



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

مجتبی انصاری^{1*}، مهدی عشقان ملک²، بی بی فاطمه حقیرالسادات³

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 نانو بیوتکنولوژی، گروه علوم و فنون نوین، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

* نویسنده مسئول: ansari@meybod.ac.ir

پذیرش: 1400/2/21

دریافت: 1399/10/21

چکیده:

مقدمه: امروزه استفاده از گیاهان دارویی در درمان سرطان به دلیل عوارض جانبی کمتر، مورد توجه قرار گرفته 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 کارآمد برای تنظیم رهایش دارو، افزایش پایداری، محافظت از آنها در برابر واکنش با محیط، کاهش فرار و افزایش میزان تأثیر آن است. هدف از این پژوهش کپسوله کردن عصاره خارمریم درون لیپوزوم و ارزیابی فیزیکی شیمیایی 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. در نهایت نانوذرات ساخته شده از نظر راندمان بارگذاری، رهایش عصاره از لیپوزوم و شاخصه‌های فیزیکی شیمیایی 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 زتا 13/1- میلی ولت و شاخص پراکندگی 0/197 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 می باشد.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان می دهد که می توان عصاره خارمریم را با اندازه و کارایی مناسب به شکل نانولیپوزوم کپسوله کرد. بنابراین لیپوزوم حامل مناسبی برای عصاره خار مریم محسوب می شود.

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 نفر در جهان به این بیماری دچار می شوند (2). سرطان کبد یکی از سرطان های شایع و کشنده در جهان است و جزء ششمین سرطان فراگیر جهان به شمار می رود. این سرطان در مراحل پیشرفته شناسایی می شود به همین دلیل چهارمین سرطان کشنده در جهان به شمار می رود (3). سرطان کبد در هر دو جنس زن و مرد بروز می کند اما در مردان شایع تر است و به طور معمول در سنین 30 تا 50 سالگی شناسایی می شود (4). شیوع این بیماری در ایران کمتر است و سالانه 5 نفر از هر یک میلیون نفر به دلیل این بیماری جان خود را از دست می دهند (5). تحقیقات نشان می دهد که با افزایش سن، احتمال ابتلا به این بیماری افزایش پیدا می کند (6). سرطان کبد اغلب به دلیل متاستاز سرطان دیگر یا در نتیجه هپاتیت مزمن B یا C ایجاد می شود (7). به منظور درمان انواع سرطان از روش های متعددی از جمله رادیوتراپی، شیمی درمانی و جراحی استفاده می شود (8). در این بین شیمی درمانی به عنوان یکی از پرکاربردترین روش های درمان سرطان مورد استفاده قرار می گیرد. اما این روش درمان با محدودیت هایی از قبیل مقاومت دارویی، هدفمند نبودن دارورسانی به بافت هدف و مقاومت دارویی همراه است (9 و 10). همچنین این روش با عوارض جانبی متعددی از قبیل تاول زایی، آلرژی، عوارض قلبی و غیره برای بیماران مبتلا به سرطان همراه است (11). ترکیبات گیاهی از سالیان بسیار قدیم در طب سنتی مورد استفاده قرار می گرفته است و به تازگی بیش از گذشته مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته اند. استفاده از عصاره های

گیاهی راه جدیدی را در درمان سرطان ها گشوده اند، به گونه ای که باعث کاهش محدودیت های استفاده از شیمی درمانی می شود و کارایی درمان را افزایش می دهد (12). عصاره خار مریم یکی از گیاهان دارویی است که مورد توجه پژوهشگران نانوپزشکی قرار گرفته است. نام علمی گیاه خار مریم¹ است. این گیاه از تیره کاسنی است. نام های دیگر این گیاه ماری تیغال، خار علیص و عکوب² است. این گیاه بومی منطقه مدیترانه، شمال آفریقا و جنوب اروپا است (13 و 14). در ایران این گیاه در مناطق مختلفی می روید اما بیشترین پراکندگی آن در نواحی جنوب غرب، غرب، جنوب و شمال و شمال غرب است (15). این گیاه در طب سنتی استفاده های زیادی دارد و در درمان بسیاری از بیماری ها و مشکلات مورد استفاده قرار می گیرد. 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 می دهد که این گیاه در درمان سرطان، بیماری های قلبی و کبدی مؤثر است (19-21). در پژوهش های مختلف ثابت شده است که خار مریم با خاصیت آنتی اکسیدان خود رادیکال های آزاد خطرناک اکسیژن را از بین می برد و با این کار مانع پراکسیداسیون لیپیدها شده و سبب حفظ و پایداری غشاهای سلولی می شود (22 و 23). خار مریم فعالیت آنزیم های گلوکاتایون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز و غلظت گلوکاتایون را افزایش می دهد و با اعمال این روش ها ویژگی های آنتی اکسیدانی خود را اعمال می کند (24). این گیاه حاوی گروهی از ترکیبات فلاونوئیدی است که به آن سیلی مارین گفته می شود.

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 کریستین می‌باشد (26). سیلی مارین موجود در خار مریم باعث تحریک DNA پلی مرار 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 شیمیایی³ 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 لیپوزوم‌ها 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 (31 و 32).

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 لیپوزوم‌ها استفاده کردیم. بنابراین پژوهش حاضر با هدف درون پوشانی عصاره خارمریم در نانولیپوزوم‌ها با هدف اثرگذاری بر سرطان کبد انجام شده است.

مواد و روش ها

پژوهش حاضر نوعی مطالعه آزمایشگاهی می باشد.

جذبی به دست آمده، نمودار استاندارد عصاره خار مریم در ایزوپروپیل و PBS رسم شد.

مواد مورد استفاده در پژوهش

ابتدا گیاه خار مریم را جمع آوری 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 آمریکای و DSPE-mPEG2000(PDG) متعلق به شرکت Merck آلمان تهیه و خریداری شد.

تهیه گیاه خار مریم و عصاره گیری

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 سانتی گراد حرارت دید. سپس نمونه به کمک کاغذ صافی فیلتر شد و عصاره مورد نظر برای انجام مراحل بعدی جمع آوری شد.

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

به منظور رسم نمودار کالبراسیون، ابتدا سری رقت های 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 رقت ها در طول موج ماکزیمم 310 نانومتر اندازه گیری شد. همچنین سری رقت های مختلف عصاره خار مریم در حلال PBS نیز تهیه گردید و با دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب رقت ها اندازه گیری شد. سپس با استفاده از طول موج های

• 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 خلا در دمای 45 سانتی گراد 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 سانتی گراد انجامو در انتها نانوذرات سنتز شده توسط سونیکیت حمامی کاهش سایز داده شد.

• تعیین درصد بارگذاری عصاره در نانو لیپوزوم
در این مرحله نانو لیپوزوم های 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 عصاره هایی که در سامانه لیپوزومی قرار نگرفته اند حذف شوند. به منظور بررسی میزان بارگذاری دارو در نانولیپوزوم، لیپوزوم های 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 اسپکتروفتومتری در طول موج ماکزیمم 310 نانومتر، میزان عصاره خارمریم انکپسوله شده محاسبه شد. در نهایت با استفاده از نمودار استاندارد عصاره خار مریم در ایزوپروپیل و رابطه (1) میزان انباشتگی دارو به دست 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 1 سی سی از لیپوزوم حاوی داروی خار مریم در کیسه دیالیز 12 کیلوالتونی ریخته شد و در مجاورت 10 سی سی بافر PBS در شرایط مشابه سلول نرمال (دمای °C 37 و PH= 7/4) قرار گرفت و در فواصل زمانی مشخص نمونه برداری 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 پراکندگی⁴ آنها با استفاده از دستگاه زتا سایزر شرکت Malvern Instruments مدل Nano-ZetaSizer ES در دمای °C 25 و زاویه 90° اندازه گیری گردید.

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

به منظور 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 به منظور کاهش رطوبت، حدود نیم ساعت نمونه در آون با دمای تقریبی °C 60 قرار داده شد. مراحل آماده سازی نمونه شامل مخلوط کردن نمونه با برومید پتاسیم (KBr) در نسبت 1:10 و

فشرده سازی نمونه ها به شکل قرص تحت فشار 160 کیلونیوتن بود. سپس قرص های حاصل برای آنالیز در دستگاه FTIR در محدوده طول موجی $400-4000\text{cm}^{-1}$ مورد مطالعه قرار گرفت.

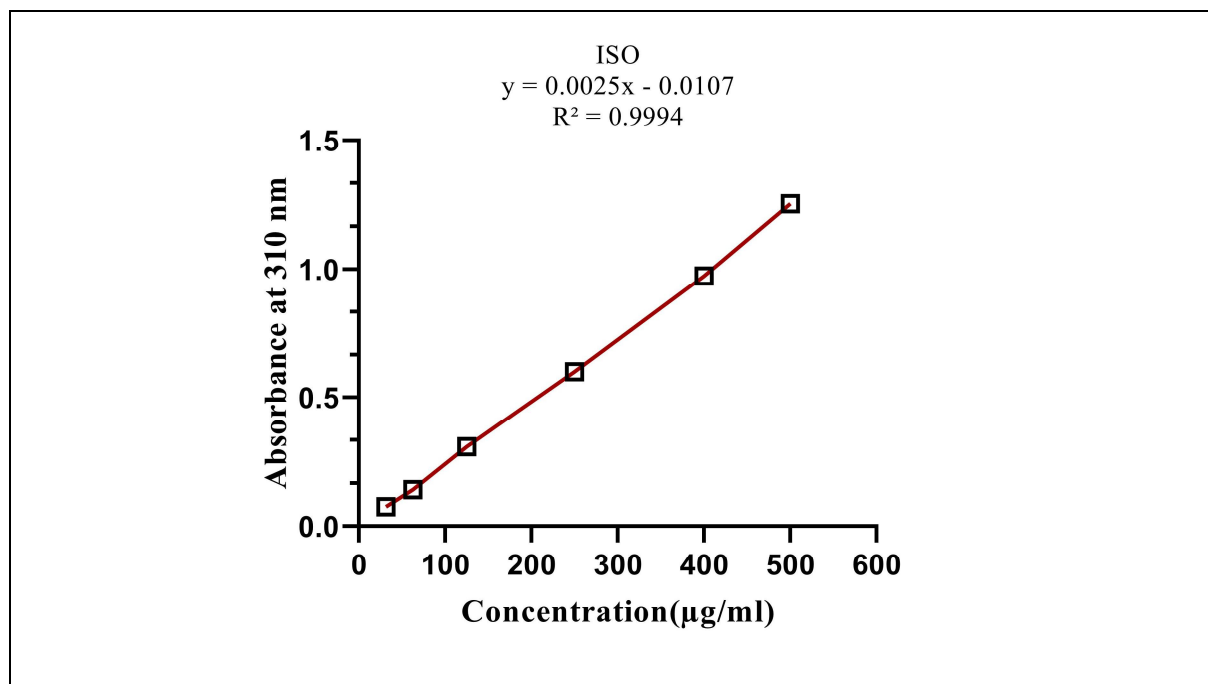
• مورفولوژی نانو لیپوزوم حاوی عصاره خار مریم

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 به منظور رسانا شدن با طلا پوشش دار شدند.

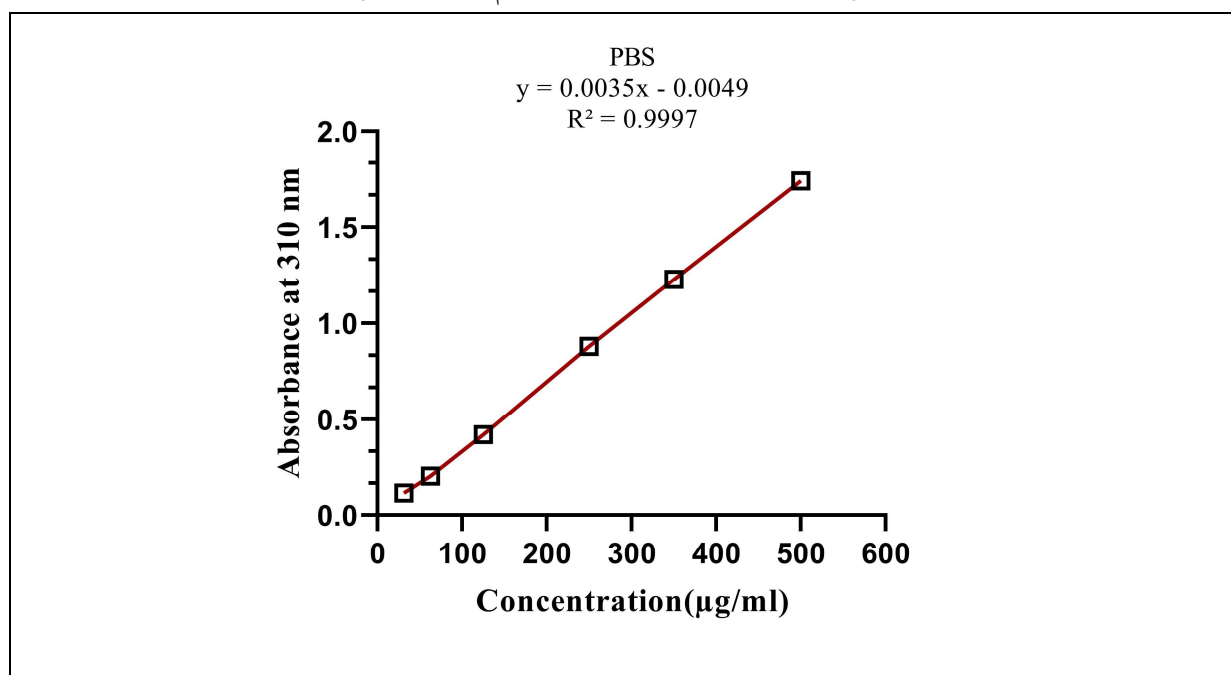
نتایج

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

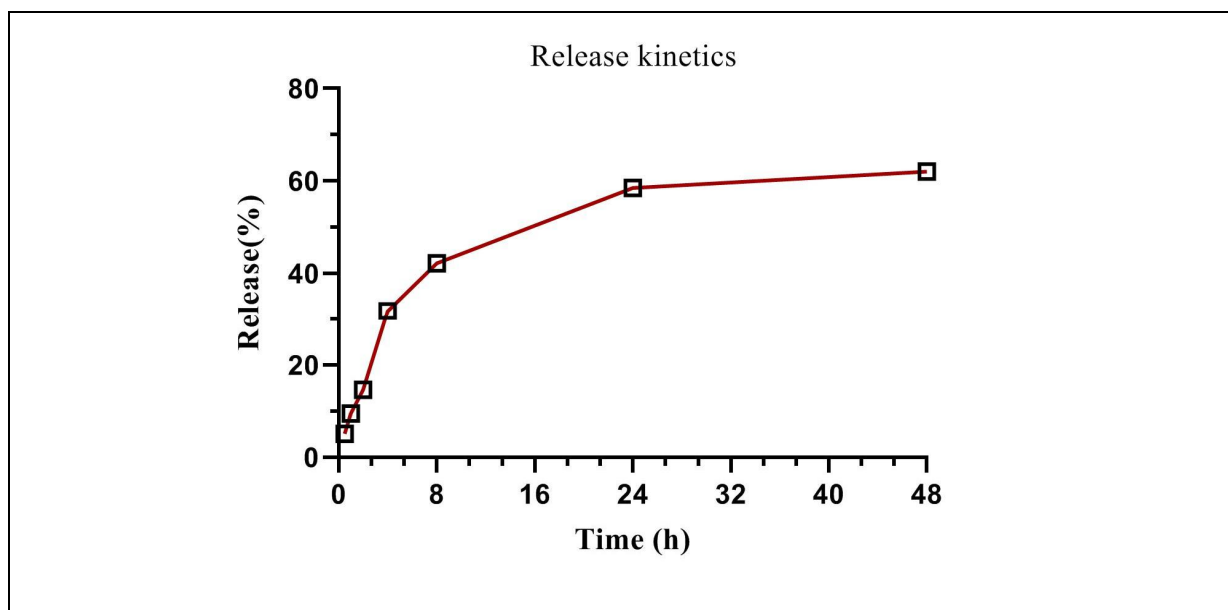


شکل 2- نمودار استاندارد عصاره خار مریم در بافر فسفات سالین (PBS)

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.

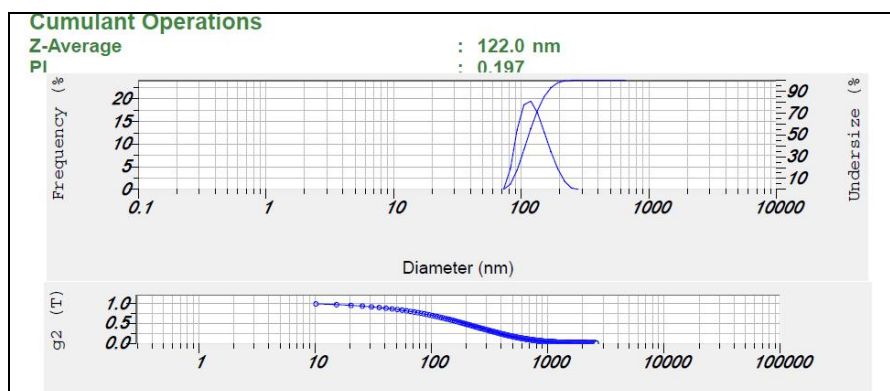


شکل 3- نمودار رهایش داروی عصاره خارمریم از سامانه‌ی لیپوزومی

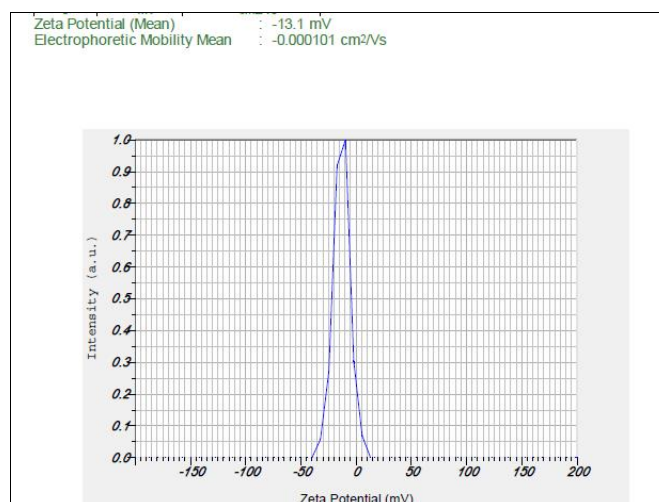
اندازه، توزیع اندازه و پتانسیل زتا

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).



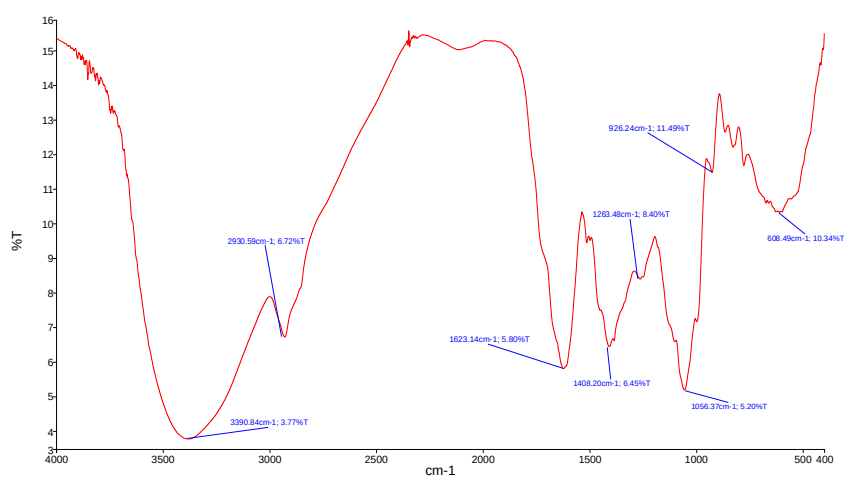
شکل 4- اندازه ذرات و شاخص پراکندگی ذرات برای سامانه‌ی لیپوزومی حاوی خار مریم



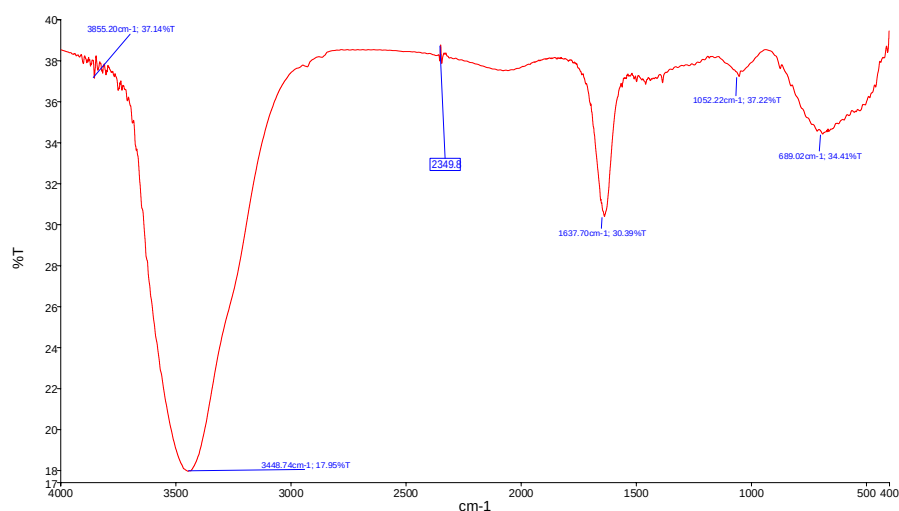
شکل 5- پتانسیل زتای سامانه لیپوزومی حاوی عصاره خار مریم

3448/74 مشخصه گروه OH، عدد موجی cm^{-1} 1637/70 مشخصه ارتعاش کششی C=O، پیک‌های موجود در ناحیه $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی گروه C-O است که به پیک‌های $3444/20\text{ cm}^{-1}$ ، 1637/71 در 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 اضافی 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 و ماهیت و ساختار شیمیایی ترکیبات در نانوحامل حفظ شده است.

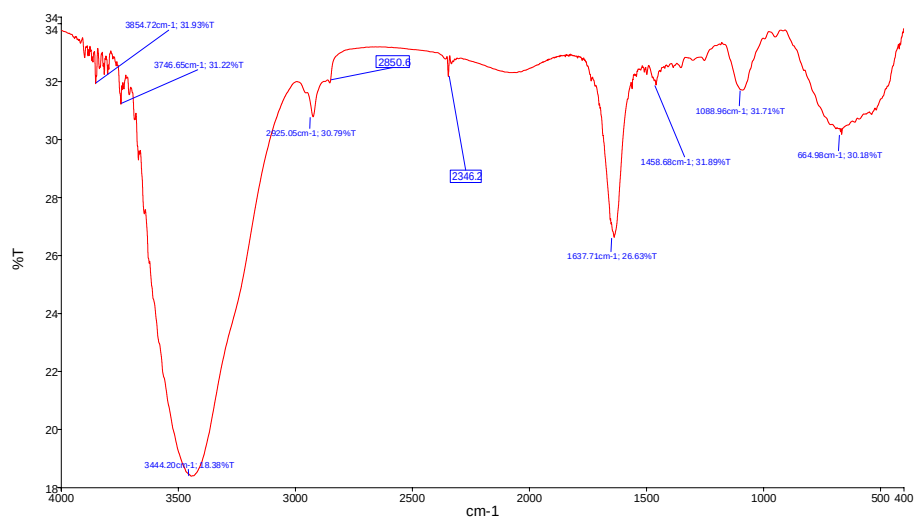
بررسی برهمکنش سامانه لیپوزومی و عصاره خار مریم آنالیز طیف‌سنجی فروسرخ به‌منظور شناسایی گروه‌های عاملی و برهمکنش‌های احتمالی بین ترکیبات و تشخیص انکپسولاسیون عصاره در لیپوزوم مورد بررسی قرار گرفت. با توجه طیف FTIR عصاره خار مریم (شکل 6)، پیک پهن ناحیه $3390/87\text{ cm}^{-1}$ مشخصه گروه OH، cm^{-1} 2930/58¹ مشخصه ارتعاش کششی CH_3 ، ارتعاش کششی C=O در عدد موجی $1623/14\text{ cm}^{-1}$ ، عدد موجی $1408/20\text{ cm}^{-1}$ مشخصه حرکت خمشی CH_3 ، پیک‌های موجود در ناحیه $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه C-O، عدد موجی $928/24\text{ cm}^{-1}$ مشخصه P-OR، فرکانس cm^{-1} 608/4 مشخصه گروه عاملی آلکیل هالید بروماید با پیوند کششی R-Br است. در طیف FTIR لیپوزوم فاقد عصاره خار مریم (شکل 7) پیک پهن ناحیه cm^{-1}



شکل 6- طیف FTIR عصاره خار مریم



شکل 7- طیف FTIR سامانه لیپوزومی فاقد عصاره خار مریم

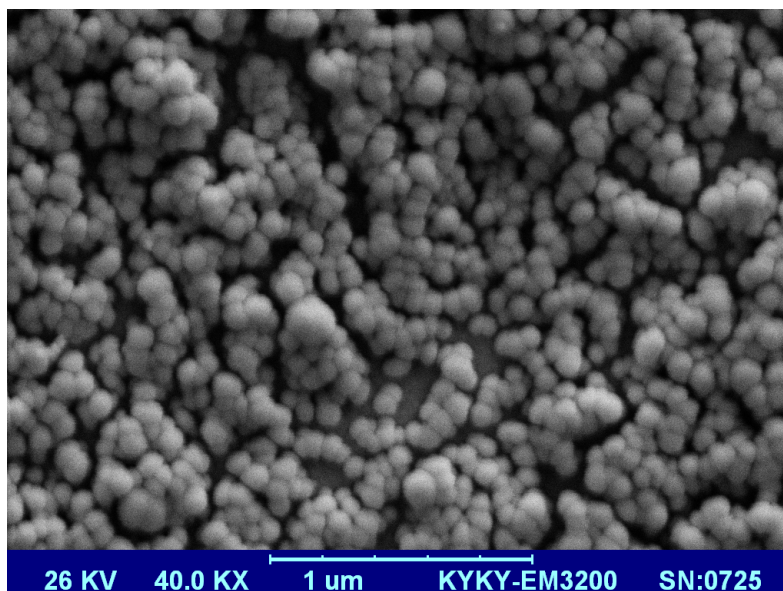


شکل 8- طیف FTIR سامانه لیپوزومی حاوی عصاره خار مریم

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 می رود. به منظور درمان این بیماری از روش‌های رادیوتراپی، جراحی و شیمی درمانی استفاده می شود. استفاده از شیمی درمانی فراگیرتر از دو روش دیگر است. اما استفاده از آن با محدودیت‌ها و عوارض متعددی همراه است. امروزه سعی می شود 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 می کند. خارمریم گیاهی دارویی است که در طب سنتی کاربرد دارد و به تازگی توجه محققان نانوپزشکی را به

خود جلب کرده است. محققان در تلاش 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 گلیکول استفاده شد. افزودن کلسترول به غشا های فسفاتیدیل کولین بر دمای انتقال فاز آن نیز مؤثر باشد. 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 سال 2007 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 اسانس 35/6 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). کریمی مقدم و همکاران در سال 2019 سامانهی لیپیدی نیوزومی حاوی سیلینین را تهیه و گزارش نمودند که سامانهی مذکور دارای بازده درونگیری $92/87 \pm 5$ درصد، اندازه ذرات 118 نانومتر و پتانسیل زتا $0/9 \pm 31/33$ میلی ولت می باشد (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 می توان 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 تقریباً آهسته صورت گرفته است بنابراین لیپوزوم نقش قابل ملاحظه ای در رهایش کنترل شده و دارورسانی هدفمند دارد. بنابراین با توجه به شواهد فوق میتوان نانو سامانهی لیپوزومی حاضر را می توان به عنوان نانو حامل مناسب جهت رسانش عصاره های گیاهی پیشنهاد نمود.

سپاسگزاری

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

منابع

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 transferase in human hepatocyte cultures. *Drug Metabolism and Disposition*, 28(11): 1270-1273.
20. Osuchowski, M.F., Johnson, 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. 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. 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. 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.
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 Clin* 2005; 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. *Nature 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.

- carcinogenesis in male F344 rats. *Int. J. Cancer*. 2002; 101 (5): 461-8.
37. Invernizzi R, Bernuzzi S, Ciani D. Silymarin 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-supplemented diet on proliferation of benign prostatic epithelium and prostate-specific antigen. *Urology*, 63(5): 900-904.
40. Nencini C, Giorgi G, Micheli L. Protective 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 therapeutic index of medicinal herbs of Iranian indigenous: Synthesis and characterization of phospholipid lipid-based vesicles in incorporated *Trachyspermum coticum*. *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-Moghaddam 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, Nikounahad 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 antihepatotoxic 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

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

Mojtaba Ansari^{1*}, Mahdi Eshghanmalek², Bibi fatemeh haghrosadat³

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