرحله اول با آزادسازی سریع‌تر که در ۸ ساعت اولیه رخ می‌دهد، ناشی از تفاوت قابل توجه در غلظت عصاره درون سیستم و محیط اطراف آن است، در حالی که مرحله دوم با کاهش شیب نمودار مشخص می‌شود که به دلیل کاهش تفاوت غلظت ایجاد شده است. نمودار شکل ۴ الگوی رهائش عصاره از سامانه لیپوزومی در شرایط مشابه سلول‌های سرطانی و سالم نشان می‌دهد. **مورفولوژی نانوذرات حاوی عصاره:** تصویر حاصل میکروسکوپ FE-SEM (شکل ۵) نشان می‌دهد که نانو ذرات حاوی عصاره تشکیل گردیده و از مورفولوژی کروی و سطح صاف برخوردار هستند. نتایج حاصل از بررسی سه بعدی نانوذرات حاوی عصاره گل انار به وسیله‌ی AFM نیز در شکل ۶ نشان داده شده است. بر اساس این تصاویر می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات دارای توپولوژی مناسب، کروی شکل و فاقد تجمع ناخواسته هستند که صحتی دیگر بر مورفولوژی مناسب نانو وزیکول‌های لیپیدی سنتز شده در این مطالعه است.

سمیت نانوسامانه سنتز شده بر سلول‌های سرطانی با روش MTT: تست سمیت سلولی نشان می‌دهد که لیپوزوم‌های فاقد عصاره سمیت ناچیزی بر سلول‌های سالم فیبروبلاست (HFF) داشته‌اند، این یافته‌ها امیدوارکننده است که عوارض جانبی ناخواسته بر سلول‌های طبیعی بدن نیز کاهش خواهند یافت، که این امر زیست‌سازگاری نانولیپوزوم‌ها را تأیید می‌کند (شکل ۷). بر اساس نتایج آزمون MTT که پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون بر روی سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های متفاوت لیپوزومی و آزاد عصاره گل انار انجام شد، مشخص شد که سمیت لیپوزوم-های حاوی عصاره پس از این مدت به طور قابل توجهی ($p < 0/005$) بیشتر از حالت آزاد عصاره است (شکل ۸). این آزمایش نه تنها خاصیت ضد تکثیر عصاره گل انار را بر روی سلول‌های سرطانی سرطان پستان تأیید می‌کند، بلکه نشان می‌دهد که عصاره در حالت لیپوزومی اثر سمی قوی‌تری بر سلول‌های سرطانی دارد (شکل ۸). علاوه بر این، نتایج نشان می‌دهند که سمیت عصاره در حالت انکپسوله شده در تمامی غلظت‌ها به طور معناداری ($0/005$) $p <$ بیشتر از حالت آزاد است و باعث مرگ‌ومیر بیشتری

در این سلول‌های سرطانی می‌شود. همچنین مشاهده شده که با افزایش غلظت عصاره، در هر دو حالت، سمیت آن بر روی سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد. مقایسه میزان IC_{50} عصاره‌های آزاد و انکپسوله شده در شکل ۹ نشان می‌دهد که لیپوزوم‌های حاوی عصاره در غلظت‌ها و دوزهای کمتر می‌توانند سمیت بیشتری نسبت به حالت آزاد ایجاد کنند، چرا که IC_{50} عصاره در حالت آزاد برابر با $426/6 \pm 8/2$ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و در حالت انکپسوله برابر با $164/3 \pm 4/1$ میلی‌گرم/میلی‌لیتر است، که این دو مقدار به طور معناداری متفاوت هستند.

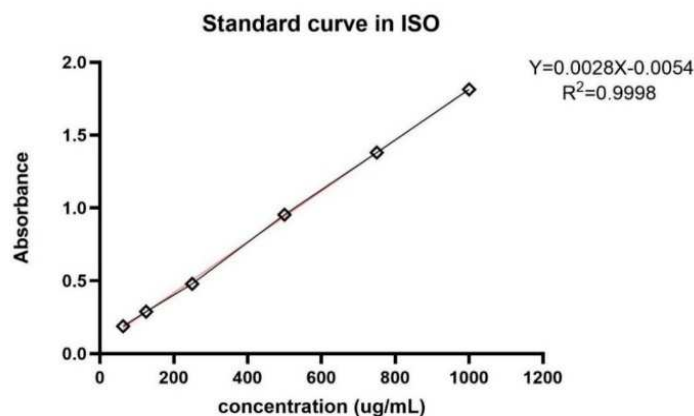
جدول ۲- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوسامانه سنتز شده

Table 2. Physicochemical characteristics of the synthesized nanosystem					
Encapsulation efficiency (%)	Maximum release within 48 hours under normal conditions (%)	Maximum release within 48 hours in cancer conditions (%)	Size (nm)	zeta potential (mV)	Polydispersity index (PDI)
73.2 ± 2.6	51.3 ± 1.4	67.2 ± 2.6	155.1 ± 4.7	-17.1 ± 3.4	0.345



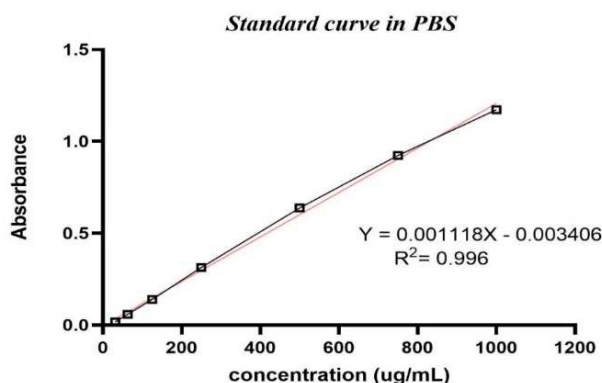
شکل ۱- طول موج جذبی عصاره در بازه ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر. بیشترین میزان جذب در طول موج ۲۲۰ نانومتر مشاهده شد.

Fig. 1. Absorption wavelength of the extract in the range of 200 to 800 nm. The highest amount of absorption was observed at the wavelength of 220 nm.



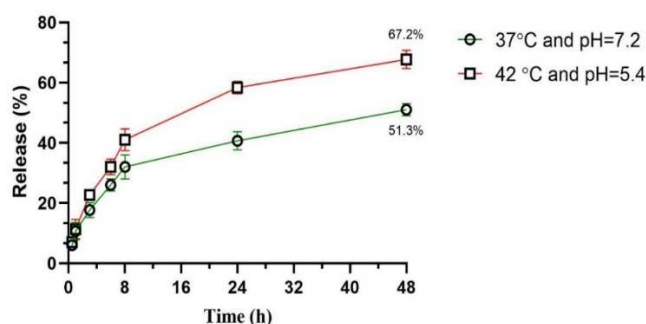
شکل ۲- نمودار استاندارد عصاره‌ی گل انار در بافر ایزوپروپیل

Fig. 2. Standard curve of pomegranate flower extract in isopropyl



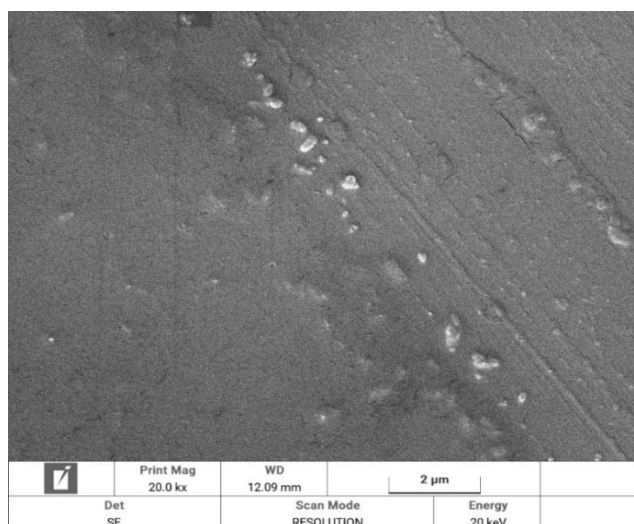
شکل ۳- نمودار استاندارد عصاره‌ی گل انار در بافر PBS

Fig. 3. Standard curve of pomegranate flower extract in PBS buffer



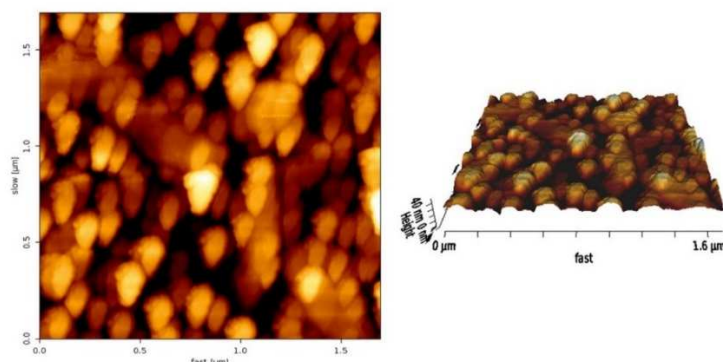
شکل ۴- بررسی روند رهاسازی عصاره از نانوسامانه لیپوزومی در پاسخ به محرک‌های مختلف دما و pH. شکل نشان می‌دهد که نانوسامانه لیپیدی دارای رهایشی کنترل شده و آهسته است. براساس این شکل مشخص می‌شود که بیشترین میزان رهایش در ۴۸ در شرایط نرمال ۱/۴ ± ۵۱/۳ و در شرایط سلول‌های سرطانی برابر است با ۲/۴ ± ۶۷/۲ درصد است.

Fig. 4. Examining the release process of the extract from the liposomal nanosystem in response to different stimuli of temperature and pH. The figure shows that the lipid nanosystem has a controlled and slow release. Based on this figure, it is clear that the highest release rate at 48 is 51.3 ± 1.4 in normal conditions and 67.2 ± 2.4 percent in cancer cells.



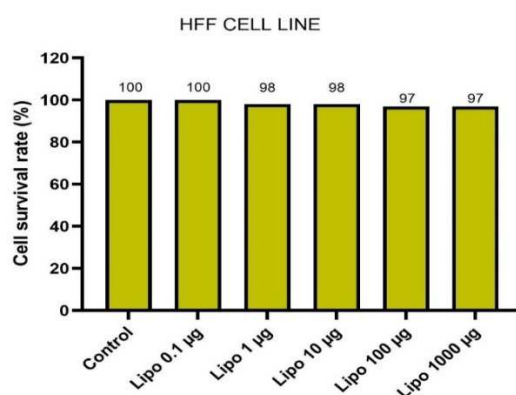
شکل ۵- تصویر به دست آمده از آنالیز نانولیپوزومهای حاوی عصاره با میکروسکوپ FE-SEM

Fig. 5. Image obtained from the analysis of nano-liposomes containing extract with FE-SEM microscope



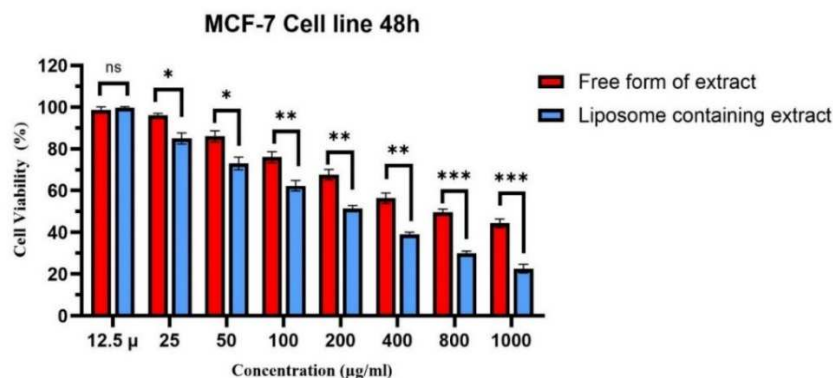
شکل ۶- تصویر به دست آمده از بررسی نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره به وسیله‌ی میکروسکوپ AFM

Fig. 6. Image obtained from examining nanoliposomes containing extract using AFM microscopy



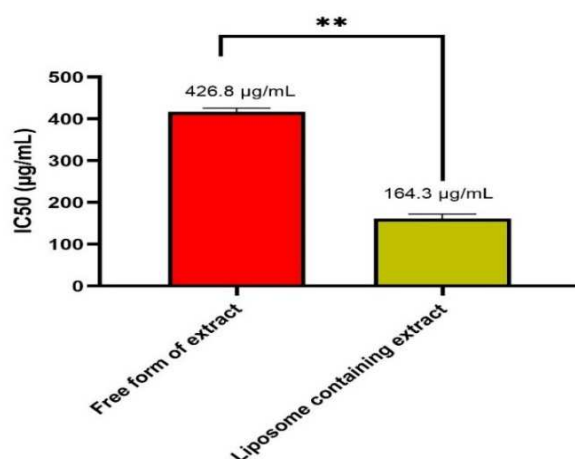
شکل ۷- بررسی سمیت نانولیپوزوم‌های فاقد عصاره بر روی سالم HFF. نتایج حاصل از این آنالیز در طی ۴۸ ساعت با استفاده از روش MTT نشان می‌دهد این نانوذرات سمیت بسیار کمی بر روی سلول فیبروبلاست (HFF) دارند.

Fig. 7. Toxicity study of extract-free nanoliposomes on healthy HFF. The results of this analysis over 48 hours using the MTT method show that these nanoparticles have very low toxicity on fibroblast cells (HFF).



شکل ۸- بررسی سمیت سلولی نانوسامانه سنتز شده با روش MTT. با توجه به نمودار، اثر سمیت با افزایش غلظت در هر دو حالت آزاد و انکپسوله رابط مستقیم دارد و با افزایش غلظت سمیت افزایش می‌یابد. همچنین سمیت عصاره انکپسوله در همه غلظت‌ها نسبت به عصاره آزاد به طور معناداری بیشتر است. NS: فاقد اختلاف معنادار، **: $P < 0.005$ و ***: $P < 0.005$

Fig. 8. Evaluation of the cytotoxicity of the synthesized nanosystem by MTT method. According to the graph, the toxicity effect has a direct relationship with the increase in concentration in both free and encapsulated states, and the toxicity increases with the increase in concentration. Also, the toxicity of the encapsulated extract is significantly higher than the free extract in all concentrations. NS: No significant differences. **and***: $p < 0.005$.



شکل ۹- بررسی میزان IC₅₀ عصاره گل انار در حالت آزاد و انکپسوله با استفاده از آنالیز MTT. بر اساس این نمودار می‌توان اینگونه استنباط کرد که سمیت عصاره انکپسوله نسبت به عصاره آزاد، بر روی سلول‌های رده‌ی MCF-7 سرطان پستان به طور معناداری افزایش پیدا کرده است. **: $P < 0.005$.

Figure 9. Checking the IC₅₀ value of pomegranate flower extract in free and encapsulated state using MTT analysis. Based on this graph, it can be concluded that the toxicity of the encapsulated extract compared to the free extract has significantly increased on MCF-7 breast cancer cells. **: $p < 0.005$

بحث

ایمن با عوارض جانبی کم برای مبارزه با سرطان تایید می‌کند (۲۰). عصاره گل انار به دلیل برخورداری از ترکیبات فعال زیستی نظیر پانیکلاژین، الازیک اسید و گالیک اسید از ویژگی‌های ضدتکثیری علیه سلول‌های سرطانی برخوردار است. این ترکیبات با افزایش مسیرهای مرتبط با آپوپتوز سلولی از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کنند (۴۵). نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که عصاره لیپوزومال گل انار نسبت به عصاره آزاد، خاصیت ضد تکثیری بیشتری علیه سلول‌های سرطانی MCF-7 پستان داشته است و سامانه بدون عصاره سمیت ناپذیری برای سلول‌های سالم فیبروبلاست ایجاد نموده است. کریمی مقدم و همکاران در ۲۰۱۹، طالعی اردکانی و همکاران در ۲۰۲۰ و پرریان و همکاران در ۲۰۲۰ در پژوهش‌های خود همانند پژوهش حاضر اثرات ضد تکثیری بیشتری را برای سامانه‌های لیپیدی حاوی دارو نسبت به داروی آزاد علیه سلول‌های سرطانی گزارش نموده‌اند (۱۹، ۴۶، ۳۱). برای مثال طائب‌پور و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان دادند که با انکپسولاسیون عصاره خارمریم در لیپوزوم‌ها، خاصیت ضدسرطانی آن افزایش و

استفاده از ترکیبات ضد تکثیری علیه سلول‌های سرطانی که دارای اثرات درمانی بالا و عوارض جانبی اندک باشد، لازم و ضروری است و در این بین ترکیبات گیاهی گزینه مناسبی برای این منظور است. ولی استفاده از آنها با چالش‌هایی روبرو است که استفاده از نانوذرات بویژه حامل‌های لیپیدی نظیر لیپوزوم می‌تواند در کاهش این مشکلات موثر باشند. در این مطالعه نانو حامل‌های لیپوزومی حاوی عصاره گل انار را سنتز نموده و ضمن سنجیدن ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن، اثرات ضد تکثیری آن را بر رده سلولی MCF-7 سرطان پستان بررسی نمودیم. آمار و ارقام حاکی از ناکارآمدی روش‌های درمانی کنونی در درمان سرطان پستان است. افزایش روز افزون تعداد مبتلایان به این بدخیمی در سرتاسر جهان و همچنین تعداد بالای مرگ‌ومیر گزارش شده در میان مبتلایان از یک سو و مقاومت سلول‌های توموری در برابر شیمی‌درمانی و عوارض جانبی شدید ناشی از سوی دیگر، نیاز به یک استراتژی درمانی جدید را برای درمان این بدخیمی روشن می‌کند (۲۶). بسیاری از مطالعات کارآمدی استفاده از گیاهان و عصاره‌های آنها را به عنوان عوامل ضد سرطان

اثر کشندگی آن بر روی سلول‌های سرطانی سرطان استخوان رده‌ی SAOS-2 افزایش می‌یابد (۴۴). در پژوهش حاضر نیز ما نشان دادیم که بارگذاری عصاره گل انار درون نانولیپوزوم سبب افزایش خاصیت ضدسرطانی آن بر روی سلول‌های سرطانی سرطان پستان می‌گردد. به طوریکه IC₅₀ عصاره از ۴۲۶/۸ میکروگرم/میلی‌لیتر در حالت آزاد به ۱۶۴/۳ میکروگرم/میلی‌لیتر در حالت انکپسوله کاهش می‌یابد که نشان از افزایش خاصیت ضدسرطانی و کاهش دوز مصرفی عصاره برای ایجاد سمیتی یکسان نسبت به حالت آزاد است. راندمان انکپسولاسیون دارو یا توانایی در بارگیری حداکثر میزان دارو از جمله‌ی این ویژگی‌ها است. این عامل به فاکتورهای مختلفی از جمله نوع و میزان مواد به کار رفته در سنتز نانوذرات و روش‌های ساخت آنها بستگی دارد. راندمان انکپسولاسیون نانوذرات ساخته شده در این مطالعه برابر با $2/6 \pm 73/2\%$ بود که کارآمدی این نانوذرات را اثبات می‌کند. در این مطالعه از SPC80 به جای SPC60 استفاده گردید که درجه‌ی اشباع بالاتری نسبت به SPC60 دارد و سبب کاهش سیالت غشای نانوذرات می‌گردد که به نوبه‌ی خود می‌تواند میزان درون‌گیری را در نانولیپوزوم‌ها به دلیل کاهش سختی آنها، افزایش دهد (۱۴) کلسترول نیز از جمله مواد دیگر در سنتز این نانوذرات بوده است. استفاده از کلسترول در سنتز نانوذرات بسیار مهم است چرا که یک اثر دوگانه و متناقض را در میزان درون‌گیری نانوذرات ایجاد می‌کند. استفاده از نسبت مولی صحیح کلسترول در سنتز نانولیپوزوم‌ها سبب پایداری غشای آنها و در نتیجه افزایش راندمان انکپسولاسیون در آنها می‌گردد. اما استفاده‌ی بیش از اندازه با کمتر از اندازه از کلسترول سبب اختلال در ثبات و سیالیت غشای نانوذرات لیپیدی و در نتیجه کاهش میزان درون‌گیری آنها می‌گردد (۱۵، ۳۳). میزان بارگذاری عصاره در این پژوهش نسبت به پژوهش‌های سال‌های اخیر از جمله پژوهش مجدی زاده و همکاران در ۲۰۱۸، میرزایی و همکاران در ۲۰۲۱، طائب پور و همکاران در ۲۰۲۱ و افتخاری و همکاران در ۲۰۲۴ بیشتر می‌باشد (۴۵، ۲۳، ۲۴، ۱۱). این تفاوت می‌تواند ناشی از نوع و ماهیت ماده بارگذاری شده و

درصد مولی مواد تشکیل دهنده سامانه‌های مورد استفاده در این پژوهش‌ها باشد. اندازه نانوذرات نیز در انتخاب یک نانوحامل دارورسان نقش بسیار کلیدی بازی می‌کند. چرا که اندازه‌ی نانوذرات سبب پایداری و توزیع مناسب آنها در دستگاه گردش خون انسان و در نتیجه رسانش دارو به بافت هدف می‌شود. نانوذرات با اندازه‌ی بیشتر از ۲۵۰ نانومتر به راحتی توسط سیستم ایمنی شناسایی و به عنوان عامل بیگانه حذف می‌گردند. همچنین نانوذرات در این محدوده‌ی سایز قادر نیستند تا توسط سیستم اندوتلیال پاکسازی گردند که موجب تجمع آنها در بافت‌های بدن مانند کبد و کلیه و ایجاد اثرات ثانویه ناخواسته گردند (۱۷). میزان کلسترول و فسفولیپید به کار رفته در سنتز نانوذرات لیپیدی اساسی‌ترین نقش را در تعیین اندازه آنها بازی می‌کند. به طور کلی کاهش میزان فسفولیپید تا حدی که پایداری غشای نانوذرات را بر هم نزند می‌تواند سبب کاهش سایز نانوذرات گردد. به عبارت دیگر لیپوزوم‌ها با محتوی کمتر از فسفولیپید اندازه‌ی کوچکتر از لیپوزوم با محتوی فسفولیپیدی بیشتر دارد. افزایش کلسترول درون لیپوزوم‌ها نیز با قرارگیری این مولکول در بین غشای دولایه نانوذرات پاسخ داده می‌شود که به نوبه‌ی خود سبب افزایش سایز نانوذرات می‌گردد (۲۸). اندازه‌ی نانوذرات در این مطالعه برابر با $4/7 \pm 155/1$ نانومتر است که عددی مطلوب به حساب می‌آید. بارالکتریکی سطحی نانوذرات نیز در انتخاب آنها به عنوان نانوحامل‌های دارو رسان بسیار فاکتور مهمی است. اگرچه نظر می‌رسد که ذرات با بار خیلی زیاد $< 30 \pm$ سبب پایداری کلئید می‌گردد چرا که این بار قوی سبب ایجاد نیروی دافعه‌ی نیرومند بین ذرات تشکیل دهنده کلئید و جلوگیری از رسوب آنها و در نتیجه پایداری آن می‌گردد اما در عمل و در سیستم گردش خون این ادعا صحیح نیست و دلیل آن سیستم ایمنی بدن میزبان است. سیستم ایمنی بدن انسان به سرعت مولکول‌هایی که بار یکسانی با سلول‌های خونی ندارند را شناسایی و به آنها پاسخ می‌دهد که این پاسخ به شکل بلعیده شدن و پاکسازی به وسیله‌ی ماکروفاژها یا مونوسیت‌های خونی است. لذا ذراتی با بار خیلی مثبت یا خیلی منفی به راحتی در بدن حذف می‌گردند (۴۰). نانوسامانه سنتز شده در این

مطالعه از نوع آنیونی و برابر با $3/4 \pm 17/1$ میلی ولت است که مطلوب و سازگار به حساب می‌آید. Majdizadeh و همکاران در ۲۰۲۵، Nafisi-Moghadam و همکاران در ۲۰۲۴، ساسانی و همکاران در ۲۰۲۱، شاهی و همکاران در ۲۰۱۹ و بهرامی بنان در ۲۰۱۸، در سال‌های اخیر برای سامانه‌های لیپیدی مورد استفاده در پژوهش‌های خود، همانند پژوهش حاضر، پتانسیل زتای منفی را گزارش نموده و از آن به عنوان نوعی ویژگی مطلوب یاد کرده‌اند (۷، ۲۲، ۲۵، ۳۵، ۳۷). ره‌ایش دارو از نانوسامانه نیز از جمله فاکتورهای مهم دیگر در انتخاب نانوذرات است. نانولیپوزوم‌های ساخته شده در این مطالعه دارای ره‌ایش آهسته و کنترل شده بودند. درجه آزادسازی دارو از نانوذرات تولیدی به فاکتورهای گوناگونی چون نوع و مقدار مواد مورد استفاده در ساختار نانوذرات وابسته است. به عنوان نمونه، افزایش مقدار کلسترول می‌تواند به افزایش درجه آزادسازی دارو از نانوذرات منجر شود، زیرا بالا رفتن سطح کلسترول در ساختار لیپوزوم‌ها موجب تشدید رقابت میان دارو و کلسترول برای قرار گرفتن در لایه‌های دوگانه فسفولیپیدی می‌شود، که این خود می‌تواند به افزایش درجه آزادسازی دارو کمک کند. از سوی دیگر، افزایش کلسترول می‌تواند به کاهش سیالیت غشای لیپوزومی منجر شود، که این نیز به نوبه خود، میزان آزادسازی دارو را از نانولیپوزوم‌ها بیشتر می‌کند (۲۱، ۳۰). نانوذرات سنتز شده می‌تواند به محرک‌های محیطی پاسخ دهند و این پاسخ با تغییر در میزان ره‌اسازی دارو صورت می‌گیرد به طوریکه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و $pH 7/2$ یا شرایط سلول نرمال میزان ره‌اسازی عصاره از نانوسامانه برابر با $1/4 \pm 51/3$ درصد است در حالیکه با افزایش دما به ۴۲ درجه سانتی-گراد و کاهش pH به ۵/۴ که شرایط شبیه به شرایط سلول سرطانی است میزان ره‌ایش به $2/6 \pm 67/2$ درصد افزایش می‌یابد. که این افزایش پاسخ در حقیقت دستاورد این مطالعه به حساب می‌آید چرا که با استفاده از این ویژگی می‌توان از ایجاد عوارض ناخواسته بر روی سلول‌های نرمال کاست. افزایش دما در اطراف نانوذرات سبب افزایش نفوذپذیری غشای لیپوزوم و در نتیجه افزایش

میزان ره‌اسازی دارو می‌شود. کاهش pH نیز با ایجاد یک گرادیان پروتون در طول غشا به وسیله پروتونیزاسیون گروه‌های آمینی موجود در عصاره باعث افزایش نفوذپذیری غشا و در نتیجه افزایش میزان ره‌اسازی دارو می‌گردد (۱). ساسانی و همکاران در ۲۰۱۹، طائب پور و همکاران در ۲۰۲۱، Siyadatpanah در ۲۰۲۳ و زارع زاده مهریزی در ۲۰۲۳ همانند پژوهش حاضر، ره‌ایش دارو از سامانه‌های لیپیدی مورد استفاده از پژوهش خود را آهسته ره‌ش گزارش نموده‌اند (۳۶، ۴۳، ۴۹). ما در این مطالعه موفق به سنتز نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گل انار با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسب و ره‌ایش آهسته و کنترل شده شدیم که توانستند به طور موثر سبب افزایش خاصیت ضدتکثیری عصاره بر روی سلول‌های سرطانی پستان نسبت به حالت آزاد آن گردند. همچنین نانوسامانه سنتز شده در این مطالعه توانست میزان ره‌اسازی عصاره را در پاسخ به محرک‌های محیطی مانند افزایش دما و اسیدیته محیط افزایش دهد.

نتیجه‌گیری

نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره انار با میزان انکپسولاسیون $2/6 \pm 73/2$ درصد، سایز $155/1 \pm 4/7$ نانومتر، شاخص پراکندگی $0/345$ و بار الکتریکی $3/4 \pm 17/1$ میلی‌ولت سنتز شده که دارای ره‌ایش آهسته، پیوسته و کنترل شده $1/4 \pm 51/3$ درصد در شرایط سلول نرمال و $2/6 \pm 67/2$ درصد در شرایط سلول سرطانی بودند، سنتز گردید که توانستند به طور چشمگیری سبب افزایش خاصیت ضدسرطانی عصاره بر روی سلول‌های سرطانی رده‌ی MCF-7 سرطان پستان شوند و IC_{50} عصاره را از $426/8$ میکروگرم/میلی‌لیتر در حالت آزاد به $164/3$ میکروگرم/میلی‌لیتر در حالت انکپسوله کاهش دهند. همچنین نانولیپوزوم‌های سنتز شده در این مطالعه از نوع زیست‌سازگار بوده و از سمیت ناچیزی بر سلول‌های سالم بدن انسان برخوردار بودند.

منابع

1. Akbari, P., Taebpour M., Akhlaghi M., Hasan S.H., Shahriyari S., Parsaeian M., Haghirosadat B.F., Rahdar A., Pandey S. 2024.

CA: A Cancer Journal for Clinicians, 69(6):438-451.

10. DeSantis, C.E., Ma, J., Goding Sauer, A., Newman, L.A., Jemal, A. 2017. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 67(6):439-448.

11. Eftekhari-Vash, L., Majdizadeh, M. 2024. Fabrication and physicochemical characterization of liposome systems 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 and Health in Basic Medical Sciences*, 18(4):59-69.

12. Faria, A., Calhau, C. 2011. The bioactivity of pomegranate: impact on health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(7):626-634.

13. Filipczak, N., Pan, J., Yalamarty, S.S.K., Torchilin, V.P. 2020. Recent advancements in liposome technology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 156:4-22.

14. Ghafari, M., Haghirsadat, F., Khanamani Falahati-pour, S., Zavar Reza, J. 2020. Development of a novel liposomal nanoparticle formulation of cisplatin to breast cancer therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(7):3584-3592.

15. Kirby, C. J., Gregoriadis, G. 2019. A simple procedure for preparing liposomes capable of high encapsulation efficiency under mild conditions. In *Liposome Technology* (pp. 19-27). CRC Press.

16. Ghashghaei, M., Akhlaghi, M. 2021. Investigation of nanoniosomal formulation containing doxorubicin effect on ovarian cancer cell line (OVCAR-3 cell line). *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 11(43):46-62.

17. Harashima, H., et al. 1994. Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharmaceutical Research*, 11:402-406.

18. Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P., Starosławska, E. 2015. Breast cancer risk factors. *Menopause Review/Przegląd Menopauzalny*, 14(3):196-202.

19. Karimi-Moghammad, A., Nikounahad-Lotfabadi, N., Haghirsadat, B.F., Majdizadeh, M. 2019. Investigating the effect of lipid

Regulation of the P53 tumor suppressor gene and the Mcl-2 oncogene expression by an active herbal component delivered through a smart thermo-pH-sensitive PLGA carrier to improve osteosarcoma treatment. *Medical Oncology*, 41(3):68.

2. Akhlaghi, M., Eftekharivash, L., Parnian, F., Taebpour, M., Rostamian, T., Zarezadeh Mehrizi, M., Haghirosadat, B.F. 2021. Synthesis and study of cellular and physicochemical properties of nanoliposomes containing aqueous extract of Hedera Helix. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 12(45):97-112.

3. Akhlaghi, M., Eftekharivash, L., Taebpour, M., Afereydoon, S., Ebrahimpour, M., Mehrizi, M.Z., fatemeh Haghirosadat, B. 2022. Improving the therapeutic performance of glycyrrhiza glabra hydroalcoholic extract using liposomal nano-carriers and their characterization. *Disease and Diagnosis*, 11(2):39-48.

4. Akhlaghi, M., Taebpour, M., Lotfabadi, N. N., Naghib, S. M., Jalili, N., Farahmand, L., Tofghi, D. 2022. Synthesis and characterization of smart stimuli-responsive herbal drug-encapsulated nanoniosome particles for efficient treatment of breast cancer. *Nanotechnology Reviews*, 11(1):1364-1385.

5. American cancer society. 2025. cancer facts and figures 2025. Atlanta american cancer.

6. Baghiani, M., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F. 2019. Experimental study: experimental evaluation of phospholipid system containing doxorubicin HCL for use in chemotherapy. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 26(11):945-956.

7. Bahrami-Banan, F., Sheikhha, M.H., Ghasemi, N., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F. 2018. Preparation and study of nanoniosomes containing doxorubicin and evaluation of its toxicity on acute myeloblastic leukemia cell line KG-1. *Journal of Payavard Salamat*, 12(4):309-323.

8. Deng, Y., Li, Y., Yang, F., Zeng, A., Yang, S., Luo, Y., Yin, W. 2017. The extract from *Punica granatum* (pomegranate) peel induces apoptosis and impairs metastasis in prostate cancer cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 93:976-984.

9. DeSantis, C.E., Ma, J., Gaudet, M.M., Newman, L. A., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Siegel, R.L. 2019. Breast cancer statistics.

28. Nagayasu, A., Uchiyama, K., Kiwada, H. 1999. The size of liposomes: A factor that affects their targeting efficiency to tumors and the therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 40(1-2):75-87.
29. Oun, R., Moussa, Y.E., Wheate, N.J. 2018. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Transactions*, 47(19): 6645-6653.
30. Pande, S. 2023. Liposomes for drug delivery: Review of vesicular composition, factors affecting drug release, and drug loading in liposomes. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 51(1):428-440.
31. Parnian, F., Hekmati-Moghadam, S.H., Majdizadeh, M., Jebali, A., Haghirsadat, B.F. 2020. Fabrication of niosomal nano-carriers containing aqueous extract of heder helix and comparison of toxicity of free extract and niosome extract on HT29 colorectal cancer cell line. *Journal of Knowledge and Health in Basic Medical Sciences*, 15(3):31-45.
32. Pearce, A., Haas, M., Viney, R., Pearson, S. A., Haywood, P., Brown, C., Ward, R. 2017. Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. *PloS one*, 12(10):e0184360.
33. Pornsunthorntawe, O., Chavadej, S., Rujiravanit, R. 2011. Characterization and encapsulation efficiency of rhamnolipid vesicles with cholesterol addition. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(1):102-106.
34. Rabani, E., Behzadi, R., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F. 2022. Fabrication of liposomal formulation containing paclitaxel and comparison of its toxicity with non-liposomal paclitaxel on MCF-7 breast cancer cell line. *Pars Journal of Medical Sciences*, 18(2):26-40.
35. Sasani, E., Shahi Malmir, H., Daneshmand, F., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F. 2020. Synthesis and physiochemical characterization of liponiosomal hybrid nano-carriers as carriers for doxorubicin HCl anti-cancer drug. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*, 27(1):35-47.
36. Sasani, E., Shahi Malmir, H., Daneshmand, F., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F. 2018. A new study on synthesis and optimization of PEGylated nanoparticles containing silibinin anti-cancer drug on the growth of breast cancer MCF-7 cell line. *Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences*, 6(4):1-12.
20. Li, K., Xiao K., Zhu S., Wang Y., Wang W. 2022. Chinese herbal medicine for primary liver cancer therapy: Perspectives and challenges. *Frontiers in Pharmacology*, 13:889799.
21. Lindner, L.H., Hossann, M. 2010. Factors affecting drug release from liposomes. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 13(1):111-123.
22. Majdizadeh, M., Akbarzadeh, S., Al-Turnachy, H.H., Hemati, M., Akhlaghi, M., Haghirsadat, B.F., Oroojalian, F. 2025. Synthesis of nano-liposomes containing Mentha piperita essential oil and investigating their stability, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative properties. *Nanomedicine Journal*, 12(1):122-139.
23. Majdizadeh, M., Rezaei-Zarchi, S., Movahedpour, A.A., Shahi Malmir, H., Sasani, E., Haghirsadat, B.F. 2018. A new strategy in improving therapeutic indexes of medicinal herbs: Preparation and characterization of nano-liposomes containing Mentha piperita essential oil. *SSU Journals*, 25(11):853-864.
24. Mirzaei, F., Majdizadeh, M., Fatahi-Bafghi, A., Ehsani, R., Haghirsadat, B. F. 2021. Fabrication and characterization of liposomal nano-carriers containing essential oils of Trachyspermum ammi to counteract Trichomonas vaginalis. *Koomesh*, 23(2):283-290.
25. Moghadam, R.N., Majdizadeh, M., Golbashi, M., Haghirsadat, F., Hemati, M. 2024. Laboratory study: Synthesis and optimization of nano-niosomes containing Bunium persicum essential oil and investigating its toxicity on Trichomonas vaginalis parasite and HFF cell line. *Heliyon*, 10(16):e35967.
26. Mohseni, M. 2021. A new therapeutic approach for the treatment of breast cancer using synthesis of liposomes containing silybinin and their characterization. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 11(44):57-70.
27. Momenimovahed, Z., Salehiniya, H. 2019. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 11:151-164.

marianum and evaluation of its toxicity on human osteosarcoma cancer cell line (SAOS-2) and evaluation effect of free hydroalcoholic extract of Silybum marianum and empty liposomes on healthy human fibroblast cell (HFF). *Journal of Knowledge and Health in Basic Medical Sciences*, 16(1):61-73.

45. Taebpour, M., Majdizadeh, M., Nodoushan, F.S., Akhlaghi, M., Haghirsadat, B.F. 2023. Evaluation and Comparison of Punica Granatum Peel and Flower Extract

Toxicity on MCF-7 Breast Cancer Cell Line and Comparison of Antioxidant Activity of Punica Granatum Peel and Flower Extract. *Journal of Knowledge and Health in Basic Medical Sciences*, 18(1):9-16.

46. Talei-Ardakani, N., Daneshmand, F., Mirhoseini, M., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F. 2020. Fabrication and characterization of physicochemical niosomal nanocarriers containing quercetin flavonoids for therapeutic purposes. *Journal of Knowledge and Health in Basic Medical Sciences*, 15(1):fa32-fa40

47. van den Boogaard, W.M., Komninos, D.S., Vermeij, W.P. 2022. Chemotherapy side-effects: not all DNA damage is equal. *Cancers*, 14(3):627.

48. Waks, A.G., Winer, E.P. 2019. Breast cancer treatment: a review. *Jama*, 321(3):288-300.

49. Zarehzadeh-Mehrizi, M., Majdizadeh, M., Zarehzadeh-Mehrizi, M., Afshoun, A., Zhian-Mehrizi, M., Haghirsadat, B.F. 2023. Investigating the performance of liposomal formulations containing clove essential oil made by thin layer and heat method in temperature and pH conditions similar to the mouth in order to be used in the research of oral and dental diseases. *Experimental Animal Biology*, 12(46):15-26.

liponiosomal nanocarriers containing curcumin for use in cancer chemotherapy. *SSU Journals*, 26(6):528-541.

37. Shahi Malmir, H., Kalantar, S.M., Sasani, E., Asgari, M., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F. 2019. Synthesis and optimization of niosomal carriers containing doxorubicin in order to achieve a final formulation with high potential in cancer cells' temperature and acidity. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 26(10):879-894.

38. Sharma, P., McClees, S.F., Afaq, F. 2017. Pomegranate for prevention and treatment of cancer: an update. *Molecules*, 22(1):177.

39. Siyadatpanah, A., Norouzi, R., Mirzaei, F., Haghirsadat, B.F., Nissapatorn, V., Mitsuan, W., Nawaz, M., Lourdes, M., Hosseini, S. A., Montazeri, M., Majdizadeh, M., Almeida, R. S., Hemati, M., Wilairatana, P., Douglas, H. 2022. Green synthesis of nano-liposomes containing Bunium persicum and Trachyspermum ammi essential oils against Trichomonas vaginalis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 56(1):150-162.

40. Smith, M.C., Crist R.M., Clogston J.D., McNeil S.E., 2017. Zeta potential: A case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409:5779-5787.

41. Sun, Y.S., Zhao, Z., Yang, Z.N., Xu, F., Lu, H.J., Zhu, Z.Y., Zhu, H.P. 2017. Risk factors and preventions of breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(11):1387.

42. Taebpour, M., Akhlaghi, M., Shahriary, S., Hajihosseini, S., Haghirsadat, F., Oroojalian, F., Tofghi, D. 2022. Synthesis, physicochemical characterization and pharmaceutical function of niosomal nanoparticles-encapsulated bioactive compound for osteosarcoma treatment. *Nanomedicine Journal*, 9(3):205-215.

43. Taebpour, M., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F. 2021. Fabrication and characterization of liposomal nanoparticles containing hydroalcoholic extract of Artemisia absintium and its toxicity on MCF-7 breast cancer cell line. *Iranian Journal of Breast Diseases*, 14(1):64-77.

44. Taebpour, M., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B.F., Akhlaghi, M. 2021. Fabrication of liposomal nanoparticles containing hydroalcoholic extract of Silybum