

Research Article

Investigation of the Cellular, Molecular and Anti-Apoptotic Effects of Lipid Nanoparticles Containing *Artemisia aucheri* Essential Oil on Ovarian Cancer Cells

Farnaz Aboutalebi, Maryam Teimouri^{2*}

1- Department of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

*Corresponding author: Teimourimaryam93@gmail.com

Received: 17 March 2025

Accepted: 18 June 2025

DOI:

Abstract

Ovarian cancer is one of the 9 most common cancers and one of the 5 leading causes of cancer death in women. *Artemisia aucheri* Boiss belongs to the Asteraceae family, and many studies have reported the effectiveness of its essential oil and extract on inhibiting the growth of cancer cells. Today, nanocarriers are used to load various plant essential oils to prevent oxidation of essential oils and their stability, in addition to better targeting and effectiveness. Solid lipid nanoparticles (SLN) are used in many studies today as carrier systems for loading vitamins, drugs, and essential oils. Given the importance of ovarian cancer and the antioxidant potential of *Artemisia aucheri*, in this study, the essential oil of *Artemisia aucheri* was loaded into lipid nanoparticles with the aim of investigating cellular, molecular, and anti-apoptotic effects on ovarian cancer cells. First, nanoparticles containing Artemisia essential oil were synthesized using a homogenizer plus sonication method and subsequently their physicochemical properties (such as particle size, particle size distribution, zeta potential, percentage of essential oil loading efficiency, particle shape) were determined. The findings showed that increasing the concentration of lipid nanoparticles containing Artemisia essential oil led to a decrease in the viability of ovarian cancer cells (Hella) compared to pure essential oil. The results of the present study showed that lipid nanoparticles containing *Artemisia* extract activated the apoptosis pathway in ovarian cancer cells and consequently stopped tumor growth.

Keywords: Solid Lipid Nanoparticle, Ovarian cancer, *Artemisia aucheri*, Anti-apoptotic.

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات سلولی و ملکولی و ضدآپوپتوتیک نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس گیاه درمنه کوهی (*Artemisia aucheri*) بر سلول‌های سرطان تخمدان

فرناز ابوطالبی^۱، مریم تیموری^{۲*}

۱- گروه داروسازی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

*مسئول مکاتبات: teimourimaryam93@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۷

DOI:

چکیده

سرطان تخمدان یکی از نه سرطان رایج می‌باشد و یکی از پنج دلیل مهم مرگ ناشی از سرطان در زنان است. گیاه درمنه با نام علمی *Artemisia aucheri* Boiss متعلق به خانواده Asteraceae می‌باشد که در تحقیقات زیادی اثربخشی اسانس و عصاره این گیاه بر روی مهار رشد سلول‌های سرطانی گزارش شده است. امروزه از حامل‌های نانو به منظور بارگیری اسانس‌های مختلف گیاهی به جهت جلوگیری از اکسیداسیون اسانس‌ها و پایدار ماندن آنها علاوه بر هدفمند کردن و اثر بخشی بهتر استفاده می‌شود. نانو ذرات لیپیدی جامد SLN امروزه در تحقیقات بسیاری به عنوان سیستم‌های حامل برای بارگذاری ویتامین‌ها، داروها و اسانس‌ها استفاده می‌شوند. با توجه به اهمیت سرطان تخمدان و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی گیاه درمنه کوهی، در این مطالعه اسانس گیاه درمنه در نانو ذرات لیپیدی با هدف بررسی اثرات سلولی و ملکولی و ضدآپوپتوتیک بر سلول‌های سرطان تخمدان بارگذاری شد. ابتدا نانوذرات حاوی اسانس درمنه با روش هموژنایزر بعلاوه سونیکاسیون ستنز و متعاقباً خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنها (مثل اندازه ذرات، توزیع اندازه ذره‌ای، پتانسیل زتا، میزان درصد باردهی بارگذاری اسانس، شکل ذرات) تعیین شدند. یافته‌ها نشان داد که افزایش غلظت نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس گیاه درمنه کوهی منجر به کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطان تخمدان (Hella) در مقایسه با اسانس خالص شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نانوذرات لیپیدی حاوی عصاره گیاه آرتیمیسیا، مسیر آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی تخمدان فعال کرده و در نتیجه باعث توقف رشد تومور شد.

کلمات کلیدی: نانوذرات لیپیدی، سرطان تخمدان، گیاه درمنه کوهی، ضدآپوپتوتیک.

مقدمه

بینی می‌شود که در سال ۲۰۲۵ به ۱۹/۳ میلیون نفر برسد (۱). در ایران، میانگین میزان ابتلا به سرطان حدود ۷/۱ در هر ۱۰۰۰۰۰ جمعیت می‌باشد و تخمین زده می‌شود که در هر سال ۸۵۰۰۰ فرد مبتلا به سرطان می‌شوند و تقریباً ۵۵۰۰۰ نفر به علت سرطان در هر سال جان خود را از دست می‌دهند (۲). در

سرطان یکی از دلایل اصلی مرگ‌ومیر در بیش از یک سوم جمعیت جهانی است و باعث بیش از ۲۰ درصد کل مرگ و میر در سراسر جهان می‌شود. طبق گزارش آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان سازمان بهداشت جهانی که در سال ۲۰۱۴ منتشر شده است، میزان بروز سرطان در حدود ۱۴ میلیون مورد جدید بوده و پیش-

این میان، سرطان تخمدان دومین سرطان زنان و دلیل مرگ و میر ناشی از سرطان دستگاه تناسلی بدخیم زنان است. همچنین، سرطان تخمدان یکی از ۹ سرطان رایج می‌باشد و یکی از پنج دلیل مهم مرگ ناشی از سرطان در زنان است که به راحتی در مراحل اولیه قابل تشخیص و درمان است (۳). اما اگر به تعویق افتد، درمان مشکل و گاهی ناموفق خواهد بود (۴). رایج‌ترین شکل سرطان تخمدان سرطان تخمدان اپیتلیالی است که تاحد زیادی بدون علامت است و بیش از ۷۰ درصد بیماران در مرحله پیشرفته بیماری تشخیص داده می‌شوند که خط اول درمان استاندارد شامل تعیین حجم تومور بوسیله جراحی و درمان مبنی بر شیمی‌درمانی ترکیبی است (۵). درمان اولیه سرطان تخمدان نتایج کلینیکی خوبی را نشان می‌دهد اما بیماران پس از مدتی به درمان مقاوم می‌شوند (۶). بنابراین، مقاومت به شیمی درمانی سدی در برابر درمان سرطان تخمدان به وجود می‌آورد. در راستای غلبه بر این سد، یافتن داروهایی موثرتر یا مکمل درمان، همراه با عوارض جانبی کمتر برای افزایش طول عمر این بیماران ضروری است. شواهد سازمان بهداشت جهانی نشان می‌دهد که حدود ۷۰ درصد از جمعیت در سراسر جهان ترجیح می‌دهند از داروهای سنتی و گیاهی برای درمان بیماری‌های خود استفاده کنند. در ایران نیز، استفاده از داروهای جایگزین مکمل در دهه گذشته به طور چشمگیری افزایش یافته است (۷). بطوریکه تقریباً ۶۰ درصد از عوامل ضد سرطان از گیاهان دارویی و دیگر منابع طبیعی حاصل می‌شود (۸). با این حال هنوز تعداد زیادی از گیاهان دارای پتانسیل ضد سرطانی هستند که هنوز مورد بررسی قرار نگرفته‌اند. بنابراین راه حل متناوب برای اثرات مضر داروهای مصنوعی، استفاده از داروهای جایگزین مکمل است. یکی از این گیاهان دارویی ارزشمند، گیاه درمنه با نام علمی *Artemisia* می‌باشد

که متعلق به خانواده *Asteraceae* است (۹). بسیاری از گونه‌های این خانواده خواص درمانی از خود نشان داده‌اند که به واسطه حضور متابولیت‌هایی از جمله فلاونوئیدها، کومارین‌ها، استروئید، پلی اتیلن، مونو و سسکویتپنس و لاکتون سوزویتروپن می‌باشد (۱۰). اسانس‌های گیاهی منابعی سرشار از مواد فعال طبیعی و ضروری بیولوژیک هستند که دارای اثرات چون خاصیت ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی، حشره‌کش، آنتی‌اکسیدانت و ضدسرطان می‌باشند (۴). گیاه درمنه یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که برای درمان انواع بیماری‌ها از جمله سرفه، عفونت گوش میانی و درد در کشورهای شرقی شناخته می‌شود (۳). این گیاه دارویی به دلیل داشتن مواد فعال ویژه انواع فعالیت‌های دارویی مانند اثرات ضد التهابی، ضد ویروسی و ضد سرطان را دارا می‌باشد (۱۱، ۱۲). انکپسوله کردن اسانس‌های گیاهی یکی از کارآمدترین روش‌ها برای افزایش حلالیت و پایداری اسانس‌ها در شرایط نامساعد محیطی و کنترل ترکیبات فعال آن است. توسعه فرمولاسیون‌های نانو سایز از ترکیبات فعال زیستی به دلیل اندازه کوچک آن دارای مزیت‌های بیشتری در مقایسه با سایر سیستم‌های انکپسولاسیون می‌باشد. این سیستم‌ها به دلیل سایز کم جذب داخل سلولی بالاتری داشته و هدفمند عمل می‌کند. با توجه به ماهیت چرب اسانس‌های گیاهی، نانوذرات لیپید جامد (SLN) به دلیل دارا بودن زیست سازگاری، سمیت کم و تجزیه پذیری مناسب به همراه توانایی کپسوله کردن ترکیبات بیولوژیکی آبریز می‌توانند به عنوان گزینه ای بسیار سودمند برای حمل اسانس‌های گیاهی مورد استفاده قرار گیرند (۱۲). با توجه به اهمیت سرطان تخمدان و اثر سمیت برخی از گونه‌های درمنه بر سلول‌های سرطانی (۱۱، ۱۲). در این مطالعه ترکیبات شیمیایی اسانس با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی جرمی (GC/MS) بررسی شد.

شیر اضافه می‌شود. سپس انتشار اولیه با فشار ۲۵۰ بار در سه چرخه متوالی توسط فشار بالا همگن می‌شود. هموژنایزر پس از همه، نمونه تا دمای محیط خنک می‌شود تا نانوذرات تشکیل شود. دارونما نیز طبق روش فوق تهیه شد.

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات: تعیین اندازه ذره‌ای، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا: اندازه گیری پارامترها در دمای اتاق با زاویه ۹۰ درجه با استفاده از دستگاه زتاسایزر (مالورن انگلستان سری (ZS) انجام شد. برای بررسی پارامترهای مورد نظر، دستگاه بر اساس فاز آبی ($RI = 1/3$) کالیبره شده و سپس از فیلتر سر سرنگی با اندازه ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شدند و اندازه ذره‌ای، پتانسیل زتا و توزیع اندازه ذره‌ای در ۳ تکرار مورد آنالیز قرار گرفت.

کشت سلولی و گروه‌بندی: رده سلولی سرطان تخمدان انسان (کد ATCC: HTB-77 SKOV-3) و همچنین رده سلولی طبیعی (HEK293) طبق پروتکل ارائه شده توسط بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. کشت در مکمل محیطی PRMI با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و همچنین پنی سیلین در انکوبه CO₂ در ۳۵ درجه سانتی‌گراد دو رده سلولی به مدت ۲۴ ساعت با ویسکوزیته متفاوت نانوذرات مشاهده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

رده سلولی SKOV-3: گروه اول (کنترل، SKOV-3 بدون درمان)، گروه دوم (SKOV-3 + ۲۵ میکرولیتر نانو اسانس حاوی دارو) گروه سوم (سلول‌های SKOV-3 + ۵۰ میکرولیتر اسانس نانودارویی) گروه چهارم (سلول‌های SKOV-3 + ۱۰۰ میکرولیتر اسانس نانودارویی).

رده سلولی HEK-293: گروه اول (کنترل، HEK-293 بدون درمان)، گروه دوم (HEK-293 + ۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر نانو حاوی اسانس)، گروه سوم (HEK-293 + ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر نانو اسانس) و

سپس. طی فرمولاسیون‌های مختلف با استفاده از سورفکتانت‌ها و چربی‌های مختلف اسانس در داخل نانوذرات لیپیدی جامد (AR-SLN) با استفاده از هموژنایزر بارگذاری و خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانو ذرات چون اندازه ذره‌ای، شاخص پراکندگی PDI و پتانسیل زتا با استفاده از دستگاه زتا سایزر مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین میزان بازدهی بارگذاری اسانس در نانو ذرات (EE%) با استفاده از دستگاه UV بررسی و میزان آزادسازی اسانس از نانو ذرات در بافر با استفاده از کیسه دیالیز بررسی و در نهایت فعالیت سیتوتوکسیک اسانس بارگذاری شده در نانوذرات در مقایسه با اسانس خالص بر روی رده سلولی Hella در مقایسه با سلول‌های نرمال HEK-293 با استفاده از روش رنگ‌سنجی مبتنی بر تتراسولیم کمی (MTT) بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی ترکیبات درمنه: برای این تحقیق، سر شاخه‌های هوایی درمنه وحشی با نام علمی *Artemisia Aucheri Boiss* از منطقه جغرافیایی کرمان جمع‌آوری سپس طی مرحله خشک کردن گیاه خشک شده آسیاب شد و اسانس توسط کلونجر جمع‌آوری شد.

روش تهیه نانو ذرات حاوی درمنه: برای ساخت نانوذرات از روش هموژنایزر فشار بالا مذاب استفاده شد. برای این مطالعه، دو نوع سورفکتانت لیپوفیلیک (جامد دهانه ۶۰، دهانه مایع ۸۰) و یک سورفکتانت هیدروفیل و پنج نوع جامد لیپید (اسید استئاریک، اسید پالمیتیک، کلسترول، بیسموت و گلیسرین مونو استئارات) انتخاب شدند. در این در مورد، فاز لیپیدی حاوی سورفکتانت چربی دوست اسانس و چربی در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد است. به فاز آبی حاوی سورفکتانت هم دما فاز لیپیدی تحت هموژنایزرهای

نتایج

با بررسی طیف‌های حاصل از گاز کروماتوگرافی (GC/MS)، محاسبه اندیس‌های بازداری و مقایسه طیف‌های جرمی ترکیب‌ها با ترکیب‌های استاندارد، ۵۶ ترکیب مختلف در اسانس درمنه شناسایی شد. بازدیمی اسانس ۱/۵ سی‌سی برآورد شد. ترکیب‌های عمده آن به ترتیب عبارتند از: cis-Thujone (۲۷/۶۷ درصد)، trans-Thujone (۱۴/۷۸ درصد) Camphor (۱۶/۷۹) و trans-Verbenol (۷ درصد) می‌باشد. تجزیه و تحلیل خصوصیات فیزیکی و شیمیایی SLN، توسط UV-VIS، حداکثر جذب اسانس ۲۷۴ نانومتر است که منحنی کالیبراسیون اسانس در شکل ۱، میانگین جذب و انحراف معیار در ۲۵۴ نانومتر ترسیم شده است. اولین نشانه تولید نانوذرات لیپیدی تغییر رنگ ذرات سنتز شده است. تغییر رنگ پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون به دست آمد. مطالعه DLS نشان داد که اندازه متوسط نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس درمنه ۱۱۲/۸ نانومتر است که در شکل ۲ نشان داده شده است. نمودار (شکل ۲). ما همچنین پتانسیل زتا را برای ترکیب سنتز شده گزارش می‌کنیم (شکل ۳). در تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM تایید (شکل ۴) این تصویر نشان می‌دهد که لیپید نانوذرات حاوی یک اسانس کروی مصنوعی هستند و به خوبی پراکنده می‌شوند. پس زمینه روشن اطراف نانوذرات کروی مربوط به حلال است. این تضاد به دلیل تفاوت در ویسکوزیته است نانوذرات سنتز شده و حلال مورد استفاده رهاسازی دارو با توجه به نمودار، مشاهده شد که فاز لیپیدی نانو استتارات و سورفکتانت گلیسرول در محدوده ۸۰ آزادسازی بالاتری نسبت به فاز لیپیدی گلیسرول مونو استتارات و سورفکتانت اسپان ۶۰ داشت. RA-SLN فرمولاسیون ۴۷ درصد اسانس را در ۲ ساعت اول و ۵۴ درصد اسانس را در ۲۴ ساعت اول آزاد کرد. در حالی که در فرمولاسیون RA-SLN4 39

گروه چهارم (HEK-293 + ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر نانو حاوی اسانس).

تعیین مقادیر IC50 سنجش MTT: در این آزمون مبنای سنجش، قرار دادن سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلف اسانس و سنجش تعداد سلول‌های مرده بود. بدین منظور از ماده موثر زرد رنگ تترازولیوم و ایجاد کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول فورمازان در روش MTT استفاده شد. در این روش، ۲۴ ساعت پس از کشت سلول‌ها با غلظت مورد نظر، محیط کشت رویی سلول‌ها تعویض شده و سلول‌ها به مدت ۳ ساعت به همراه محیط کشت حاوی رنگ تترازولیوم کشت داده شدند. در ادامه، محیط با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفیدکسید ترکیب شده و میزان و شدت جذب وری با استفاده از الیزا ریدر با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

تست فلوسایتومتری: برای اندازه‌گیری میزان مهار رشد سلولی، از روش فلوسایتومتری استفاده شد. به این صورت که سلول‌ها پس از تیمارهای مربوطه، تریپسینه شده، سپس آنها را در دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ کرده و دوباره این کار با ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات انجام شد. بعد از سانتریفیوژ مجدد، یک میلی‌لیتر از بافر مخصوص کیت اضافه نموده و بعد از پیتاژ شدید، ۵ میکرولیتر از انکسین وی اضافه نموده و ۱۵ دقیقه در محیط تاریک انکوبه شد. در پایان هم ۴ میکرولیتر محلول پروپیدوم یدید اضافه کرده و با دستگاه فلوسایتومتری آنالیز صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۶ و روش t-test استفاده شد و معناداری نتایج در سطح $p < 0/05$ سنجیده شد. بعد از انجام واکنش Real PCR Time، داده‌های دستگاه در فرمول‌های مربوطه محاسبه شد و مقادیر $2-\Delta\Delta Ct$ با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون Tukey و One Way ANOVA مورد بررسی قرار گرفت.

درصد در ۲ ساعت اول و در ۵۰ درصد در ۲۴ ساعت آزاد شد. همچنین مشخص می‌شود که آزاد شدن اسانس کمتر از فرمولاسیون است. بنابراین، لیپید نانوحامل‌ها سرعت آزادسازی اسانس را نسبت به اسانس خالص افزایش دادند. جدول ۱ خواص فیزیکوشیمیایی نانوذرات حاوی استخراج درمنه (درصد وزنی/وزن). فرمولاسیون سه بار تکرار شد و جدول با استاندارد گزارش شد. آزمایش MTT ویسکوزیته ۰،۱، ۰،۲۵، ۰،۵۰، ۱۰۰ میلی مولار عصاره گیاه درمنه را نشان می‌دهد. بعد از ۲۴ ساعت همانطور که با افزایش ویسکوزیته اسانس، قابلیت زنده ماندن SKOV-3 و EK-293 مشاهده می‌شود. رده های سلولی کاهش یافته و نتایج نشان داد که کمترین میزان زنده‌مانی در سلول‌های سرطانی SKOV-3 مشاهده شد. در ۱۰۰ میلی‌مولار و در سلول‌های نرمال در ۱۰۰ میلی‌مولار اسانس به دست آمد. بالاترین قابلیت زنده ماندن SKOV-3 و رده‌های سلولی HEK-293 در ویسکوزیته اسانس ۰ و ۱ میلی‌مولار به دست آمد. با توجه به نتایج، ۵۰ درصد مرگ سلولی برای SKOV-3، رده‌های سلولی سرطانی، در ویسکوزیته سلولی ۱۰۰ میلی‌مولار و برای HEK-293، IC50 در ویسکوزیته ۱۰۰ میلی‌مولار گزارش شده است. در IC50 زیر ویسکوزیته اسانس درمنه و همچنین نانوذرات حاوی استخراج درمنه به طور معنی‌داری آپوپتوز را نسبت به شاهد افزایش داد ($p < 0/001$). همچنین نتایج نشان دهنده افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطانی SKOV-3 بود. به عبارت دیگر تیمار نانوذرات با عصاره گیاه درمنه به طور قابل توجهی آپوپتوز را افزایش داد ($p < 0/001$). نانوذرات حاوی اسانس درمنه باعث آپوپتوز بیشتر در SKOV-3 و سلول‌های رده HEK-293 نسبت به گروه اسانس درمنه می‌شوند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نانو ذرات درمنه یکی از داروهای ضد سرطان است و

مکانیسم سیتوتوکسیک نانوذرات حاوی درمنه باعث افزایش آپوپتوز سرطان می‌شود. لازم به ذکر است که درصد سلول‌های آپوپتوز در سلول‌های لاین SKOV-3 و HEK-293 نسبت به گروه کنترل به طور قابل توجهی افزایش یافت

تجزیه و تحلیل نتایج مولکولی: نتایج ارزیابی مولکول‌های RNA استخراج شده توسط اسپکتروفتومتر، روی هم نشان داد که نسبت OD 260/280 تمام نمونه‌های استخراج شده حدود ۱/۹۲ تا ۱/۹۷ بود که نشان دهنده کیفیت خوب استخراج است. همچنین ارزیابی مولکول RNA استخراج شده با روش الکتروفورز ژل حدود ۱ میکروگرم از نمونه با الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. باندهای ۱۸ و ۲۸ مرتبط با RNA ریبوزومی به عنوان شاخص کیفیت RNA استخراج شده در نظر گرفته شد که نتایج حاصل شده نشان داد که خالص‌سازی مولکول RNA برای ادامه این روش کیفیت خوبی دارد. همچنین سنتز DNA برای یک واکنش زنجیره ای پلیمرز، با استفاده از BAX و BCL2 و ژن اکتین FxR انجام شد و آغازگرها پس از پایان واکنش تکثیر، ۵ میکرولیتر از نمونه مجدداً در ژل آگارز ۲ درصد معلق شدند. ارزیابی کیفیت cDNA سنتز شده نتایج تجزیه و تحلیل سنتز cDNA نشان داد که کیفیت استخراج بالا است. همچنین کیفیت سنتز شده برای واکنش های Real-Time PCR مناسب است. برای انجام واکنش پلیمرز در دستگاه Real-Time PCR ابتدا ویسکوزیته فوروارد و آغازگرهای معکوس بهینه شدند. مقادیر آغازگرها پس از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای کنترل ژن‌های β -اکتین، Bax و BCL2 مشخص شد. منحنی ذوب واحد نشان‌دهنده عدم وجود محصول غیراختصاصی است. پس از واکنش Real-Time، داده‌های دستگاه در فرمول‌های مربوطه محاسبه و مقادیر آن محاسبه شد. با استفاده از نرم‌افزار

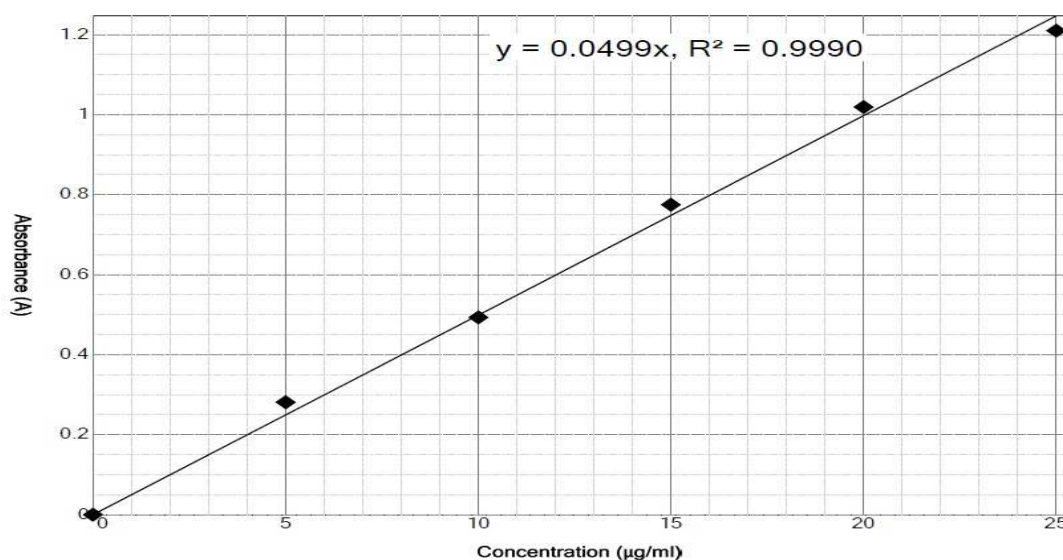
SPSS، آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه Turkey و آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد. سطح بیان Bax و Bcl2، نشان داد که ژن‌ها در مقایسه با ژن مرجع داخلی GAPDH افزایش یافته است. بیان ژن BAX در مقایسه با β -اکتین داخلی حدود ۲٫۶ افزایش یافته است (ژن کنترل)، اما بیان ژن BCL2 در مقایسه با کنترل داخلی حدود ۱٫۷ افزایش داشت. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که اسانس حاوی نانوذرات لیپیدی بیان BAX و BCL2 را افزایش می‌دهد. درواقع نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس مسیر آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی تخمدان فعال کرده و متعاقباً باعث ایجاد رشد تومور متوقف شود.

جدول ۱- خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانو ذرات حاوی اسانس درمنه (% وزنی/وزنی) هر فرمولاسیون سه بار تکرار

Table 1 Physicochemical properties of Nanoparticles containing *Artemisia* extraction (weight percent/ weight)

Formula	Size (nm)	PDI	ZP (mv)	EE%
AR-SLN1	329.73±21.64	0.291±0.015	-14.96±0.75	45.60±1.52
AR-SLN2	352.8±13.95	0.335±0.061	-9.86±2.034	51.12±0.62
AR-SLN3	156.97±7.15	0.388±0.004	-27.67±1.89	59.02±0.74
AR-SLN4	176.33±19.44	0.424±0.009	-24.93±0.55	58.90±0.20
AR-SLN5	268.2±7.84	0.230±0.009	-19.3±1.04	54.46±3.93
AR-SLN6	392.13±28.79	0.274±0.06	-3.18±1.11	59.47±0.47
AR-SLN7	198.53±22.55	0.322±0.045	-21.8±2.43	56.96±2.47
AR-SLN8	303.03±8.25	0.259±0.018	-11.37±5.74	52.69±0.93

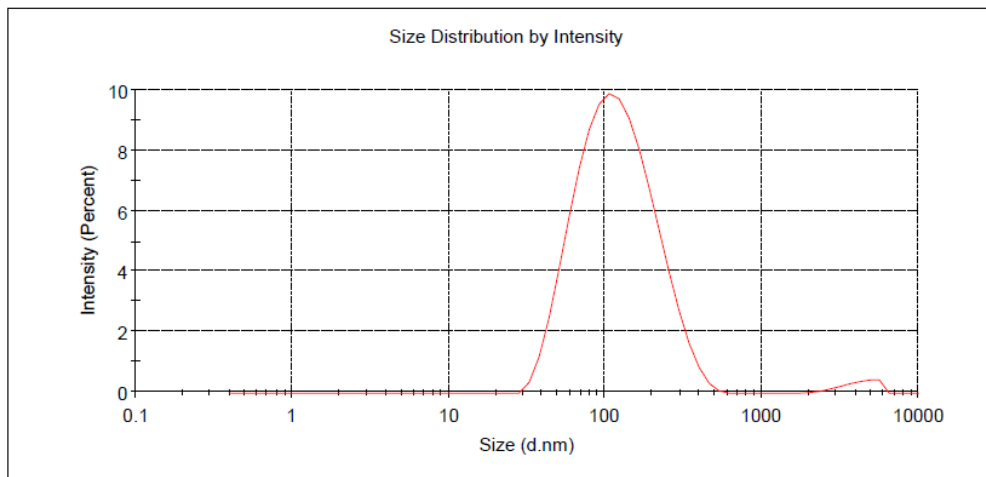
AR: Artemisia; Col: cholesterol; BW: bees wax; GMS; glycerol monostearate; SA: stearic acid; PA: palmitic acid; T 20: tween 20; Sp60: span60; PDI: polydispersity index; ZP: zeta potential; EE: entrapment efficiency



شکل ۱- منحنی استاندارد اسانس درمنه در طول موج ۲۷۴ نانومتر

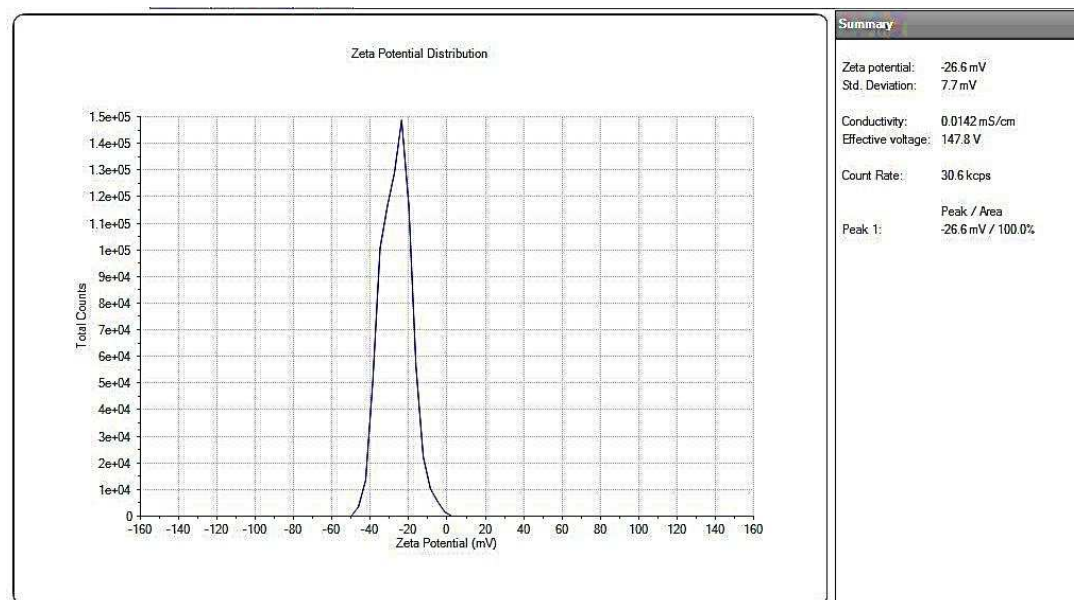
Fig. 1. Standard curve of Artemisia extraction at 274 nm of wavelength

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 113.20	Peak 1: 104.5	98.0	75.33
Pdl: 0.216	Peak 2: 4244	2.0	988.8
Intercept: 0.917	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



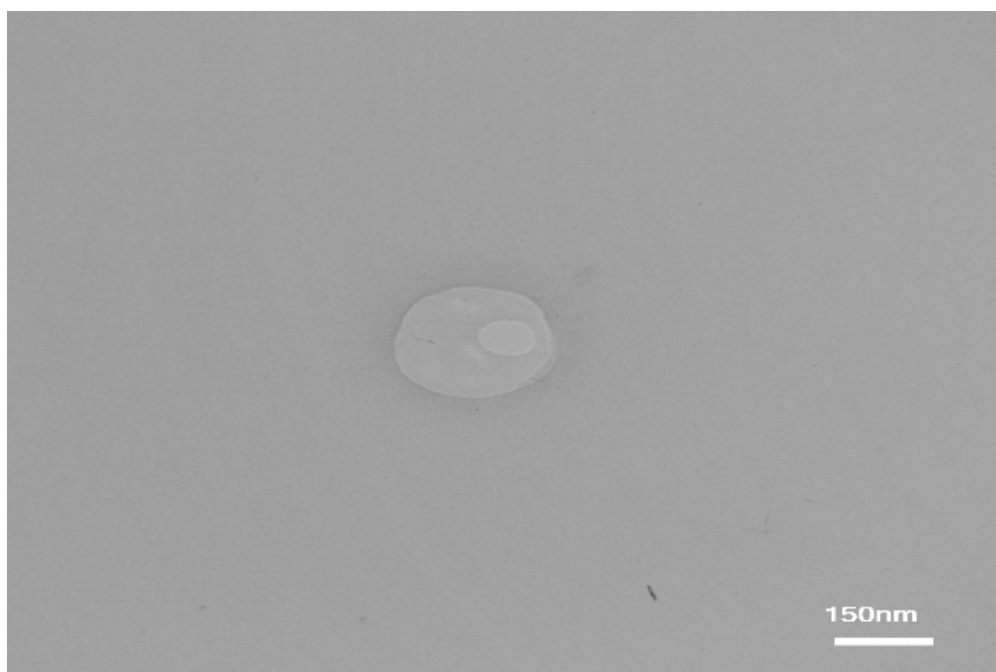
شکل ۲- نمونه‌ای از طیف حاصل از تعیین اندازه ذره‌ای و شاخص پراکندگی در فرمولاسیون AR-SLN3

Fig. 2. An example of the spectrum obtained from particle size determination and dispersion index in the ARSLN3 formulation



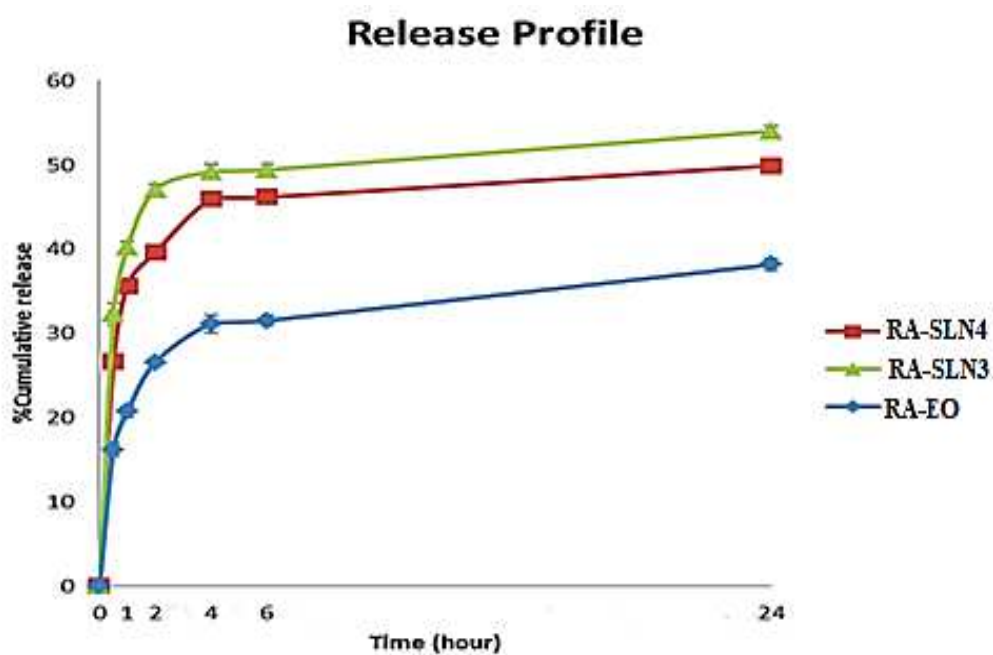
شکل ۳- نمونه‌ای از پتانسیل زتا در فرمولاسیون AR-SLN3

Fig. 3. An example of zeta potential in the AR-SLN3 formulation



شکل ۴- عکس TEM مربوط به SLN حاوی اسانس درمنه

Fig. 4. TEM image of SLN containing spherical Artemisia extraction



شکل ۵- نمودار مقایسه‌ای آزادسازی شاهد، فرمولاسیون RA-SLN3 و RA-SLN4 در محیط بافر pH = 7.4

Fig. 5. Comparative graph of control release, RA-SLN4 and RA-SLN3 formulation in buffer environment PH=7.4

بحث

با توجه به اهمیت سرطان تخمدان و پتانسیل آنتی-اکسیدانی درمنه، این مطالعه با هدف بررسی اثرات سلولی، مولکولی و ضدآپوپتوز اسانس بر روی نانوذرات لیپیدی در سلول‌های سرطانی تخمدان می‌باشد. ترکیبات اصلی نانوذرات لیپیدی شامل لیپید جامد، سورفکتانت‌ها و آب بود. انتخاب مناسب چربی‌ها، سورفکتانت‌ها، ترکیبات و مقادیر آنها می‌تواند بر اندازه ذرات، پایداری ذخیره‌سازی طولانی مدت، بارگیری دارو و آزاد سازی دارو مؤثر می‌باشد. این بدان معناست که هر دارو به فرمول خاصی برای SLN نیاز دارد (۱۶، ۱۷). مطالعه قبلی روی اسانس درمنه وجود آلفا پینن، بتا - پینن، D ژرماکرن و لیمونن، گزارش شد که از رشد سلول‌های سرطانی سینه، کبد و ملانوم انسان جلوگیری می‌کند. جوپاتولین همچنین یکی از القاء کننده‌های آپوپتوز در سلول‌های HL-60 و سرطان معده است (۱۸). SLN‌ها از یک یا مخلوطی از لیپیدها ساخته شده اند که در دمای محیط و دمای بدن جامد هستند. نوع و مقدار لیپیدها بر اندازه ذرات نانوذرات تأثیر می‌گذارد. هر لیپید دارای چندین ترکیب شیمیایی است (۱۹). مقدار ویسکوزیته لیپید مورد استفاده نانوذرات می‌تواند متفاوت از ۲ تا ۸ درصد مقدار لیپید مورد استفاده بستگی به تکنیک تولید نانوذرات دارد. مطالعات نشان داده‌اند که افزایش ویسکوزیته لیپید با افزایش ورود دارو به داخل بدن همراه است. از طرف دیگر، افزایش محتوای لیپید باعث افزایش اندازه ذرات می‌شود (۲۰). در این مطالعه، محتوای لیپید چهار بار استفاده شد و به دلیل مقدار کم اسانس استخراج شده گیاه تنها چهار فرمول با استفاده از دو نوع لیپید و دو نوع سورفکتانت تهیه شد. سپس تفاوت نوع لیپید و سورفکتانت به عنوان عامل مؤثر بر نانوذرات تهیه شده پارامترهایی مانند اندازه ذرات و توزیع مورد

بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه آکروت و همکاران وی نشان داد که عصاره متانولی تهیه شده از قسمت‌های مختلف درمنه وحشی دارای خواص سیتوتوکسیک بر سلول‌های می‌باشد (۲۱). در یک مطالعه مشابه، گوردانیان و همکارانش گزارش کردند که سمیت در قسمت‌های هوایی درمنه نسبت به سایر اندام‌ها بالاتر است. علت آن را تجمع مواد آنتی-اکسیدانی در سر شاخه‌های هوایی گزارش کرده‌اند، نوع و مقدار سورفکتانت مهم‌ترین عامل مؤثر بر کیفیت نانو ذرات است. استفاده نامطلوب و کم از سورفکتانت‌ها نه تنها باعث افزایش اندازه ذرات می‌شود گاهی موجب عدم ایجاد نانوذره می‌شود (۲۲)، (۲۳). سورفکتانت‌های مختلف توزیع متفاوتی بر روی سطح نانوذرات دارند. استفاده از چندین سورفکتانت برای دستیابی به اندازه و پایداری ذرات بهینه است (۲۴). تحقیقات نشان داده است که استفاده از سورفکتانت با لیپوفیل HLB در کنار سورفکتانت با HLB هیدروفیل پتانسیل زتا را افزایش می‌دهد و در نتیجه پایداری را افزایش می‌دهد. به همین دلیل، در این مطالعه ترکیب دو سورفکتانت Twin 80 با HLB Hydrophilic و Span 60 با HLB ۴/۳ استفاده شد. از سوی دیگر، مطالعات نشان داده است که با افزایش سورفکتانت با هیپوفیلیک HLB، اندازه ذرات افزایش می‌یابد، یکی از مزایای Real-Time PCR ترسیم منحنی ذوب است که پس از PCR تکمیل شد. نتایج حاصل از اثرات سلولی اسانس نانوذرات لیپیدی بر سلول‌های سرطانی تخمدان نشان داد که افزایش ویسکوزیته نانوذرات لیپیدی حاوی درمنه باعث کاهش بقا می‌شود. سلول‌های هلا نتایج ما با یافته‌های اصغری و همکاران (۱۳۹۱) که در مطالعه آنها انجام شده، مطابقت دارد. در بررسی اثر عصاره متانولی درمنه نشان دادند که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی

6. Moore RG, Brown AK, Miller MC, Skates S, Allard WJ, Verch T et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol*. 2008; 108:402-408.

7. Bookman MA. First-line chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Clin Obstet Gynecol*. 2012;55:96-113.

8. Ehsanfar P, Teimouri M, Pooladi M. Investigating characterizations and antifungal effects of solid lipid nanoparticles (SLNs) loaded with essential oil of *Citrus aurantifolia* on isolated *Malassezia* strains. *Arch Adv Biosci*. 2020;11:43-55.

9. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *Cancer J Clin*. 2019;69:7-34.

10. Wang CZ, Calway T, Yuan CS. Herbal medicines as adjuvants for cancer therapeutics. *Am J Chin Med*. 2012;40:657-669.

11. Salimifar M, Fatehi-Hassanabad Z, Fatehi M. A review on natural products for controlling type 2 diabetes with an emphasis on their mechanisms of actions. *Curr Diabetes Rev*. 2013;9:402-411.

12. Jafariparizi M, Afsharzadeh S, Akkafi HR, Abbasi S. Floristic study of *Artemisia aucheri* Boiss. rangelands in Isfahan Province, Iran. *Nova Biologica Reperta* 2017;4:236-245.

13. Bora KS, Sharma A. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. *Pharm Biol*. 2011;49:101-109.

14. Lai F, Sinico C, De Logu A, Zaru M, Müller RH, Fadda AM. SLN as a topical delivery system for *Artemisia arborescens* essential oil: in vitro antiviral activity and skin permeation study. *Int J Nanomed*. 2007; 2:419.

15. Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the

است و خواص کشنده سلولی و پتانسیل استفاده در درمان سرطان را دارد. آنها همچنین نشان دادند که با افزایش ویسکوزیته عصاره درمنه باعث کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطانی وابسته به دوز شد. (۲۶) به طور مشابه، قره ماتروسیان و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که عصاره متانولی درمنه توانایی مهار رشد سلولی به روشی وابسته به غلظت را دارا می‌باشد (۲۶).

نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج مطالعه نشان داد که نانوذرات لیپیدی حاوی عصاره گیاه آرتمیسیا، مسیر آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی تخمدان فعال کرده و در نتیجه باعث توقف رشد تومور شد.

منابع

1. Pooladi M, Abad SK, Hashemi M. Proteomics analysis of human brain glial cell proteome by 2D gel. *Indian J Cancer*. 2014;51:159.
2. Teimouri M, Pooladi M. Anti-angiogenic and anti-proliferative effects of physalis alkekengi hydroalcoholic extract on breast cancer in mice. *J Fasa Univ of Med Sci*. 2021;10:3684-3691.
3. Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, Li Y. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem J*. 2012; 441:61-76.
4. Ebrahimi M, Teimouri M, Pooladi M. The synergistic anticancer traits of graphene oxide plus doxorubicin against BT474 and MCF7 breast cancer stem cells in vitro. *Appl Biochem Biotechnol*. 2021;2021:1-6.
5. Teimouri M, Odoumizadeh M. Cytotoxicity of *Artemisia vulgaris* essential oil encapsulated in SLN on breast cancer cell line (MCF7). *Arch Adv Biosci*. 2021;12:11-26.

cytotoxic activity of flower, leaf, stem and root extracts of five *Artemisia* species. Res Pharm Sci. 2014; 9:91.

23. Emami SA, Rabe SZ, Ahi A, Mahmoudi M, Tabasi N. Study the cytotoxic and pro-apoptotic activity of *Artemisia annua* extracts. Pharmacol Online. 2009; 3:1062-1069.

24. Mahmoudi M, Rabe SZ, Ahi A, Emami SA. Evaluation of the cytotoxic activity of different *Artemisia khorassanica* samples on cancer cell lines. Pharmacol Online. 2009; 2:778-786

25. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques. 2005;39:75-85.

26. Asghari G, Jalali M, Sadoughi E. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from the seeds of *Artemisia aucheri* Boiss. Jundishapur J Nat Pharm Prod. 2012;7:11.

27. Gharehmatrossian S, Popov YU, Ghorbanli M, Safaeian S. Antioxidant activities and cytotoxic effects of whole plant and isolated culture of *Artemisia aucheri* Boiss. Asian J Pharm Clin Res. 2012;5:95-98.

art. Eur J Pharma Biopharm. 2000;50:161-177.

16. Mukherjee S, Ray S, Thakur RS. Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. Indian J Pharm Sci. 2009; 71:349.

17. Teoh DG, Secord AA. Antiangiogenic therapies in epithelial ovarian cancer. Cancer Control. 2011; 18:31-43.

18. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. Trends Biochem Sci. 2000; 25:502-508.

19. Bobrowski K. Free radicals in chemistry, biology and medicine: contribution of radiation chemistry. Nukleonika. 2005; 50:67-76.

20. Lingayat VJ, Zarekar NS, Shendge RS. Solid lipid nanoparticles: a review. Nanosci Nanotechnol Res. 2017;2:67-72.

21. Akrouit A, Chemli R, Chreïf I, Hammami M. Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. Flavour Fragr J. 2000;16:337-339.

22. Gordanian B, Behbahani M, Carapetian J, Fazilati M. In vitro evaluation of