سنتزو ارزیابی نانو حامل لیپوزومی حاوی عصاره خار مریم به‌منظور اثر گذاری روی سرطان کبد

مجتبی انصاری[1*]، مهدی عشقان ملک[2]، بی بی فاطمه حقیرالسادات[3]

1- دانشیار گروه مهندسی پزشکی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه میبد، میبد، ایران

2-کارشناسی مهندس پزشکی ، گروه مهندسی پزشکی، دانشگاه علم و هنر، یزد، ایران

3- دکتری نانوبیوتکنولوژی، گروه علوم و فنون نوین، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

*نویسنده مسئول: ansari@meybod.ac.ir

دریافت: 1399/10/21 پذیرش: 1400/2/21

چکیده:

مقدمه: امروزه استفاده از گیاهان دارویی در درمان سرطان به دلیل عوارض جانبی کمتر، مورد توجه قرارگرفته است.خار مریم گیاهی دارویی از تیره کاسنی است که در درمان بیماری‌های کبدی و کیسه صفرا، سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی و ... مؤثر است. کپسوله کردن مواد فعال زیستی در نانو لیپوزوم رویکردی عملی و کارامد برای تنظیم رهایش دارو، افزایش پایداری، محافظت از آنها دربرابر واکنش با محیط، کاهش فراریت و افزایش میزان تأثیر آن است. هدف از این پژوهش کپسوله کردن عصاره خارمریم درون لیپوزوم و ارزیابی فیزیکوشیمیایی آن با هدف اثرگذاری بر سلول‌های سرطان کبد است.

روش بررسی: در این پژوهش عصاره خار مریم با روش سوکسله استخراج شد و نانوذرات لیپوزومی با روش آب پوشانی لایه نازک سنتز گردید و عصاره خار مریم در آن بارگذاری شد. درنهایت نانوذرات ساخته شده از نظر راندمان بارگذاری، رهایش عصاره از لیپوزوم و شاخصه‌های فیزیکوشیمیایی همچون اندازه، پتانسیل زتا، مورفولوژی،طیف مادون قرمز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نانولیپوزوم حاوی عصاره خار مریم دارای بازده انکپسولاسیون 63/37 % و اندازه 122 nm، پتانسیل زتا13/1- میلی ولت و شاخص پراکندگی0/197 می باشد.رهایش عصاره خار مریم از نانولیپوزوم به صورت آهسته و کنترل شده است . هیچ برهمکنش شیمیایی بین عصاره و لیپوزوم وجود ندارد و از نظر مورفولوژی همگن و دارای ساختار کروی می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که می‌توان عصاره خارمریم را با اندازه و کارایی مناسب به شکل نانولیپوزوم کپسوله کرد. بنابراین لیپوزوم حامل مناسبی برای عصاره خار مریم محسوب می‌شود.

کلیدواژگان: سرطان، عصاره خار مریم، گیاهان دارویی، نانو لیپوزوم

مقدمه

بیماری سرطان بیماری کشنده است که 13 درصد از مرگ و میر سالانه در جهان را به خود اختصاص می دهد(1) سالانه بیش از 10 میلیون نفردر جهان به این بیماری دچار می‌شوند (2). سرطان کبد یکی ازسرطان‌های شایع و کشنده در جهان است و جزء ششمین سرطان فراگیر جهان به شمار می‌رود. این سرطان در مراحل پیشرفته شناسایی می‌شود به همین دلیل چهارمین سرطان کشنده در جهان به شمار می‌رود (3). سرطان کبد در هر دو جنس زن و مرد بروز می‌کند اما در مردان شایع‌تر است و به‌طور معمول در سنین 30 تا 50 سالگی شناسایی می‌شود(4). شیوع این بیماری در ایران کمتر است و سالانه 5 نفر از هر یک میلیون نفر به‌دلیل این بیماری جان خود را از دست می‌دهند (5). تحقیقات نشان می‌دهد که با افزایش سن، احتمال ابتلا به این بیماری افزایش پیدا می‌کند(6). سرطان کبد اغلب به دلیل متاستاز سرطان دیگر یا در نتیجه هپاتیت مزمن B یا C ایجاد می‌شود (7). به‌منظور درمان انواع سرطان از روش‌های متعددی از جمله رادیوتراپی، شیمی درمانی و جراحی استفاده می‌شود (8). در این بین شیمی درمانی به‌عنوان یکی از پرکاربردترین روش‌های درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد. اما این روش درمان با محدودیت‌هایی از قبیل مقاومت دارویی، هدفمند نبودن دارورسانی به بافت هدف و مقاومت دارویی همراه است (9و10). همچنین این روش با عوارض جانبی متعددی از قبیل تاول‌زایی، آلوپسی، عوارض قلبی و غیره برای بیماران مبتلا به سرطان همراه است (11). ترکیبات گیاهی از سالیان بسیار قدیم در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گرفته است و به تازگی بیش از گذشته مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند. استفاده از عصاره‌های گیاهی راه جدیدی را در درمان سرطان‌ها گشوده‌اند، به گونه‌ای که باعث کاهش محدودیت‌های استفاده از شیمی درمانی می‌شود و کارایی درمان را افزایش می‌دهد (12). عصاره خار مریم یکی از گیاهان دارویی است که مورد توجه پژوهشگران نانوپزشکی قرار گرفته است. نام علمی گیاه خار مریم[1] است. این گیاه از تیره کاسنی است. نام‌های دیگر این گیاه ماری تیغال، خار علیص و عکوب[2] است. این گیاه بومی منطقه مدیترانه، شمال آفریقا و جنوب اروپا است (13و14). در ایران این گیاه در مناطق مختلفی می‌روید اما بیشترین پراکندگی آن در نواحی جنوب غرب، غرب، جنوب و شمال و شمال غرب است (15). این گیاه در طب سنتی استفاده‌های زیادی دارد و در درمان بسیاری از بیماری‌ها و مشکلات مورد استفاده قرار می‌گیرد. کاهش کلسترول خون و کاهش چربی خون، ضد حساسیت، ضد قارچ، ضد التهاب، از بین برنده سمیت کبدی، آنتی اکسیدان، ملین و هضم کننده غذا از جمله این موارد است (16-18). تحقیقات متعددی درباره این گیاه نشان می‌دهد که این گیاه در درمان سرطان، بیماری‌های قلبی و کبدی مؤثر است (19-21). در پژوهش‌های مختلف ثابت شده است که خار مریم با خاصیت آنتی‌اکسیدان خود رادیکال‌های آزاد خطرناک اکسیژن را از بین می‌برد و با این کار مانع پراکسیداسیون لیپیدها شده و سبب حفظ و پایداری غشاهای سلولی می‌شود (22و23). خار مریم فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پرکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز و غلظت گلوتاتیون را افزایش می‌دهد و با اعمال این روش‌ها ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال می‌کند (24). این گیاه حاوی گروهی از ترکیبات فلاونوئیدی است که به آن سیلی مارین گفته می‌شود.

---

1. *Silybum marianum*
2. *Milk thistle*

خاصیت دارویی این گیاه به دلیل وجود سیلی مارین در ترکیب خود است (25). سیلی مارین دارای سه ایزومر اصلی به نام‌های سیلی بین، سیلی دیانین و سیلی کریسیتین می‌باشد (26). سیلی مارین موجود در خار مریم باعث تحریک DNA پلی مراز می‌شود و با تحریک آن باعث افزایش سنتز ریبوزومال RNA و در نتیجه افزایش بازسازی سلول‌های کبدی می‌شود. سیلی مارین همچنین باعث مهار چرخه لیپوکسی ژناز و مهار تولید رادیکال آزاد و لوکوترین در سلول‌های کوپفر کبد موش و باعث کاهش التهاب کبدی می‌شود (27). مطالعات آزمایشگاهی نشان دهنده اثرات بازدارنده شیمیایی[3] سیلی مارین و سیلی بینین در سلول‌های سرطانی اپیدرمال، پروستات، پستان موش و حیوان هستند (28). نانوتکنولوژی و نانوفناوری در تلاش هستند که سیستم دارورسانی هدفمند را ایجاد کنند. در سیستم تحویل دارویی هدفمند، دارو به صورت هدفمند در منطقه مورد نظر افزایش پیدا می‌کند و اثر آن بر بافت‌های غیر هدف کاهش می‌یابد و در بافت هدف درمان مؤثرتر، طولانی‌تر و غیرسمی‌تری ایجاد می‌شود (29). استفاده از حاملین دارویی به‌منظور رسانش ترکیبات گیاهی به‌صورت هدفمند به سلول‌های سرطانی و رهایش کنترل شده، افزایش پایداری و حلالیت ترکیبات گیاهی ضروری است. یکی از این حامل‌های دارویی لیپوزوم است. لیپوزوم‌ها وزیکول‌های کروی متشکل از دو لایه فسفولیپیدی هستند و در مرکز آن هسته مایعی قرار دارد. فسفولیپید موجود در لیپوزوم ها به لیپوزوم خاصیت آمفی فیلیکی می‌دهد. با این ویژگی، لیپوزوم‌ها توانایی انتقال و بارگیری ترکیبات هیدروفیل و هیدروفوب را دارد. ترکیبات آب دوست در هسته و ترکیبات آب‌گریز در غشای لیپوزوم بارگیری می‌شوند (30). استفاده از لیپوزوم‌ها دارای مزایای زیادی از قبیل سمیت سلولی پایین، شباهت آن با غشای سلولی و سهولت در تولید آن است (31و32).

باتوجه به مزیت‌های استفاده از گیاهان دارویی و نداشتن عوارض داروهای شیمیایی در این پژوهش سعی کردیم که عصاره خار مریم را برای بیماران سرطانی مورد بررسی قرار دهیم و برای هدفمند بودن دارورسانی از لیپوزوم ها استفاده کردیم. بنابراین پژوهش حاضر با هدف درون پوشانی عصاره خارمریم درنانولیپوزوم‌ها با هدف اثرگذاری بر سرطان کبد انجام شده است.

3. Chemopreventive

مواد و روش ها

پژوهش حاضر نوعی مطالعه آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد مورد استفاده در پژوهش

ابتدا گیاه خار مریم را جمع‌آوری شده است و گونه آن توسط متخصصان گیاه‌شناسی دانشگاه یزد تأیید شد. حلال کلروفرم متعلق به شرکت Merck، فسفولیپید دی پالمیتول فسفاتیدیل کولین(DPPC) و کلسترول متعلق به شرکت Sigma آمریکا و DSPE-mPEG2000(PEG) متعلق به شرکت Merck آلمان تهیه و خریداری شد.

- تهیه گیاه خار مریم و عصاره‌گیری

در ابتدا جنس و گونه گیاه خار مریم از طریق دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی دانشگاه یزد مورد تأیید قرار گرفت. استخراج عصاره توسط روش سوکسله انجام پیدا کرد، به این ترتیب، ابتدا 25 گرم گیاه خار مریم پودر شده درون کارتوش انتقال داده شد و در بخش استخراج کننده دستگاه قرار گرفت. حدود 250 میلی لیتر حلال درون بالن ریخته شد و به مدت 4 تا 5 ساعت تحت دمای 45-50 درجه سانتی‌گراد حرارت دید. سپس نمونه به کمک کاغذ صافی فیلتر شد و عصاره مورد نظر برای انجام مراحل بعدی جمع‌آوری شد.

- رسم نمودار استاندارد عصاره خار مریم در ایزوپروپیل و بافر PBS (Phosphate Buffered Saline)

به‌منظور رسم نمودار کالیبراسیون، ابتدا سری رقت‌های مختلف (500،250،125،62,5،31,25،µg/ml) عصاره خار مریم در حلال ایزوپروپیل تهیه گردید. سپس به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب هریک از رقت‌ها در طول موج ماکزیمم 310 نانومتر اندازه‌گیری شد. همچنین سری رقت‌های مختلف عصاره خار مریم در حلال PBS نیز تهیه گردید و با دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب رقت‌ها اندازه‌گیری شد. سپس با استفاده از طول موج‌های جذبی به‌دست آمده، نمودار استاندارد عصاره خار مریم در ایزوپروپیل وPBS رسم شد.

- ساخت نانو لیپوزوم حاوی عصاره خار مریم

نانولیپوزوم حاوی عصاره خار مریم به روش آب پوشانی لایه نازک و با ترکیبی شامل کلسترول، فسفولیپید دی پالمیتول فسفاتیدیل کولین و DSPE-mPEG2000 تهیه شد. در این مرحله ابتدا فسفولیپید DPPC و کلسترول و PEG درحلال کلروفرم حل شد. سپس کلروفرم موجود فاز آلی حاصل توسط پمپ خلاً در دمای 45 سانتی‌گراد حذف و فیلم نازک لیپیدی تشکیل شد. بعد از تبخیر کامل کلروفرم، فیلم نازک لیپیدی بر دیواره بالن تشکیل شد. سپس عمل هیدراته کردن با افزودن بافر PBS به همراه عصاره خارمریم طی مدت 45 دقیقه و در دمای 50 درجه سانتی‌گراد انجامو در انتها نانوذرات سنتز شده توسط سونیکیت حمامی کاهش سایز داده شد.

- تعیین درصد بارگذاری عصاره در نانو لیپوزوم

در این مرحله نانو لیپوزوم‌های حاوی عصاره پس از اینکه کاهش سایز داده شدند، به کیسه دیالیز منتقل گردید و به مدت یک ساعت در دمای یخچال دیالیز انجام شد تا عصاره‌هایی که در سامانه لیپوزومی قرار نگرفته‌اند حذف شوند. به‌منظور بررسی میزان بارگذاری دارو در نانولیپوزوم، لیپوزوم‌های ساخته شده با نسبت حجمی 20:1 با ایزوپروپیل مخلوط شد تا دیواره لیپیدی اطراف دارو شکسته شود و عصاره رها شود. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج ماکزیمم 310نانومتر، میزان عصاره خارمریم انکپسوله شده محاسبه شد. درنهایت با استفاده از نمودار استاندارد عصاره خار مریم در ایزوپروپیل و رابطه (1) میزان انباشتگی دارو به‌دست آمد.

100 × کل عصاره خار مریم استفاده شده / مقدار عصاره خار مریم محصور شده = بازده درون گیری رابطه(1)

- بررسی روند رهایش عصاره خار مریم از نانولیپوزوم

بررسی روند رهایش عصاره خار مریم از سامانه لیپوزومی با استفاده از روش کیسه دیالیز صورت گرفت. در این روش 1سی سی از لیپوزوم حاوی داروی خار مریم در کیسه دیالیز12 کیلودالتونی ریخته شد و در مجاورت10سی سی بافرPBS در شرایط مشابه سلول نرمال (دمای ^{oC} 37 و PH= 7/4) قرار گرفت و در فواصل زمانی مشخص نمونه‌برداری از محیط اطراف کیسه دیالیز انجام گرفت و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و با استفاده از معادله کالیبراسیون خار مریم در PBS، نمودار رهایش عصاره از لیپوزوم رسم گردید.

- تعیین اندازه ذرات و پتانسیل زتا نانولیپوزوم

پتانسیل زتا و بار سطحی نانو لیپوزوم‌ها حامل عصاره خار مریم، اندازه ذرات و توزیع پراکندگی[4] آنها با استفاده از دستگاه زتا سایزر شرکت Malvern Instruments مدل Nano-ZetaSizer ES در دمای ^{oC} 25 و زاویه °90 اندازه-گیری گردید.

- آنالیز نانو لیپوزوم سنتز شده توسط دستگاه طیف سنجی مادون قرمز

به‌منظور بررسی برهمکنش‌های احتمالی میان سامانه لیپوزومی و عصاره از طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) استفاده شد. برای اطمینان از نبود داروی آزاد و مواد اضافی در نمونه نانو لیپوزوم، از نمونه دیالیز شده نانو لیپوزوم‌ها، استفاده گردید و به‌منظور کاهش رطوبت، حدود نیم ساعت نمونه در آون با دمای تقریبی ^{oC} 60 قرار داده شد. مراحل آماده‌سازی نمونه شامل مخلوط کردن نمونه با برومید پتاسیم (KBr) در نسبت 1:10 و فشرده سازی نمونه‌ها به شکل قرص تحت فشار 160کیلونیوتن بود. سپس قرص‌های حاصل برای آنالیز در دستگاه FTIR در محدوده طول موجی $400\text{-}4000cm^{-1}$ مورد مطالعه قرار گرفت.

- مورفولوژی نانو لیپوزوم حاوی عصاره خار مریم

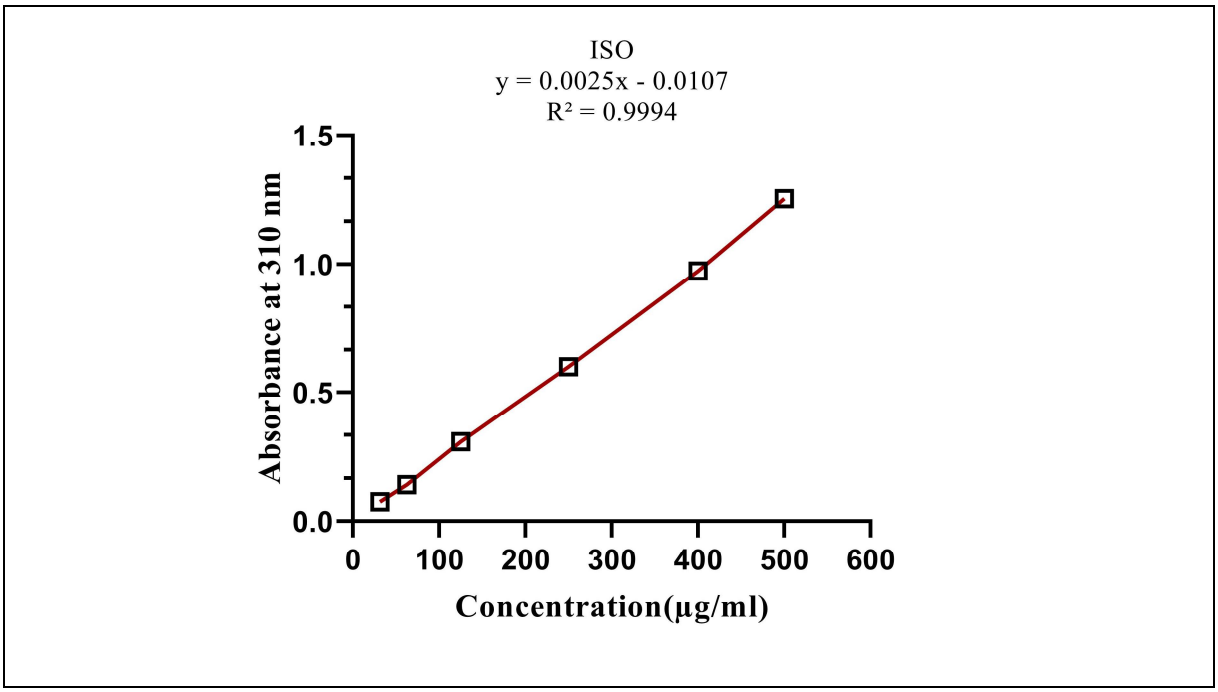
ساختار سطحی نانولیپوزوم حاوی عصاره خار مریم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد بررسی قرار گرفت. حدود 25 میکرولیتر از نمونه لیپوزومی روی لام خشک شد و به‌منظور رسانا شدن با طلا پوشش دار شدند.

4. Polydispersity Index

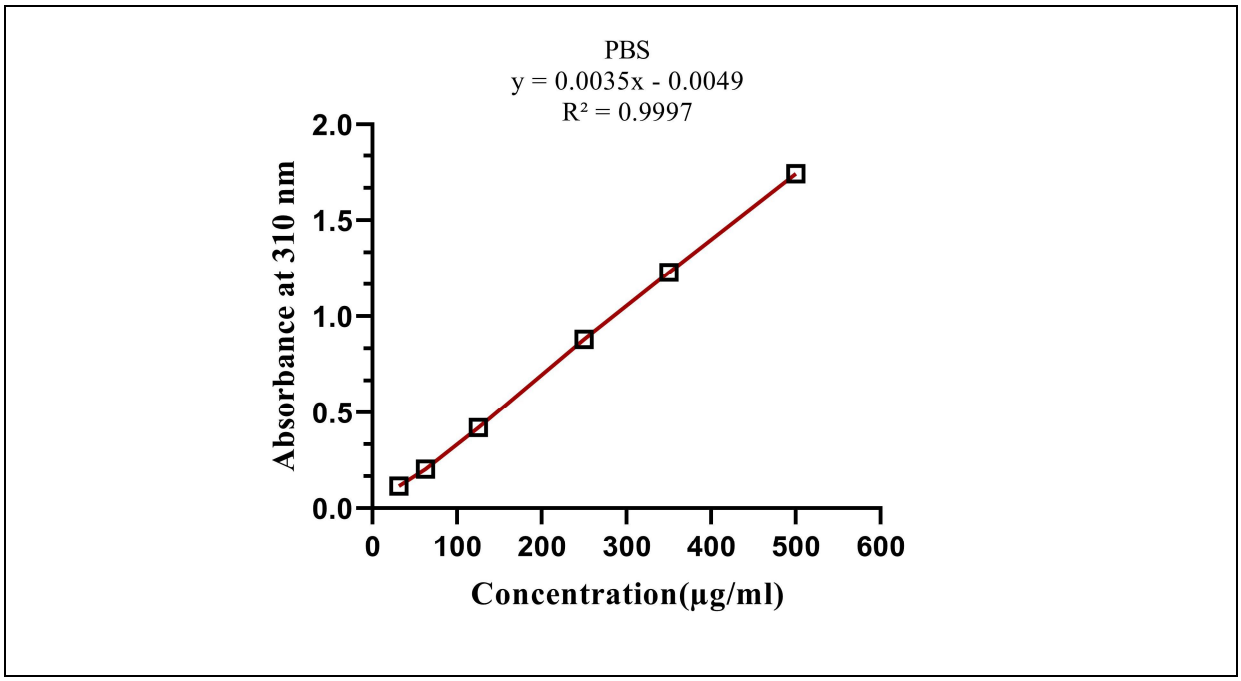
نتایج

بررسی میزان بازده انکپسولاسیون

میزان بارگذاری عصاره خارمریم در نانوحامل لیپوزومی با استفاده از معادله خط نمودار کالیبراسیون عصاره خار مریم در ایزوپروپیل (شکل 1) و رابطه 1، 63/37 درصد محاسبه شد.



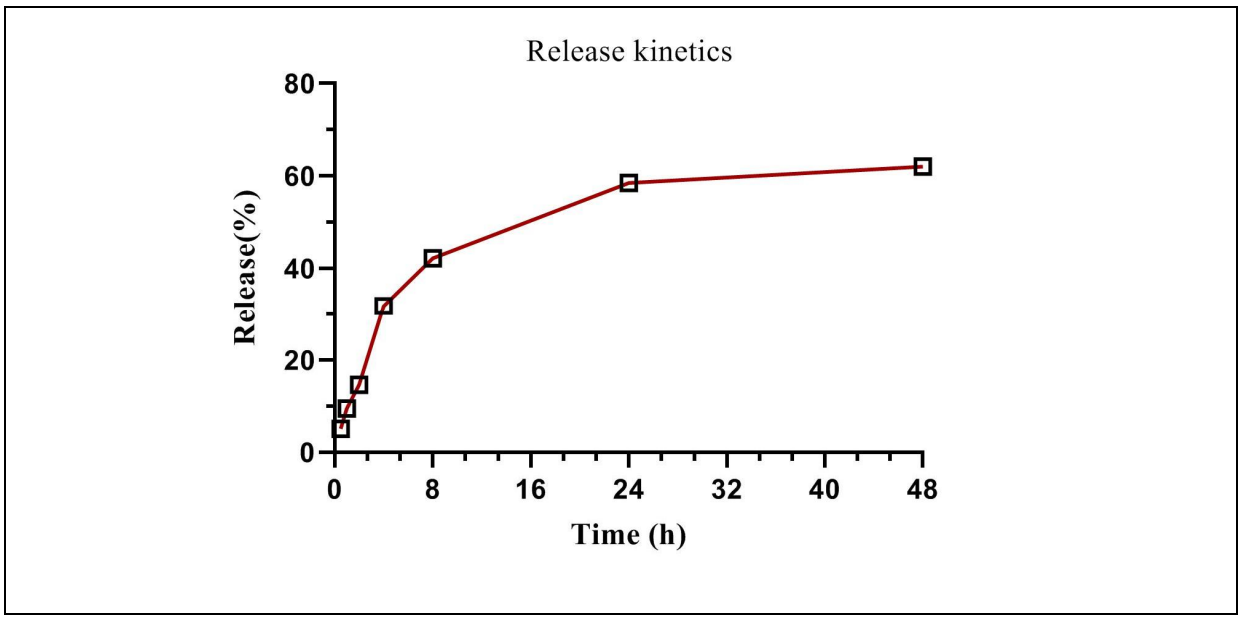
شکل 1- **نمودار استاندارد عصاره خار مریم در ایزوپروپیل**



شکل 2- نمودار استاندارد عصاره خار مریم در بافرفسفات سالین **(PBS)**

بررسی رهایش عصاره خار مریم از نانولیپوزوم

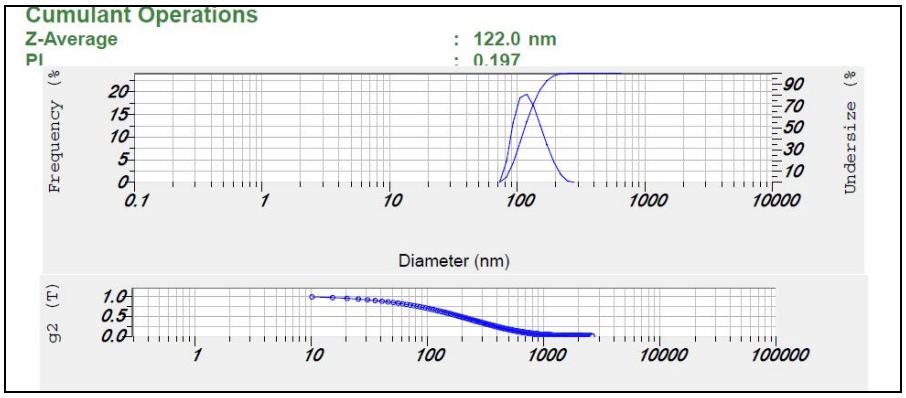
میزان آزادسازی عصاره خار مریم از لیپوزوم به روش کیسه دیالیز و در طی بازه‌های زمانی مختلف و با استفاده از منحنی استاندارد عصاره خار مریم در PBS (شکل 2) محاسبه و الگوی رهایش در شکل 3 نشان داده شد. با توجه به نمودار حداکثر میزان عصاره آزاد شده از لیپوزوم طی 48 ساعت برابر 62 درصد است. براساس پروفایل رهایش، می‌توان نتیجه گرفت آزاد سازی عصاره از نانو حامل دو فازی و آهسته رهش می‌باشد.



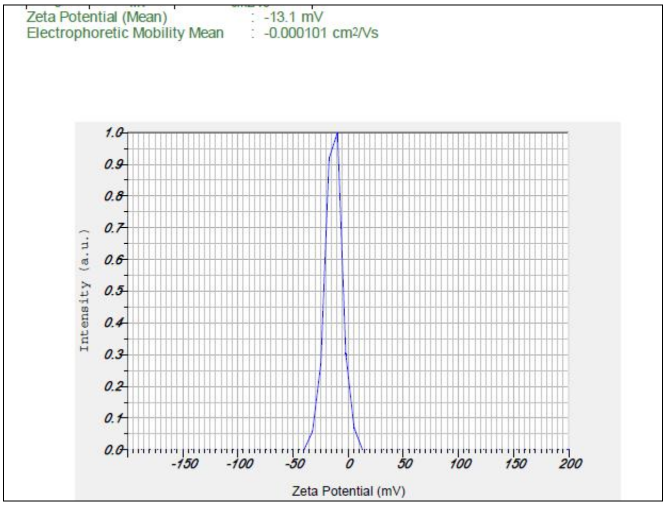
شکل 3- نمودار رهایش داروی عصاره خارمریم از سامانه‌ی لیپوزومی

اندازه، توزیع اندازه و پتانسیل زتا

اندازه و پتانسیل زتا لیپوزوم های درونگیری شده عصاره خار مریم با استفاده از دستگاه نانوسایزر (DLS) اندازه-گیری شد. متوسط اندازه نانوذرات 122 nm و شاخص پراکندگی نانوذرات 0/197 می‌باشد که نشان می‌دهد، ذرات به‌طور یکنواخت پراکنده شده است (شکل 4). میانگین پتانسیل زتا سطح نانولیپوزوم حاوی عصاره خارمریم 13/1- میلی ولت بود که نشان می‌دهد لیپوزوم حاوی عصاره سنتز شده آنیونی می‌باشد (شکل 5).

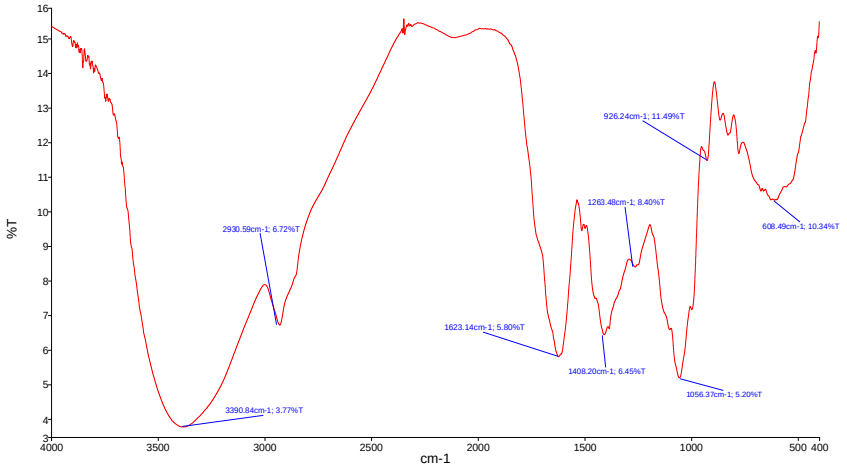


شکل 4- اندازه ذرات و شاخص پراکندگی ذرات برای سامانه‌ی لیپوزومی حاوی خار مریم

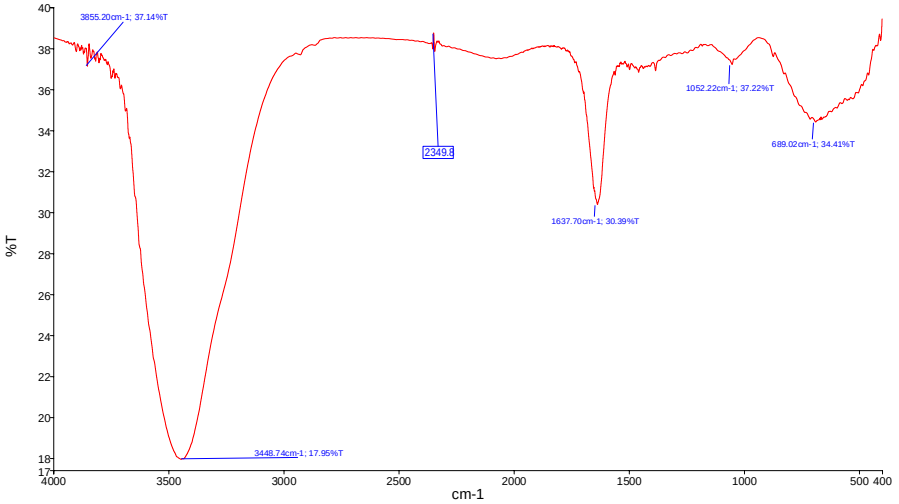


شکل 5- **پتانسیل زتای سامانه لیپوزومی حاوی عصاره خار مریم**

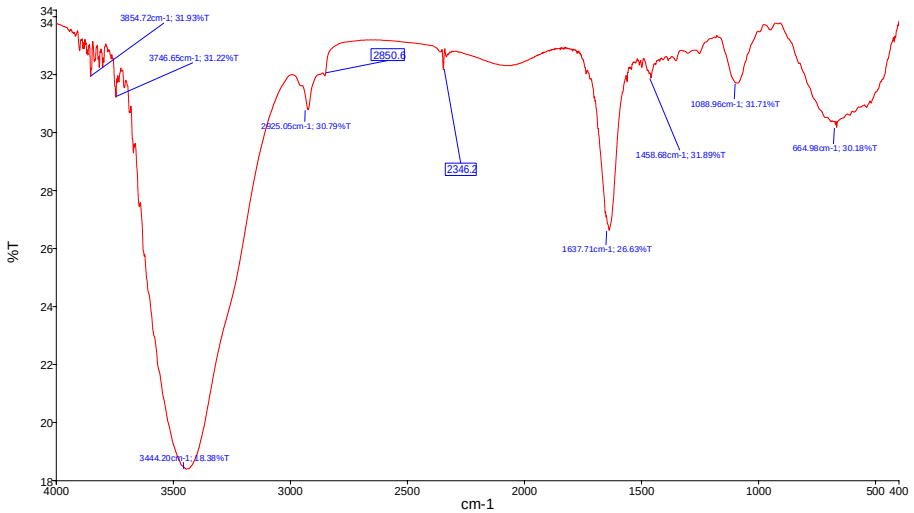
بررسی برهمکنش سامانه لیپوزومی و عصاره خار مریم آنالیز طیف‌سنجی فروسرخ به‌منظور شناسایی گروه‌های عاملی و برهمکنش‌های احتمالی بین ترکیبات و تشخیص انکپسولاسیون عصاره در لیپوزوم مورد بررسی قرار گرفت. با توجه طیف FTIR عصاره خار مریم (شکل 6)، پیک پهن ناحیه cm^{-1} 3390/87 مشخصه گروه OH، cm^{-1} 2930/58 مشخصه ارتعاش کششی CH_3، ارتعاش کششی C=O در عدد موجی cm^{-1} 1623/14، عدد موجی cm^{-1} 1408/20 مشخصه حرکت خمشی CH_3، پیک‌های موجود در ناحیه cm^{-1} 1300-1000 مربوط به گروه C-O، عدد موجی cm^{-1} 928/24 مشخصه P-OR، فرکانس cm^{-1} 608/4 مشخصه گروه عاملی آلکیل هالید برومایید با پیوند کششی R-Br است. در طیف FTIR لیپوزوم فاقد عصاره خار مریم (شکل 7) پیک پهن ناحیه cm^{-1} 3448/74 مشخصه گروه OH، عدد موجی cm^{-1} 1637/70 مشخصه ارتعاش کششی C=O، پیک‌های موجود در ناحیه cm^{-1} 1300-1000مربوط به ارتعاش کششی گروه C-O است که به پیک‌های cm^{-1} 3444/20، 1637/71در طیف لیپوزوم حاوی عصاره (شکل 8) انتقال یافته است که این جابه‌جایی اندک انکپسوله شدن عصاره خارمریم در لیپوزوم را تأیید می‌کند و هیچ پیک اضافه‌ای در سامانه لیپوزومی حاوی عصاره به وجود نیامده و پیکی حذف نشده است که بیانگر این است که هیچ برهمکنش شیمیایی بین سامانه لیپوزومی و عصاره صورت نگرفته است، همچنین حضور عصاره باعث تخریب ساختاری نانوسامانه نگردیده وماهیت و ساختار شیمیایی ترکیبات در نانوحامل حفظ شده است.



شکل 6- طیف FTIR عصاره خار مریم



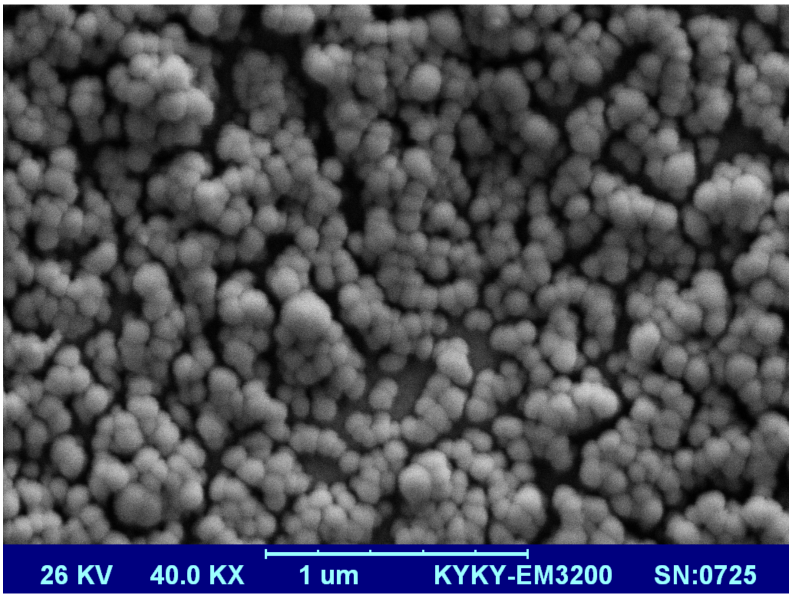
شکل 7- طیف FTIR سامانه لیپوزومی فاقد عصاره خار مریم



شکل 8- طیف FTIR سامانه لیپوزومی حاوی عصاره خار مریم

بررسی مورفولوژی نانولیپوزوم

مورفولوژی نانو لیپوزوم حاوی عصاره خار مریم را با استفاده میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان می دهد. همانگونه که در تصویر مشخص است نانوحامل لیپیدی حاوی عصاره خارمریم دارای مورفولوژی همگن و ساختار کروی هستند و توزیع اندازه مناسب و یکنواختی دارند. (شکل 9)



شکل 9- **تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سامانه لیپوزومی حاوی عصاره خار مریم**

بحث

سرطان یکی از دغدغه‌های اصلی در جوامع پزشکی است. افراد زیادی سالانه با این بیماری دست و پنجه نرم می کنند. سرطان کبد یکی از شایع ترین نوع سرطان در سراسر جهان است به گونه‌ای که ششمین سرطان فراگیر در جهان به شمار می‌رود. به‌منظور درمان این بیماری از روش‌های رادیوتراپی، جراحی و شیمی درمانی استفاده می‌شود. استفاده از شیمی درمانی فراگیرتر از دو روش دیگر است. اما استفاده از آن با محدودیت‌ها و عوارض متعددی همراه است. امروزه سعی می‌شود که از ترکیبات گیاهی برای کاهش عوارض در بیماران استفاده شود. نانوپزشکی در تلاش است که ضمن رساندن دارو به صورت هدفمند عوارض جانبی آن را نیز کاهش دهد. به همین دلیل از نانو حامل‌های لیپوزومی در رسانش دارو استفاده می‌کند. خارمریم گیاهی دارویی است که در طب سنتی کاربرد دارد و به تازگی توجه محققان نانوپزشکی را به خود جلب کرده است. محققان درتلاش هستند تا از این گیاه در درمان سرطان استفاده نمایند. در این پژوهش به سنتز و مشخصه یابی نانوذرات لیپوزومال حاوی عصاره خارمریم به منظور اثرگذاری بر روی سرطان کبد پرداخته شد. در همین راستا میزان بارگذاری عصاره ی خارمریم و الگوی رهایش 48 ساعته ی آن بررسی و ارزیابی شد. فرمولاسیون لیپوزومال خار مریم با درصد بارگذاری 63,37%، همچنین میزان رهایش 62% در دمای 37 درجه تشخیص داده شد. همچنین میزان سایز نانوذرات لیپوزومال 122nm با شارژ سطحی -13.1Mv تشخیص داده شد. در راستای بهینه سازی فرمولاسیون بهینه از DPPC ، کلسترول و پلی اتیلن گلایکول استفاده شد. افزودن کلسترول به غشا های فسفاتیدیل کولین بر دمای انتقال فاز آن نیز مؤثر مباشد. همچنین افزودن غلظت کلسترول قادر است ایجاد دمای انتقال فاز را از بین ببرد، همچنین درصد بالای کلسترول در دماهای کمتر از دمای انتقال فاز، نفوذپذیری غشاء را کاهش داده ولی در دماهای بالاتر از آن افزایش می یابد

(45). استفاده از کلسترول بیش از اندازه نه تنها باعث ثبات بیشتر و افزایش میزان درون گیری و رهایش کنترل شده نمی شود بلکه باعث کاهش میزان بارگذاری و رهایش کنترل شده می شود به عبارت دیگر استفاده از کلسترول یک اثر دوگانه داشته و میزان استفاده از کلسترول در حالت خیلی زیاد و خیلی کم میتواند اثرات منفی بر روی میزان بارگذاری و رهایش دارو از نانوذرات داشته باشد، در چندین تحقیق که بر روی انسان و حیوان انجام شده است سیلی مارین، کبد را در برابر آسیب های ناشی از مواد ایجاد کننده آسیب مانند الکل , گالاکتوز آمین و تتراکلرید کربن محافظت کرده است (35،34،33). در مطالعه ای که بر روی سلولهای سرطانی پستان انجام شد سیلی بینین باعث افزایش اثرات دوکسوروبیسین و سیس پلاتین بر روی سلولهای سرطانی شد (36). در یک تحقیق سیلی مارین به عنوان داروی کمکی به افراد مبتلا به سرطان داده شد. این فرد مبتلا به لوسمی بود و همزمان با مرکاپتوپورین و متوترکسات، 800 میلی گرم سیلی مارین دریافت می کرد. این بیمار قبل از مصرف سیلی مارین دچار افزایش آنزیمهای کبدی شد و ناگزیر به قطع داروهای ضد سرطان شد اما با مصرف سیلی مارین به مدت 4 ماه، آنزیمهای کبدی در حالت نرمال قرار گرفت و نیاز به قطع داروی ضد سرطان در او مشاهده نشد (37). در تحقیقی که بر روی مرد 52 ساله مبتلا به سرطان کبد انجام گرفت. این بیمار بدون اینکه داروهای ضد سرطان مصرف کند روزانه 450 میلی گرم سیلی مارین دریافت می کرد. نتایج نشان داد بیماری این فرد با مصرف سیلی مارین رو به بهبود رفته است و نیازی به مصرف داروهای ضد سرطان نداشت (38). در مطالعه ای که دمارک و همکاران در سال 2004 بر روی اثر عصاره خار مریم بر سرطان پروستات انجام دادند مشخص شد که سیلی مارین موجود در خار مریم توانایی تکثیر سلولها را کاهش داده و رشد تومورهای پروستات انسانی را کم می کند (39). نین سین و همکاران در سال2007 مطالعه ای بر روی رت انجام دادند مطالعه در مورد نقش محافظتی خار مریم بر استرس های اکسیداتیو در مغز رت بود، نتایج نشان داد که خار مریم باعث محافظت مغز در برابر آسیبهای اکسیداتیو می شود (40). حقیرالسادات و همکاران در سال 2016 نانو ذرات لیپیدی حاوی اسانس زنیان تهیه نمودند که میزان انکپسولاسیون اسانس35/6 درصد و اندازه نانوذرات حاوی اسانس 186/1 nm بوده است. همچنین پتانسیل زتای نانو ذرات در این پژوهش بین 1- تا 6/7 –گزارش شده است (41). مجدی زاده و همکاران در سال 2018، نانولیپوزومهای آهسته رهش حاوی اسانس نعناع فلفلی را با درصد بارگذاری 61/38 درصد، اندازه 245 nm، شاخص پراکندگی 0/32 و پتانسیل زتای 34/54 mV- تهیه نمودند (42). کریمی‌مقدم و همکاران در سال 2019 سامانه‌ی لیپیدی نیوزومی حاوی سیلیبینین را تهیه و گزارش نمودند که سامانه‌ی مذکور دارای بازده درونگیری 5 ± 92/87 درصد، اندازه ذرات 118 نانومتر و پتانسیل زتا 0/9 ± 31/33- میلی ولت می‌باشد (43). سلطانی و نیکونهاد لطف آبادی نیز در سال 2019، سامانه‌ی نیوزومی حاوی اسانس روزماری تهیه و گزارش نمودند که این سامانه‌ی لیپیدی دارای اندازه 73/6 نانومتر، بازده درونگیری 86/75 % و پتانسیل زتای 45/46- میلی ولت بوده است (44).

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان عصاره خارمریم را به صورت نانولیپوزوم با اندازه و کارایی مناسب درون-پوشانی کرد و از این طریق حلالیت و پایداری ترکیبات زیست فعال را افزایش داد. همچنین بررسی الگوی رهایش عصاره از لیپوزوم نشان داد که رهایش تقریبا آهسته صورت گرفته است بنابراین لیپوزوم نقش قابل ملاحظه‌ای در رهایش کنترل شده و دارورسانی هدفمند دارد. بنابراین با توجه به شواهد فوق میتوان نانوسامانه‌ی لیپوزومی حاضر را می‌توان به عنوان نانو حامل مناسب جهت رسانش عصاره‌های گیاهی پیشنهاد نمود.

سپاسگزاری

از شرکت ریز زیست فناوران فردانگر و آقای محمد مجدی زاده به جهت همکاری های علمی سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Barbaric M, Brooks E, Moore L, Cheifetz O. Effects of physical activity on cancer survival: a systematic review. Physiother Can 2010; 62:25– 34

2. Cheong I, Zhou S. Tumor-Specific Liposomal Drug Release Mediated By Liposomase. Methods Enzymol. 2009; 465: 251-65

3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA: Cancer J Clin2005; 55:74-108

4. Vinay K, Abbas A, Fauston N. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. New York: Saunders. 2004.p.623-5.

5. Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis. World J Gastroenterol 2008; 14:4300.

6. -Hajiani E, Masjedizadeh R, Hashemi J, Azmi M, Rajabi T. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Southern Iran. Saudi Med J 2005; 26:974-7.

7. Colombo M, Choo Q, Del Ninno E, Dioguardi N, Kuo G, Donato M, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. Lancet. 1989; 334:1006-8.

8. Li M, Xiongzh G. Ion channels as targets for cancer therapy. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol 2011; 3(2):156-166.

9. Das M, Mohanty C, Sahoo SK. Ligand-based targeted therapy for cancer tissue. Expert Opin Drug Deliv 6(3): 285-304.

10. Poste G, Kirsh R. Site–Specific (Targeted) Drug Delivery in Cancer Therapy. Natuer Biotechnology 1983; 1: 869-78.

11. Tinsley R. Harrison, Braunwald E. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17th ed. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2008

12. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Cancer Letters 2008, 267(1): 133-64.

13. Zargari A. Medicinal Plants. Fifth Edition. Tehran University Press & Publishing Institute. 1375, third volume: 38-34

14. Bean Caitlin. Silybum marianum. st.3rd Nature conservancy, California, 785 Market floor. Sanfrancisco. 1985.

15. Iranian Pharmacopoeia Editing Committee. Iranian Pharmacopoeia. Ministry of Health and Medical Education Deputy of Food and Drug Administration. 2002, first edition.

16. Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. Phytother Res. 2010; 24(10):1423-32. DOI: 10.1002/ptr.3207 PMID: 20564545

17. Varma PN, Talwar SK, Garg GP. Chemical Investigation of Silybum-Marianum. Plant Med. 1980;38(4):377-83. DOI: 10.1055/s-2008-1074893

18. Hackett ES, Twedt DC, Gustafson DL. Milk thistle and its derivative compounds: a review of opportunities for treatment of liver disease. J Vet Intern Med. 2013;27(1):10- 6. DOI: 10.1111/jvim.12002 PMID: 23140176

19. Venkataramanan, R., Ramachandran, V., Komoroski, B.J., Zhang, S., Schiff, P.L. and Strom, S.C., 2000. Milk thistle and herbal supplement decrease in the activity of CYP3A4 and uridine diphosphoglucuronosyl transfarase in human hepatocyte cultures. Drug Metabolism and Disposition, 28(11): 1270-1273.

20. Osuchoweski, M.F., Johson, V.J. and Sharma, R.P., 2004. Alteration in regional brain neurotransmitters by silymarin a natural antioxidant flavonoid mixture in BALB/c mice. Pharmaceutical Biology, 42(4-5): 384-389.

21. Dermarderosian, A, The review of Natural Products. Facts and Comparisons, Saint Louis, 2001: 722.

22. 22.Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT,Aggarwal BB. Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis.J Immunol 1999; 163(12):6800-9.

23. 23.Okawa M, Kinjo J, Nohara T, Ono M. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. Biol Pharm Bull 2001; 24 (10): 1202-5.

24. 24.Skottova N, Krecman V, Walterova D, Ulrichova J, Kosina P, Simanek V. Effect of silymarin on serum cholesterol level in rats. Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med 1998; 141: 87-9.

carcinogenesis in male F344 rats. Int. J. Cancer. 2002; 101 (5): 461-8.

37. Invernizzi R, Bernuzzi S, Ciani D. Silymarine during maintenance therapy of acute promyelocytic leukemia. Haematologica. 1993; 78 (5): 340-1.

38. Grossmann M, Hoermann R, Weiss M. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. Am. J. Gastroenterol. 1995; 90 (9): 1500-3.

39. Demark-Wahnefried, W., Robertson, C.N., Walther, P.J., Polascik, T.J., Paulson, D.F. and Vollmer, R.T., 2004. Pilot study to explore effects of low-fat, flaxseed-suplemented diet on proliferation of benign prostatic epithelium and prostate-specific antigen. Urology, 63(5): 900-904.

40. Nencini C, Giorgi G, Micheli L. Protevtive effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. Phytomedicine 2007; 14: 129-35.

41. Haghiralsadat FA, Azhdari MA, Kalantar SM, Naderinezhad SA, Teymourizadeh KE, Yazdani MO, Hashemi MO, Daneshmand FA. Strategy of Improvements in the rapeutic index of medicinal herbs of Iranianin digenous: Synthesis and characterization of phospholipid lipid-based vesicles in corporated Trachyspermum copticum. SSU_Journals. 2016 Sep 15; 24(6):468-78. [Persian]

42. Majdizadeh M, Rezaei Zarchi S, Movahedpour AA, Shahi Malmir H, Sasani E, Haghiralsadat BF. A new strategy in improving therapeutic indexes of medicinal herbs: preparation and characterization of nano-liposomes containing Mentha piperita essential oil. J Shaeed Sdoughi Univ Med Sci Yazd. 2018;25(10):853–64. [Persian]

43. Karimi-Moghddam A, Nikounahad-Lotfabadi N, Haghiralsadat BF, Majdizadeh M. Investigating the effect of lipid nanoparticles containing silibinin anti-cancer drug on the growth of breast cancer MCF-7 cell line. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2019;6(4):1-2. [Persian]

44. Soltani N, Nikoonahad lotfabadi N. Evaluation of the Effect of Niosomal Nano-Carriers Containing Rosemary (Rosemary officinalis) Essential oil on Survival of KG-1 Cell Line of Acute Myeloid Leukemia. sjimu. 2019; 27 (3) :162-172. [Persian]

45. Billah MM، Anthes JC. The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. Biochemical Journal. 1990;269(2):281-91.

25. Burgess CA. Silybum marianum (Milk Thistle). Journal of Pharmacy the Society of Winconsin 2003; 4: 3-40

26. Vogel G, Trost W, Braatz R, Odenthal KP, Brusewitz G, Antweiler H, Seeger R. Pharmacodynamics, site and mechanism of action of silymarin, the antihepatoxic principle from Silybum marianum (L.) Gaertn. 1. Acute toxicology or tolerance, general and specific (liver-) pharmacology. Arzneimittelforschung. 1975; 25 (1), 82-89.

27. Dehmlow C, Erhard J, de Groot H. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. Hepatology. 1996; 23: 749-54.

28. 64. Zi X, Mukhtar H, Agarwal R. Novel cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin:inhibition of mRNA expression of an endogenous tumor promoter TNF alpha. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997; 239: 334-9.

29. Zawang A, Langer R, Farokhzad O. Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. Annual Review of Medicine 2012; 63:185-98.

30. . Keller, B.C. (2001). Liposomes in nutrition. Trends Food Sci.Tech., 12(1),25-31.

31. Allen TM, Hansen CB, D E L. de Menezes. Pharmacokinetics of long-circulating liposomes. Adv Drug Deliv Rev 1995; 16(2): 267-84.

32. Sirisha, V N L et al. 2012. “Liposomes – the Potential Drug Carriers.” J Pharm 2(5): 26–38.

33. Clot p, Tabone N, Arico S, Albano E. Monitoring oxidative damage in patients with liver cirrhosis and different daily alcohol intake. Gut. 1994; 35: 1637 – 43.

34. Mourelle M, Muriel p, Favori L,franco T. prevention of CCl4 –induced liver cirrhosis by silymarin. Fundam. Clin. Pharmacol. 1989; 3: 183-91.

35. Letteron P, Labbe G, Degott C, Berson A, fromenty B, Delaforge M. Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. Biochem. Pharmacol. 1990; 39: 2027 – 34.

36. Kohno H, Tanaka T, Kawabata K. Silymarin, a naturally occurring polyphenolic antioxidant flavonoid, inhibits azoxymethane-induced colon

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Synthesis and evaluation of liposome carrier containing extract of *Silybum marianum for* effect on liver cancer

Mojtaba Ansari[1*] , Mahdi Eshghanmalek[2] , Bibi fatemeh haghirosadat[3]

1- Associate Professor, Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, Meybod University, Meybod, Iran

2- Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, University of Science and Art, Yazd, Iran

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

*Corresponding Author: ansari@meybod.ac.ir

Received: 2021/1/10 Accepted: 2021/5/11

Abstract

Aim and Background: Today, the use of medicinal plants in the cancer treatment due to less side effects has been considered. *Silybum marianum* is a medicinal herb of Asteraceae, which is used in the treatment of liver diseases and gallbladder diseases, cancer, cardiovascular diseases. The encapsulation of bioactive materials in nano-liposomes is an effective approach to regulate drug release, increase stability, protect them from environmental reactions, reduce volatility, and increase its effects. The aim of this study was encapsulation of the extract of *Silybum marianum* in to liposomes and to evaluate the physico-chemical in order to effect on liver cancer cells

Materials and Methods: In this study, extract of *Silybum marianum* was prepared by Soxhlet method. Liposomal vesicles were prepared by thin-film hydration method and the extract of *Silybum marianum* was loaded. Finally, the nanoparticles were assayed for encapsulation efficiency, release profile and physicochemical properties such as particle size, zeta potential, morphology, and FTIR.

Results: Nanoliposome containing *Silybum marianum* extract had 63.37% encapsulation efficiency and size 122 nm zeta potential -13.1 and the dispersion index 0.197. The release of herbal extract of *Silybum marianum* was controlled. There is no chemical interaction between the extract and the liposome and is morphologically homogeneous and had a spherical structure.

Conclusion: The results of this study show that the extracts of *Silybum marianum* can be encapsulated in appropriate size and function in nanoliposomal forms, so liposomes are a suitable carrier for the *Silybum marianum* extract.

keywords: Cancer, *Silybum marianum* Extract, Medicinal Plants, Nanoliposome