



ساخت نانوذرات لیپوزومال حاوی عصاره هیدروالکلی خار مریم و بررسی سمیت آن بر رده‌ی سلول سرطانی استئوسارکوما انسانی (SAOS-2) و بررسی اثر عصاره هیدروالکلی آزاد خار مریم و لیپوزوم‌های خالی بر سلول سالم فیروبلاست انسانی (HFF)

محمد طائب‌پور^۱، محمد مجدی‌زاده^۲، بی‌بی فاطمه حقیرالسادات^{۳*}، میلاد اخلاقی^۵

- ۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی - گروه علوم و فنون نوین پزشکی - دانشکده پیراپزشکی - دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد - یزد - ایران.
- ۲- کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی - گروه زیست‌فناوری - شرکت ریز زیست‌فناوران فردانگر - پارک علم و فناوری یزد - یزد - ایران.
- ۳- استادیار - گروه علوم و فنون نوین پزشکی - دانشکده پیراپزشکی - دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد - یزد - ایران.
- ۴- مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت - پژوهشکده علوم تولید مثل - دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد - یزد - ایران.
- ۵- کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی - گروه بیوشیمی بالینی - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی شهید صدوقی یزد - یزد - ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۰۹، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۱۹

چکیده

مقدمه: هدف از این پژوهش ساخت نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره‌ی *Silybum marianum* و بررسی سمیت آن بر روی رده‌ی سلول سرطانی SAOS-2 و بررسی سمیت عصاره آزاد و لیپوزوم‌های خالی بر رده‌ی سلولی HFF می‌باشد.

مواد و روش‌ها: سه سامانه‌ی لیپوزومی حاوی عصاره‌ی با درصد مولی متفاوتی از فسفاتیدیل کولین سویا (۶۰ و ۸۰) به همراه کلسترول بروش فیلم نازک تهیه گردید. فرمولاسیون مناسب‌تر با توجه به درصد بارگذاری و میزان رهایش انتخاب گردید. الگوی رهایش عصاره از فرمولاسیون منتخب ارزیابی شد و اندازه و بار سطحی ذرات بررسی گردید. در پایان سمیت سامانه‌ی منتخب حاوی عصاره و عصاره آزاد و سامانه فاقد عصاره بر رده‌ی سلولی SAOS-2 و سمیت عصاره آزاد و سامانه‌ی فاقد اسانس بر رده‌ی سلولی HFF سنجیده شد.

نتایج: میزان بارگذاری عصاره در فرمولاسیون منتخب، اندازه ذرات، شاخص پراکندگی، و پتانسیل زتا برای فرمولاسیون منتخب، به ترتیب $\pm 0.15\%$ ، 98 nm و 286 mV می‌باشد. رهایش عصاره در شرایط دمایی مشابه سلول سالم و سرطانی آهسته است. همچنین عصاره لیپوزومه نسبت به عصاره آزاد سمیت بیشتری بر رده‌ی سلولی SAOS-2 داشته و لیپوزوم فاقد عصاره و عصاره آزاد سمیت کمی بر رده‌ی سلولی HFF داشته‌اند. **نتیجه‌گیری:** براساس نتایج، سامانه‌ی لیپوزومی حاوی عصاره با برخورداری از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و سمیت مناسب بر رده‌ی سلولی SAOS-2 می‌تواند حامل مناسب برای رسانش ترکیبات گیاهی به سلول‌های هدف باشد.

واژه‌های کلیدی: لیپوزوم، خارمریم، استئوسارکوما، فیروبلاست، نانوذرات.

*نویسنده مسئول: یزد - دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی - گروه علوم و فنون نوین پزشکی، تلفن: ۰۹۱۳۲۵۰۷۱۵۸، شماره: ۰۹۱۵۱۷۳۱۶۰، Email: Fhaghirosadat@gmail.com

Email:

ارجاع: طائب‌پور محمد، مجدی‌زاده محمد، حقیرالسادات بی‌بی فاطمه، اخلاقی میلاد. ساخت نانوذرات لیپوزومال حاوی عصاره هیدروالکلی خار مریم و بررسی سمیت آن بر رده‌ی سلول سرطانی استئوسارکوما انسانی (SAOS-2) و بررسی اثر عصاره هیدروالکلی آزاد خارمریم و لیپوزوم‌های خالی بر سلول سالم فیروبلاست انسانی (HFF). مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۰؛ ۱۶(۱): ۷۳-۶۱.

مقدمه

استئوسارکوما یک تومور اولیه‌ی بدخیم اسکلتی است که از سلول‌های مزانشیمی تشکیل‌دهنده‌ی استخوان منشأ می‌گیرد و با تشکیل بافت استخوانی نابالغ یا تشکیل بافت استخوانی توسط سلول‌های توموری مشخص می‌گردد (۱ و ۲). استئوسارکوما کلاسیک تقریباً ۱۵ درصد از کل تومورهای سرطانی استخوان را شامل می‌شود و میزان مرگ و میر ناشی از نتوپلاسم‌های بدخیم استخوانی و مفاصل، ۹/۸ درصد از کل مرگ و میرهای ناشی از سرطان استخوان در کودکان و نوجوانان را رقم می‌زند (۱ و ۲). آمارها نشان می‌دهد که حدود ۷۵٪، از بیماران مبتلا به استئوسارکوم بین ۱۵ تا ۲۵ سال می‌باشند و از نظر جنسیتی مردها بیشتر از زنان به این بیماری مبتلا می‌شوند، همچنین این بدخیمی به ندرت در افراد پایینتر از ۶ یا بالاتر از ۶۰ سال مشاهده می‌شود (۱). حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد استئوسارکوما در استخوان‌های طویل ایجاد می‌شود به گونه‌ای که استخوان ران حدود ۸۵٪ از تومورهای سرطانی را تشکیل می‌دهد (۱). درد موضعی و به دنبال آن تورم موضعی و محدودیت حرکتی مفاصل علایم و نشانه‌های معمول این بیماری است (۳) به منظور درمان سرطان استخوان از روش‌هایی نظیر شیمی‌درمانی و جراحی استفاده می‌شود که متأسفانه، برای استئوسارکوما به‌ویژه در زمانی که به مرحله متاستاز رسیده باشد، اغلب به‌اندازه کافی مؤثر نیستند (۴ و ۵). چرا که مقاومت چندگانه دارویی شایع در استئوسارکوما و بروز بسیاری از عوارض جانبی مضر هنگام استفاده از دوزهای بالای داروهای شیمی‌درمانی، از میزان اثر بخشی روش‌های درمانی فعلی می‌کاهد (۴). معمولاً برای درمان دارویی این بیماری از ترکیباتی نظیر دوکسوروبیسین و متوترکسات استفاده می‌شود که با عوارض جانبی متعددی نظیر اختلالات گوارشی، سمیت کلیوی، ریوی و کبدی و قلبی همراه هستند و باعث کاهش کیفیت زندگی بیماران در طول درمان می‌شود (۸-۶). همچنین در راستای درمان استئوسارکوم بیماران تحت درمان گاهی قطع عضو قرار می‌گیرند که میزان بهبودی آن‌ها زیر ۱۰٪ است (۴). با توجه به عوارض یادشده برای درمان‌های رایج استئوسارکوما از یکسو، استفاده از شیوه‌های درمانی جدید و مبتنی بر ترکیبات گیاهی با عوارض جانبی کم ضروری به نظر می‌رسد (۹).

متابولیت‌های ثانویه مشتق از گیاهان مانند فنل و فلاونوئید دارای پتانسیل قوی برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌باشند (۱۰) که تأثیرات بیولوژیک متعددی چون فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد باکتریایی دارند (۱۱). فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولیک در گیاهان عمدتاً به علت ویژگی‌های اکسایش-کاهش و ساختار شیمیایی آن‌هاست که نقش مهمی در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و تجزیه‌ی پراکسیدها دارد (۱۲). در این بین، گیاه خار مریم با نام علمی *Silybum marianum* از حدود ۲۰۰۰ سال پیش به عنوان داروهای سنتی گیاهی

مورد استفاده قرار می‌گیرد و از عصاره‌ی آن هنوز هم به‌طور گسترده‌ای برای محافظت از کبد در برابر سموم و کنترل بیماری‌های مزمن کبدی استفاده می‌شود (۱۳). همچنین مطالعات تجربی و کلینیکی اخیر نشان می‌دهد که عصاره *Silybum marianum*، دارای اثرات ضد سرطانی، ضد دیابتی و محافظت‌کننده قلبی است (۱۴). به نظر می‌رسد که خواص بیولوژیکی عصاره این گیاه، به وجود ماده‌ی مؤثره سیلیمارین بر می‌گردد. چراکه مکمل سیلیمارین به طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل می‌گردد (۱۵). با وجود تمامی فواید گیاهان دارویی در درمان و پیشگیری بیماری‌ها، استفاده از ترکیبات گیاهی با چالش‌هایی نظیر اثرگذاری نامطلوب بر ارگان‌های غیر هدف و اکسید شدن برخی از مواد مؤثره، روبرو است. در این میان فناوری نانو با ساخت و تهیه نانو حامل‌های دارویی از جمله لیپوزوم توانسته است بسیاری از مشکلات یاد شده را کاهش داده و یا برطرف نماید (۱۶). لیپوزوم‌های نانو حامل‌های لیپیدی هستند که بر اثر تجمع لیپیدها در محیط‌های آبی ایجاد می‌شوند. توانایی این نانوساختارها کروی در بدام‌اندازی مقدار زیاد دارو، به حداقل رساندن عوارض جانبی ناخواسته، اثر بخشی بالا و سمیت پایین توانسته علاقه محققین را به این نانوساختار جلب کند. علاوه بر این از دیگر مزایای نانولیپوزوم‌ها می‌توان به سهولت تولید حجم‌های صنعتی، کیفیت عالی ساخت، تنوع در اندازه ذره، ترکیب شیمیایی و بار الکتریکی اشاره کرد (۱۹-۱۷).

هدف از پژوهش حاضر، ابتدا ساخت سه فرمولاسیون از نانو سامانه‌های لیپوزومی حاوی عصاره‌ی *Silybum marianum* و بررسی درصد بارگذاری و میزان رهایش عصاره از سامانه‌های لیپوزومی است. سپس انتخاب فرمولاسیون مناسب و سنجش ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن از منظر الگوی رهایش عصاره طی ۴۸ ساعت در شرایط دمایی سلول سالم و سرطانی، اندازه و بار سطحی ذرات (پتانسیل زتا) می‌باشد. در پایان میزان سمیت نانو حامل فاقد عصاره بر رده‌ی سلولی HFF سالم پوست و SAOS-2 سرطان استخوان، میزان سمیت عصاره‌ی آزاد بر رده‌ی سلولی HFF و میزان سمیت‌عصاره‌ی لیپوزومه و عصاره آزاد بر رده سلولی SAOS-2 سرطان استخوان سنجیده شده است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر نوعی مطالعه آزمایشگاهی بوده که طی ۶ ماه در دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد به انجام رسیده است. فسفاتیدیل کولین سویا متعلق به شرکت lipoid-Gmbh آلمان و کلسترول متعلق به شرکت Sigma-Aldrich آمریکا خریداری شد. برای به دست آوردن عصاره‌ی به روش سوکسوله ابتدا گیاه *Silybum marianum* را در سایه خشک کرده و بعد از توزین، ۵۰ گرم از گیاه را وزن و به نسبت ده برابر آن اتانول ۷۰ درصد و به دستگاه سوکسوله

ابتدا کلسترول و نوع مشخصی از فسفاتیدیل کولین سویا (SPC) مطابق با درصد مولی جدول در حلال کلروفرم و در دمای ۴۰°C بر روی روتاری (هایدولف، آلمان) حل شده و تحت شرایط خلأ، فیلم نازک خشک تهیه گردید. سپس با افزودن مقدار مشخصی از حلال PBS به همراه عصاره، عمل هیدراتاسیون در دمای ۴۵°C به مدت ۶۰ دقیقه انجام پذیرفت. در ادامه محلول شیری رنگ سامانه‌ی لیپوزومی حاوی عصاره با فیلترهای ۰/۴ و ۰/۲ نانومتر، فیلتر گردید. در پایان سامانه لیپوزومی حاوی عصاره، به منظور کاهش سایز با استفاده از سونیکیت حمامی (PARSONIC2600s)، بدون دما، طی مدت ۴۰ دقیقه کاهش سایز داده شد (۱۶).

منتقل می‌کنیم. پس از طی دو الی سه ساعت از عصاره‌گیری محلول حاصله را از صافی عبور داده و در محیطی بدون نور خورشید، خشک کرده و برای مصارف بعدی آزمایش جمع‌آوری نمودیم. به‌منظور بررسی میزان بارگذاری و رهائش عصاره، نمودار استاندارد عصاره در ایزوپروپانول و PBS (Phosphate Buffered Saline) رسم گردید. برای رسم نمودار مذکور ابتدا مقدار مشخصی از عصاره را درون حلال موردنظر حل کرده و در غلظت‌های مختلف میزان جذب آن را با استفاده از اسپکتوفتومتری (Carry 100 Bio Co. Varian, Victoria, Australia) با سه بار تکرار بررسی و نمودار استاندارد عصاره را در حلال‌های موردنظر رسم نمودیم (۲۰). برای ساخت فرمولاسیون‌های لیپوزوم‌های حاوی عصاره Silybum marianum از روش هیدراتاسیون فیلم نازک استفاده شده است که خلاصه آن به شرح زیر است:

جدول ۱- نوع و درصد فسفولیپید و درصد کلسترول برای ساخت سامانه‌های لیپوزومی حاوی عصاره Silybum marianum

Formula code	Lipid/Drug	SPC60 (%)	SPC80 (%)	Cholesterol (%)
F1	۱۰	۰	۷۵	۲۵
F2	۱۰	۷۵	۰	۲۵
F3	۱۰	۶۰	۰	۴۰

رابطه (۱)، درصد بارگذاری عصاره Silybum marianum در لیپوزوم‌ها محاسبه گردید (۱۶).

$$\text{Entrapment Efficiency (\% EE)} = \frac{\text{Encapsulated Drug Concentration}}{\text{Primary used Drug Concentration}} \times 100$$

رابطه (۱)

شاخص پراکندگی، اندازه و پتانسیل زتایذرات سامانه لیپوزومی حاوی عصاره Silybum marianum با استفاده از دستگاه زتا سایزر مدل HORIBA در شرایط دمای ۲۵°C و زاویه ۹۰ درجه و در طول موج ۶۵۷ نانومتر اندازه‌گیری شد.

رده سلولی SAOS-2 سرطان استخوان و رده‌ی سلولی فیبروبلاست HFF سالم پوست از انستیتو پاستور ایران تهیه و پس از کشت و تکثیر در فلاسک‌های استریل با محیط RPMI، حاوی ۱۰٪ FBS به همراه آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلینوآسترپتومایسین در انکوباتور ۳۷°C و ۵٪ کربن دی‌اکسید، مورد مطالعه قرار گرفت (۲۱ و ۲۲).

در پژوهش حاضر به‌منظور اندازه‌گیری سمیت سلولی از تست MTT استفاده شده است. ابتدا رده سلولی SAOS-2 و HFF به‌صورت جداگانه با غلظت ۱۰۴ عدد در میکرولیتر، در هرچاهک در پلیت ۹۶ تایی به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سلول‌های SAOS-2 و HFF به ترتیب با ۵/۶۲ μg/ml، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ از لیپوزوم بدون عصاره به مدت ۴۸ ساعت تیمار گردیدند تا میزان سمیت لیپوزوم فاقد عصاره بررسی گردد. همچنین سلول‌های HFF با غلظت‌های ۵/۶۲ μg/ml و ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ از عصاره آزاد و سلول‌های سرطانی با ۵/۶۲ μg/ml

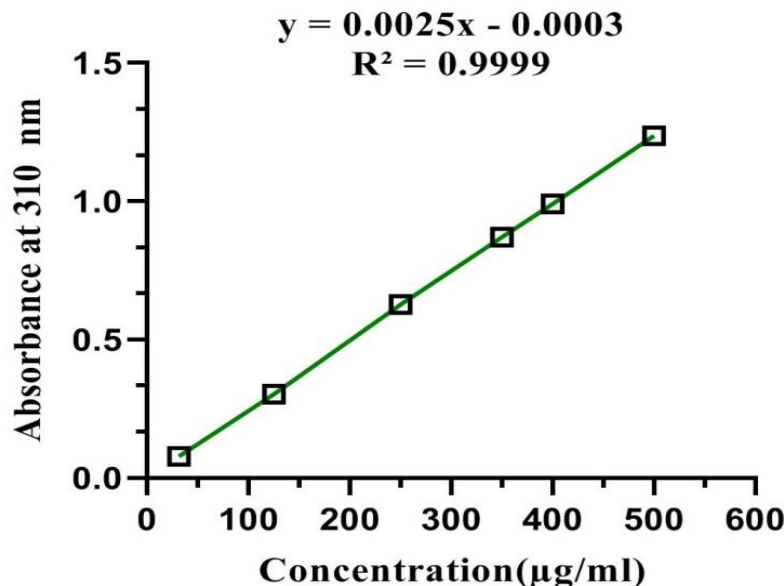
برای ارزیابی میزان رهائش عصاره بارگذاری شده در سامانه لیپوزومی، شرایط دمایی مشابه با سلول سالم و سرطانی فراهم گردید. ml5/0 از سامانه‌ی لیپوزومی حاوی عصاره را درون کیسه‌ی دیالیز قرار داده و آن را به درون فالكون استریل حاوی PBS با شرایط دمایی سلول سالم (۳۷°C) و شرایط دمایی سلول سرطانی (۴۲°C) قرار داده و استریل گردید. سپس در فاصله‌های زمانی مشخصیاز محلول PBS درون فالكون ml1 نمونه برداشته و به همان مقدار PBS جایگزین کرده و جذب نمونه‌های برداشت شده در فواصل زمانی مشخص را با اسپکتوفتومتر بررسی و میزان رهائش عصاره را با استناد به داده‌های اسپکتوفتومتر و با استفاده از نمودار استاندارد عصاره در PBS محاسبه و نمودار آن رسم گردید (۱۶).

ابتدا نانوحامل‌های لیپوزومی حاوی عصاره را درون کیسه دیالیز و به مدت یک ساعت درون بشری محتوی بافر فسفات سالین (PBS) و در دمای ۴°C قرار داد شد تا عصاره بارگذاری نشده حذف گردد. سپس لیپوزوم‌های حاوی عصاره با نسبت‌های حجمی ۱:۹ با ایزوپروپیل مخلوط کرده تا دیواره لیپیدی اطراف عصاره شکسته شود و عصاره آزاد گردد. در ادامه میزان جذب عصاره بارگذاری شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ماکزیمم عصاره (۳۱۰nm) گرفته شد. با توجه به میزان جذب بدست آمده و تطبیق آن با نمودار استاندارد عصاره در ایزوپروپیل میزان غلظت عصاره درون لیپوزوم محاسبه و با استفاده از

در پژوهش حاضر به منظور تفسیر داده‌های عددی حاصل از آزمون‌ها، انحراف معیار و انحراف از میانگین داده‌های هریک از آزمون‌ها در محیط نرم‌افزار Excel محاسبه و نمودارهای مرتبط با رهایش عصاره و استاندارد در محیط Graph Pad رسم گردید. همچنین معناداری داده‌ها با استفاده آنوا دوطرفه محاسبه شد.

نتایج

نمودار استاندارد عصاره‌ی *Silybummarianum* در حلال ایزوپروپانولدر طول موج ۳۱۰ نانومتر با استفاده از داده‌های اسپکتوفتومتری رسم و معادله‌ی خط عصاره‌ی *Silybummarianum* جهت بررسی میزان بارگذاری عصاره مشخص گردید (نمودار ۱). براساس این نمودار و با استفاده از رابطه (۱)، میزان بارگذاری عصاره‌ی *Silybummarianum* برای فرمولاسیون‌های F1، F2 و F3 به ترتیب $1/5 \pm 0.88$ ، 0.15 ± 0.84 و $1/2 \pm 0.62$ درصد محاسبه شد.

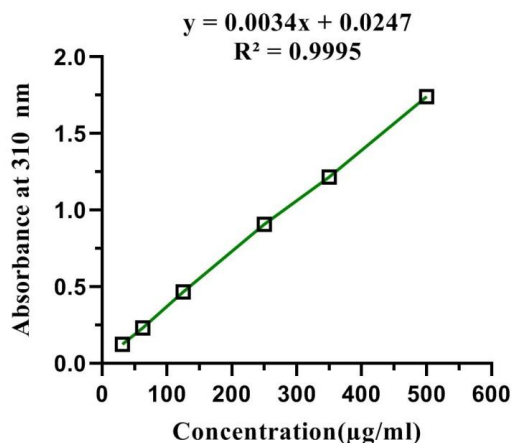


الگوی رهایش براساس نمودار کالیبراسیون عصاره در PBS (نمودار ۲) و با توجه به میزان جذب نمونه برداشت شده در فواصل زمانی مشخص در شرایط محیطی سلول سالم و سرطانی رسم گردید (نمودار ۵). بررسی سنتیک رهایش عصاره از نانو سامانه نشان می‌دهد که حد اکثر میزان رهایش عصاره در شرایط سلول سالم و سرطانی طی ۴۸ ساعت، به ترتیب ۴۲/۵ و ۴۸/۱۲ درصد گزارش شد. نتایج اختلاف معنی‌داری را در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری بین دمای ۳۷°C و ۴۲°C نشان می‌دهد ($P < 0.05$) که تأییدی بر نیمه هدفمند بودن الگوی رهایش سامانه لیبوزومی است (نمودار ۶).

۵/۶۲ و ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ از عصاره آزاد و با $5/62 \mu\text{g/ml}$ و ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ از لیپوزوم‌های حاوی عصاره در پلیت ۹۶ خانه برای ۴۸ ساعت تیمار گردیدند. پس از گذشت زمان تیمارهای مورد نظر، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از آن مایع رویی خارج شد و به منظور حل شدن کریستال‌های فورمازون، ۱۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید. جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از توسط دستگاه الیزاریدر ثبت و در نهایت با توجه به رابطه‌ی ۲ درصد زنده‌مانی سلول‌ها محاسبه و IC50 عصاره آزاد و سامانه لیبوزومی حاوی عصاره بر روی سلول‌های سرطانی SAOS-2 گزارش شد.

میانگین جذب نوری در محیط کشت - میانگین جذب نوری در گروه آزمون $\times 100$
میانگین جذب نوری در محیط کشت - میانگین جذب نوری در گروه کنترل
رابطه (۲)

نمودار ۱- نمودار استاندارد عصاره‌ی *Silybum marianum* در ایزوپروپانول همچنین با استناد به نمودار استاندارد عصاره‌ی *Silybum marianum* در PBS و معادله خط آن (نمودار ۲)، رهایش عصاره‌ی *Silybum marianum* از فرمولاسیون‌های F1، F2 و F3 طی ۴۸ ساعت اندازه‌گیری و نتایج آن در جدول ۲، گزارش شد. از میان سامانه‌های ساخته شده با فرمولاسیون‌های F1، F2 و F3 براساس میزان بارگذاری عصاره و الگوی رهایش عصاره، فرمولاسیون F2 به منظور بررسی و انجام مراحل بعدی آزمایش انتخاب گردید. نتایج حاصل از زتا سایزر نشان می‌دهد که اندازه و پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی ذرات سازنده‌ی سامانه‌ی حاصل از فرمولاسیون F2 به ترتیب $2/17 \text{ mV}$ ، 98 nm و 0.289 می‌باشد (نمودار ۳ و ۴).



نمودار ۲- نمودار استاندارد عصاره‌ی *Silybum marianum* در PBS

جدول ۲- رهائش فرمولاسیون‌های مختلف لیپوزومال حاوی عصاره‌ی *Silybum marianum*

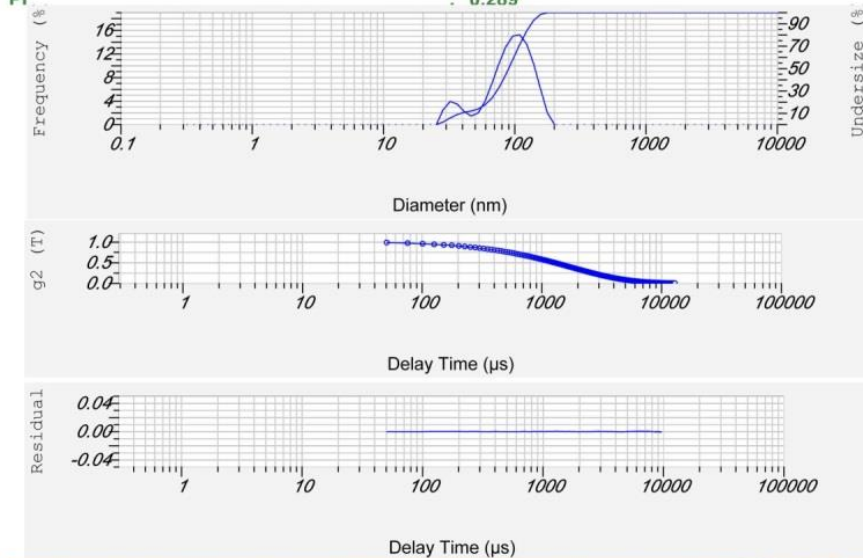
کد فرمول	% رهائش (۸h)	% رهائش (۲۴h)	% رهائش (۴۸h)
F1	۱۸/۲۴	۲۶/۱۴	۳۳/۷
F2	۳۲/۷	۳۶/۶	۴۲/۵
F3	۲۲/۱۴	۲۹/۱۷	۳۸/۰۸

Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	0.33	31.3 nm	3.5 nm	24.3 nm
2	0.77	109.9 nm	33.0 nm	116.3 nm
3	---	--- nm	--- nm	--- nm
Total	1.00	104.7 nm	36.5 nm	116.3 nm

Cumulant Operations

Z-Average : 98.0 nm
 PI : 0.289

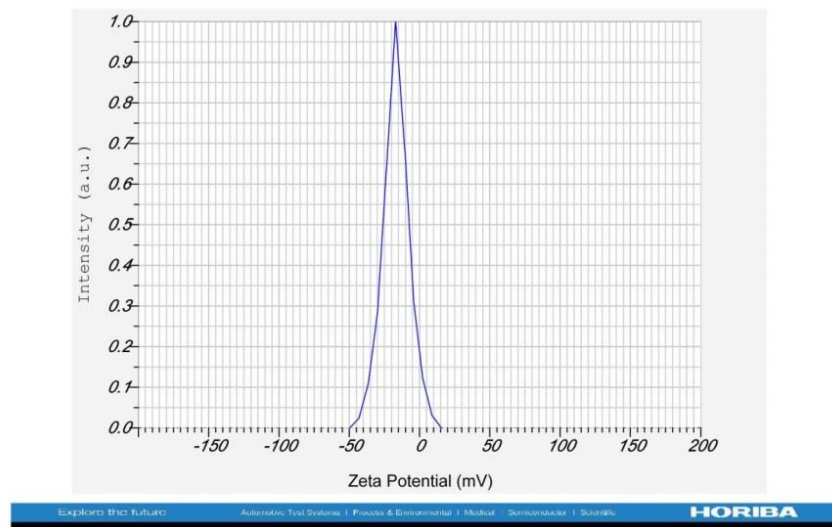


نمودار ۳- اندازه ذرات سامانه لیپوزومی حاوی عصاره‌ی *Silybum marianum*

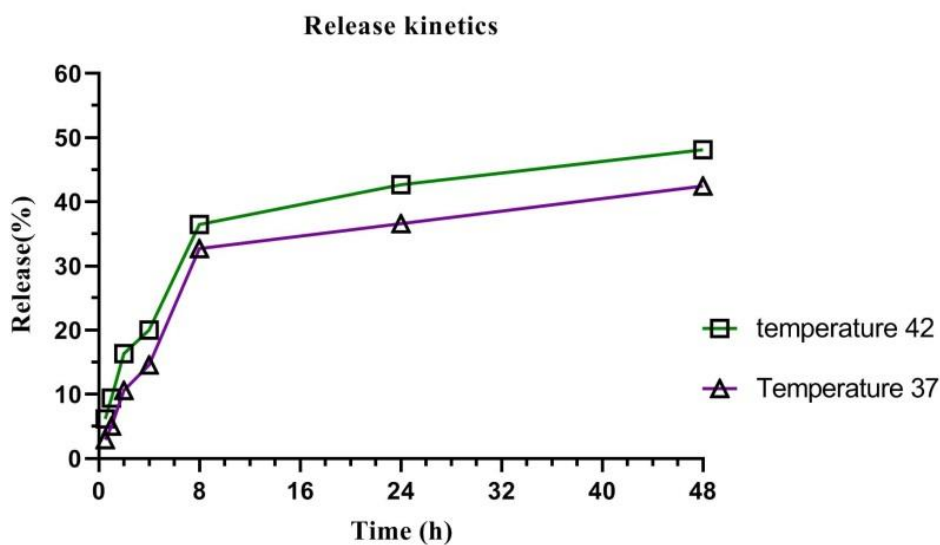
Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-17.2 mV	-0.000624 cm ² /Vs
2	-- mV	-- cm ² /Vs
3	-- mV	-- cm ² /Vs

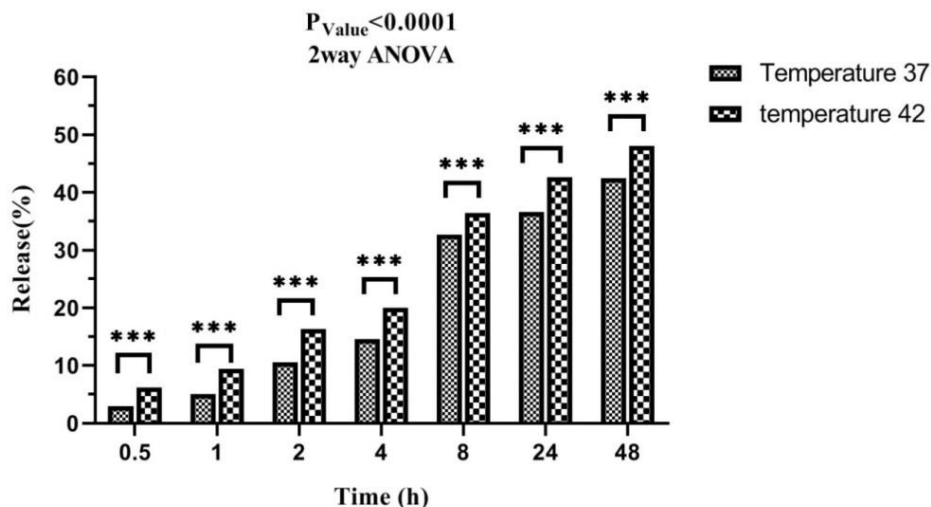
Zeta Potential (Mean) : -17.2 mV
 Electrophoretic Mobility Mean : -0.000624 cm²/Vs



نمودار ۴- پتانسیل زتای ذرات سامانه‌ی لیپوزومی حاوی عصاره‌ی *Silybum marianum*



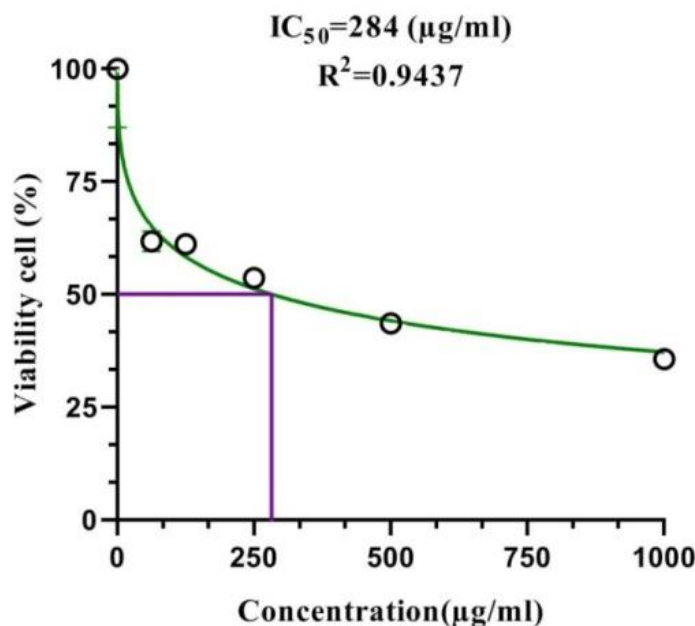
نمودار ۵- الگوی رهایش عصاره‌ی *Silybum marianum* از سامانه‌ی لیپوزومی F2



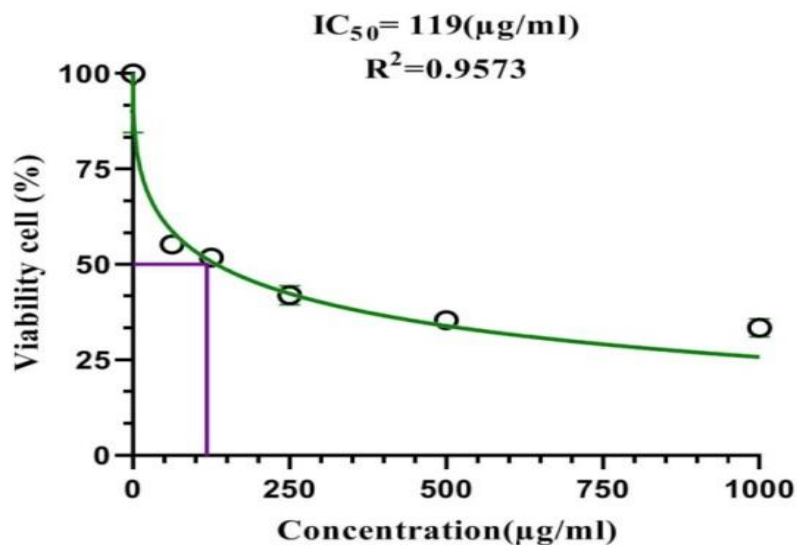
نمودار ۶- بررسی معنادار بودن الگوی رهائش عصاره‌ی *Silybum marianum* از سامانه لیپوزومی در زمان‌های مختلف در دمای ۳۷ و ۴۲ درجه بر پایه‌ی تست ۲- way ANOVA و معیار آماری $P < 0.05$ (***), عدم اختلاف معنادار (ns)

marianum و لیپوزوم فاقد عصاره در غلظت‌های مختلف بر رده سلول سالم فیروپلاست انسانی (HFF) سمیت ناچیزی دارد (نمودار ۹). میزان IC_{50} حاصل از عصاره آزاد و عصاره لیپوزومه بر رده سلولی SAOS-2 سرطان استخوان به ترتیب $284 \mu g/ml$ و $119 \mu g/ml$ می‌باشد (نمودار ۷ و ۸).

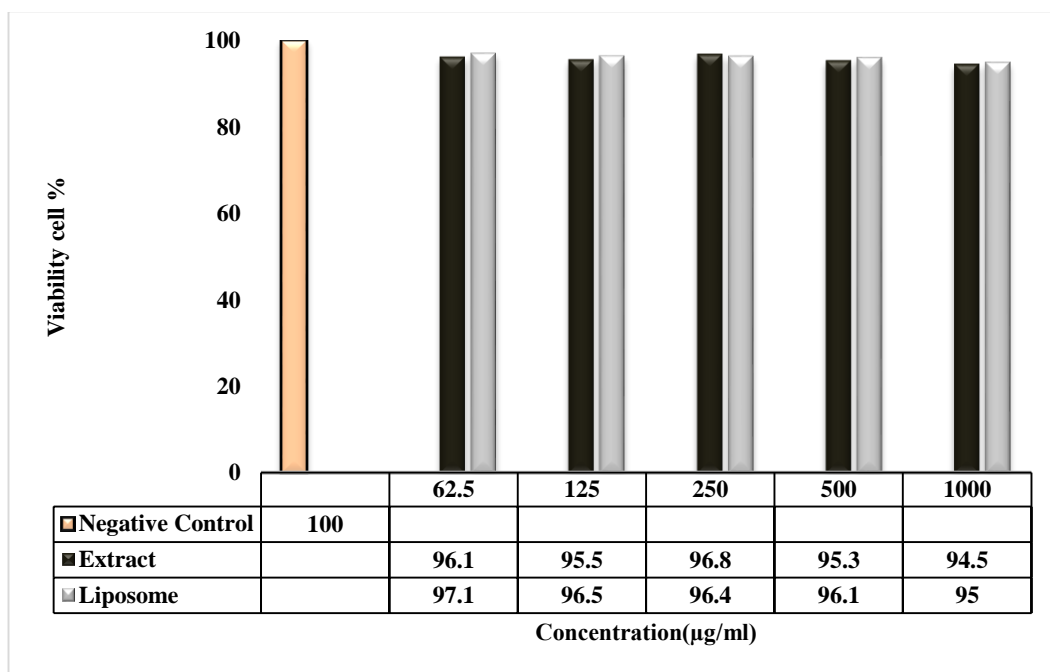
بررسی نتایج حاصل از تست سمیت سلولی ۴۸ ساعته نشان داد که سمیت عصاره‌ی بارگذاری شده نسبت به عصاره‌ی آزاد روی سلول سرطانی SAOS-2 با معناداری $P < 0.05$ بیشتر می‌باشد و سمیت سامانه خالی لیپوزومی بر رده سلولی سرطانی SAOS-2 در غلظت‌های مختلف اندک است (نمودار ۱۰). از سوی دیگر عصاره آزاد *Silybum*



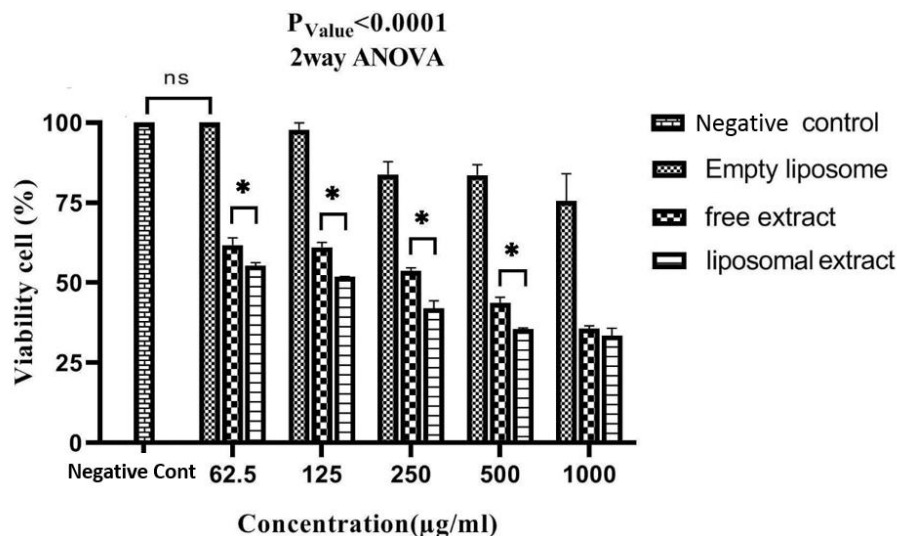
نمودار ۷- میزان IC_{50} عصاره‌ی آزاد *Silybum marianum* بر روی سلول‌های سرطانی SAOS-2



نمودار ۸- میزان IC_{50} نانوذرات لیپوزومال حاوی عصاره‌ی *Silybum marianum* بر روی سلول‌های سرطانی SAOS-2



نمودار ۹- بررسی سمیت عصاره‌ی *Silybum marianum* و لیپوزوم فاقد عصاره بر رده سلولی HFF



نمودار ۱۰- درصد زنده مانی سلول SAOS-2 در مواجه با عصاره‌ی آزاد، لیپوزوم خالی و لیپوزوم حاوی عصاره‌ی *Silybum marianum* طی ۴۸ ساعت با بررسی معنادار بودن سمیت سلولی در غلظت‌های مختلف براساس تست ۲-way ANOVA محاسبه و براساس معیار آماری P گزارش شد. (* $P < 0.05$ ، عدم اختلاف معنادار = ns)

بحث

هر اندازه که میزان درجه‌ی اشباع مواد تشکیل دهنده‌ی لیپوزوم افزایش یابد، درجه‌ی سختی و سیالیت غشای کاهش می‌یابد. در پژوهش حاضر از SPC60 و SPC80 به همراه کلسترول جهت ساخت سامانه‌های لیپوزومی استفاده شده است. در فرمولاسیون F1 برخلاف فرمولاسیون F2 از SPC80 استفاده شده است، که با توجه درجه اشباع بیشتر SPC80، سیالیت غشالیپوزوم‌های حاصل از فرمولاسیون F1 کاهش و سختی آن افزایش می‌یابد، که این خود می‌تواند دلیلی بر افزایش میزان درونگیری عصاره و کاهش رهایش عصاره از لیپوزوم گردد. در فرمولاسیون F2 برخلاف F1 از SPC60 که درجه‌ی اشباع کمتری نسبت به SPC80 دارد، استفاده گردیده است، بنابراین سیالیت غشا لیپوزوم‌های حاصل افزایش یافته و این تغییر در نوع فسفولیپید در کنار استفاده از درصد مناسبی از کلسترول، باعث بارگذاری مطلوب‌تر و رهایش کنترل شده‌تر عصاره از لیپوزوم شده است. در فرمولاسیون F3، اگرچه همانند فرمولاسیون F2 از نوع و درصد مشابهی از فسفولیپید استفاده شده است، ولی به دلیل افزایش درصد مولی کلسترول، میزان سیالیت غشای آن افزایش نامناسبی یافته و در نتیجه باعث کاهش درصد درونگیری عصاره در ذرات لیپوزومی شده است. استفاده از کلسترول بیش از اندازه نه تنها باعث ثبات بیشتر و افزایش میزان درونگیری و رهایش کنترل شده نمی‌شود بلکه باعث کاهش میزان بارگذاری و رهایش کنترل شده شده، 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 (۲۴-۲۶).

در این پژوهش عصاره‌ی *Silybum marianum* به منظور مقایسه سمیت سلولی عصاره لیپوزومه و غیر لیپوزومه بر رده‌ی سلول سرطانی استئوسارکوما انسانی، درون سامانه‌های لیپوزومی بارگذاری گردید و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی سامانه‌ی حاوی عصاره، مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین سمیت عصاره غیر لیپوزومه و لیپوزوم خالی بر رده‌ی سلولی سرطانی استئوسارکوما انسانی و فیروبللاست سالم انسانی سنجیده شد. نتایج پژوهش نشان داد که، سامانه لیپوزومی حاوی عصاره در مناسب‌ترین فرمولاسیون، دارای درصد بارگذاری $0.15 \pm 0.44/16$ ، اندازه ذرات ۹۸nm، پتانسیل زتای $-2.17mV$ و شاخص پراکندگی 0.289 است و رهایش عصاره از سامانه‌ی لیپوزومی حاصل از این فرمولاسیون، در شرایط سلول سرطانی و سالم، آهسته و پیوسته می‌باشد. بررسی تست سمیت نشان داد که عصاره لیپوزومه در تمامی غلظت‌ها نسبت به عصاره آزاد، از سمیت قابل توجهی بر رده‌ی سلولی SAOS-2 سرطان استخوان برخوردار است. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که سمیت سامانه لیپوزومی فاقد عصاره بر روی رده‌ی سلولی SAOS-2 و HFF و سمیت عصاره آزاد بر رده‌ی سلولی HFF بسیار ناچیز است. یکی از ویژگی‌های مهم و تأثیرگذار در ارزیابی سامانه‌های لیپوزومی درصد بارگذاری است که به عوامل مختلفی نظیر نوع لیپیدهای بکار رفته و درصد مولی هر یک، نوع و ماهیت ماده بارگذاری شده، روش ساخت و غیره بستگی دارد (۲۳). در پژوهش حاضر درصد بارگذاری عصاره در فرمولاسیون‌های مختلف، متفاوت بوده زیرا نوع و درصد لیپیدهای سازنده هریک از فرمولاسیون‌ها با دیگری متفاوت است. به طور کلی

ذرات نسبت به پژوهش Detoni از ویژگی بهتری برخوردار هستند. Celia و همکاران در سال ۲۰۱۳ سامانه موفق به ساخت سامانه‌ی لیپوزومی حاوی اسانس ترنج گردیدند، که همانند پژوهش حاضر بر بهبود خواص ضد سرطانی اسانس در حالت لیپوزومه تأکید نموده‌اند. همچنین گزارش نمودند که ذرات لیپوزومی حاصل، دارای پتانسیل زتای ۶- میلی‌ولت و اندازه ذرات 186 nm بودند (۳۳). Tao و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴، نانوذرات کیتوزان حاوی اسانس آویش تهیه نمودند که در این پژوهش میزان درون‌گیر شدن اسانس ۸۰ درصد و اندازه نانوذرات بین ۳۲۰۰ تا ۵۸۰ نانومتر گزارش شده است (۳۴).

حقیجو و همکاران در سال ۲۰۱۵ نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس گزنه در غلظت‌های مختلفی از فسفاتیدیل کولین و کلسترول تهیه نمودند که حداکثر میزان درون‌پوشانی اسانس ۶۸/۸۳٪ محدوده اندازه ذرات بین ۸۱ تا ۹۴ نانومتر و شاخص پراکندگی ذرات مانند پژوهش حاضر، ۰/۳ گزارش شده است (۳۵). نتایج پژوهش حقیجو به نتایج پژوهش حاضر بسیار نزدیک است.

حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۶ نانو ذرات لیپیدی حاوی اسانس زنیان تهیه نمودند که میزان انکپسولاسیون اسانس ۳۵/۶ درصد و اندازه نانوذرات حاوی اسانس 1/186 nm بوده است. همچنین پتانسیل زتای نانو ذرات در این پژوهش بین -۱ تا ۶/۷- گزارش شده است (۳۶). درصد بارگذاری بالاتر و اندازه ذرات کوچکتر و پتانسیل زتای بالاتر از جمله مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش حقیرالسادات و همکاران است.

قره نغده و همکاران در سال ۲۰۱۷، نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس مریم‌گلی با فرمول‌هایی تهیه نمودند که اندازه ذرات و شاخص پراکندگی ذرات به ترتیب در محدوده ۸۸-۸۲ نانومتر و ۰/۴۲ - ۰/۳۹ و میزان درون‌پوشانی اسانس در تمامی فرمول‌ها بالای ۷۰ درصد گزارش شده است (۳۷).

مجدی‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۸، نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس نعنای فلفلی تهیه نمودند که وزیکول‌های لیپوزومی حاوی اسانس با اندازه $247 \pm 13/39$ نانومتر، $2/7 \pm 61/38$ درصد میزان درصد بارگذاری، پتانسیل زتا $0/74 \pm 34/54$ میلی‌ولت و شاخص پراکندگی $0/01 \pm 0/32$ می‌باشد (۱۶). شاخص پراکندگی پایین‌تر، درصد بارگذاری بالاتر، بررسی فرمولاسیون‌های مختلف و اندازه ذرات کوچکتر، از مزایای پژوهش زیر نسبت به پژوهش مجدی‌زاده است.

برکت و همکاران در سال ۲۰۱۹، سامانه لیپوزومی حاوی عصاره‌ی *Nepeta persica* را به منظور اثرگذاری بر رده سلولی MCF-7، سرطان پستان تهیه نمودند و گزارش نمودند که درصد بارگذاری عصاره را $67/11$ ، اندازه ذرات را $9/116$ nm و پتانسیل زتای ذرات را $13/24$ میلی‌ولت می‌باشد. همچنین نتایج پژوهش برکت و همکاران

پتانسیل زتا (بار سطحی ذرات) از شاخصه‌های مهم و تأثیرگذار بر میزان پایداری سامانه‌های لیپیدی است که به نوع و درصد مولی لیپیدهای بکاررفته در ساختار لیپوزوم، نوع ماده بارگذاری شده و دما بستگی دارد (۲۳). این شاخصه فیزیکی ارتباط مستقیمی با پایداری ذرات دارد. هر چه میزان بار سطحی ذرات بیشتر باشد، نیروی دافعه بین آنها افزایش بیشتری یافته و از تجمع و رسوب ذرات جلوگیری می‌شود در نتیجه پایداری نانو سامانه‌ی لیپیدی افزایش می‌یابد. در پژوهش حاضر ذرات سامانه‌ی لیپیدی با برخورداری از پتانسیل زتای بالا و منفی، به نظر می‌رسد که از پایداری مناسبی برخوردار باشند (۲۹-۲۷).

رهایش عصاره از سامانه لیپوزومی در پژوهش حاضر در شرایط مشابه سلول سرطانی و سلول سالم، آهسته و پیوسته می‌باشد. همانند پژوهش‌های مشابه، رهایش عصاره در ساعات اولیه پس از رهایش، تند و نمودار رهایش، دارای شیب نسبتاً زیادی بوده ولی کم کم از شیب رهایش در نمودار کاسته می‌شود. همچنین نتایج رهایش نشان می‌دهد که عصاره لیپوزومه در دمای سلول سرطانی، نسبت به دمای سلول سالم از رهایش بالاتری برخوردار بوده است، که با توجه به معنادار بودن این اختلاف، می‌توان ادعا نمود که سامانه‌ی لیپوزومی در بصورت نیمه هدفمند عمل نموده و عصاره را بصورت مؤثرتری در اختیار سلول سرطانی قرار خواهد داد (۳۰).

بررسی تست سمیت نیز نشان می‌دهد که لیپوزوم بدون عصاره سمیت کمی بر سلول‌های سالم و سرطانی دارد. و از سوی دیگر عصاره‌ی لیپوزومه سمیت قابل توجهی نسبت به عصاره آزاد بر رده‌ی SAOS-2 سرطان استخوان داشته است. در این بین عصاره‌ی آزاد برای رده‌ی HFF سالم پوست سمیت ناچیزی دارد. با توجه به این نتایج می‌توان ادعا نمود که سمیت بالای عصاره‌ی لیپوزومه مربوط به لیپوزوم نبوده بلکه مربوط به شرایطی است که لیپوزوم برای رهایش و ورود عصاره به سلول سرطانی فراهم کرده است. به طور کلی بارگذاری مواد مؤثره درون سامانه‌های لیپیدی می‌تواند باعث افزایش اثر سمیت سلولی مواد مؤثر بر سلول‌های سرطانی شود. در این راستا کریمی مقدم و همکاران در سال ۲۰۱۹ سامانه‌ی نیوزومی حاوی سلیبینین را به عنوان یکی از مشتقات گیاه *Silybum marianum* بر رده‌ی سلول سرطانی MCF-7 مطالعه کرده و نشان دادند که تأثیر سلیبینین در حالت انکپسوله نسبت به حالت آزاد بیشتر است (۳۱).

تاکنون پژوهش‌های متعددی بر روی نانوحامل‌های لیپیدی حاوی ترکیبات گیاهی انجام گرفته است که به بخشی از آنها اشاره می‌شود: Detoni و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹، سامانه‌ی لیپوزومی حاوی اسانس *Zanthoxylum tingoassuiba* با استفاده از روش فیلم نازک تهیه نمودند که اندازه آن‌ها 937 nm و درصد درون‌پوشانی ۴۳/۷ درصد گزارش شد (۳۲). نتایج پژوهش حاضر از منظر بازده درون‌گیری و اندازه

5. Geller DS, Gorlick R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. *Clin Adv Hematol Oncol* 2010;8:705-18.
6. Rousseau J, Escriviou V, Perrot P, Picarda G, Charrier C, Scherman D, et al. Advantages of bioluminescence imaging to follow siRNA or chemotherapeutic treatments in osteosarcoma preclinical models. *Cancer gene therapy* 2010;17:387-97.
7. Ashrafi J, Dabidi Roshan V, Zolfagharzadeh F. Tissue toxicity induced by doxorubicin in rats: protective role of aerobic regular exercise. *The Journal of Urmia University of Medical Sciences* 2014;25:353-62.
8. Khazaei S, Keyhanian S, Monajati M, Ala S, Salehifar E. Drug utilization evaluation of high-dose methotrexate in a cancer center in north of Iran. *Tehran Univ Med J (TUMJ)* 2017;75:688-95
9. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. *Cancer Letters* 2008;267:133-64
10. Mathew S, Abraham TE. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *The journal Food and Chemical Toxicology* 2006;44:198-206
11. Vaquero MR, Serravalle LT, De Nadra MM, De Saad AS. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. *Food Control* 2010;21:779-85.
12. Mazarrae A, Mousavi-Nik SM, Leila F. Assessments of phenolic, flavonoid and antioxidant activity of aqueous, alcoholic, methanol and acetone extracts of thirteen medicinal plants. *Nova Biologica Reperta* 2018;4:299-309.
13. Fallah Huseini H, Hemati AR, Alavian SM. A review of herbal medicine: *Silybum marianum*. *Journal of Medicinal Plants* 2004;3:14-24.
14. Tamayo C, Diamond S. Review of clinical trials evaluating safety and efficacy of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn). *Integrative Cancer Therapies* 2007;6:146-57.
15. Gargari BP, Mobasser M, Valizadeh H, Asghari-Jafarabadi M. Effects of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (silymarin) extract supplementation on antioxidant status and hs-CRP in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytomedicine* 2015;22:290-6
16. Majdzadeh M, Rezaei Zarchi S, Movahedpour AA, Shahi Malmir H, Sasani E, Haghirsadat BF. A new strategy in improving therapeutic indexes of medicinal herbs: preparation and characterization of nano-liposomes containing *Mentha piperita* essential oil. *SSU_Journals* 2018;25:853-64.
17. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles-a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2006;5:561-73.
18. Hoseinizadeh MJ. An overview of the most important mechanisms and systems of targeted drug delivery. *Scientific Research Applied Biology* 2016;6:17-28
19. Rabani E, Behzadi R, Majdzadeh M, Haghirsadat B F. Fabrication of liposomal formulation containing paclitaxel and comparison of its toxicity with non-liposomal paclitaxel on MCF-7 breast cancer cell line. *JMJ* 2020;18:26-40
20. Shahi Malmir H, Kalantar SM, Sasani E, Asgari M, Majdzadeh M, Haghirsadat BF. Synthesis and optimization of niosomal carriers containing doxorubicin in order to achieve a final formulation with high potential in cancer cells temperature and acidity. *SSU_Journals*
21. Khoshchehreh R, Totonchi M, Baharvand H, et al. Investigation the ability to produce induced pluripotent cells from human pancreatic cancer xenografts. *J Arak Uni Med Sci* 2019;22:45-58.
22. Nassimiah H, Ghalamboran MR, Meimandi Pour A, Bayat M. The possibility of bone cell growth (Saos-2) on the coated scaffolds with Chitosan-alginate nanoparticles. 2015;28:413-9
23. Kulkarni SB, Betageri GV, Singh M. Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes. *Journal of Microencapsulation* 1995;12:229-46.

همانند پژوهش حاضر نشان داد که عصاره لیپوزومه شده نسبت به عصاره آزاد دارای سمیت بالاتری بر سلول‌های سرطانی می‌باشد (۳۸). هرچند اندازه ذرات کوچکتر با درصد بارگذاری بالاتر و پتانسیل زتای منفی‌تر لز مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش برکت است.

طالعی اردکانی و همکاران در سال ۲۰۲۰، ضمن ساخت سامانه لیپیدی نیوزومی حاوی فلاونوئید کوئرستین، اندازه، پتانسیل زتا، درصد بارگذاری و الگوی رهایش دارو را در شرایط سلول سالم به ترتیب ۱۷۰ nm، ۱/۶- میلی‌ولت، ۶۴/۴۹ درصد و آهسته گزارش نمودند (۳۹). پتانسیل زتای بالاتر، درصد بارگذاری بالاتر، و اندازه ذرات کوچکتر از مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش طالعی اردکانی است.

در پژوهش حاضر نانوسامانه‌های لیپوزومی حاوی عصاره‌ی خار مریم ساخته شد که دارای ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی قابل قبول، بارگذاری بالا و سنتتیک رهایش نیمه‌هدفمند بود. همچنین سمیت سلولی آن بر روی سلول‌های سرطانی و سلول‌های سالم اعمال شد و نتایج نشان داد که سمیت سلولی عصاره خارمریم در حالت لیپوزومه نسبت به حالت آزاد بر روی سلول‌های سرطانی SAOS-2 بیشتر بوده است. با این حال بر روی سلول‌های سالم فیبروبلاست انسانی تأثیر منفی نداشت. به عبارت دیگر نانوذرات لیپوزومال حاوی عصاره‌های گیاهی می‌تواند به عنوان حامل مناسبی جهت مقابله با سلول‌های سرطانی در حین ایمن ماندن سلول‌های سالم استفاده شود. با همهی مزایایی که برای نتایج پژوهش بیان شد، پژوهش حاضر مانند بسیاری از پژوهش‌ها، دارای کاستی‌هایی است. عدم استفاده از پلاسمای خون به جای بافر PBS در فرآیند رهایش، عدم بررسی شرایط اسیدیته سلول‌های سرطانی در فرآیند رهایش و عدم بررسی پایداری سامانه‌های لیپوزومی با گذشت زمان از جمله کاستی‌های پژوهش حاضر است، بنابراین انجام و برطرف نمودن این کاستی‌ها به پژوهشگران بعدی در این حوزه پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از تمامی کسانی که ما را در پیشبرد این پژوهش یاری رسانده‌اند، سپاسگزاریم.

References

1. Škottová N, Kazdová L, Oliyarnyk O, Večeřa R, Sobolová L, Ulrichová J. Phenolics-rich extracts from *Silybum marianum* and *Prunella vulgaris* reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats. *Pharmacological Research* 2004;50:123-30.
2. Shaker, E Mahmoud H, Mnaa S. Silymarin the antioxidant component and *Silybum marianum* extracts prevent liver damage. *Food and Chemical Toxicology* 2010;48:803-6. doi:10.1016/j.fct.2009.12.011
3. Hadaruga D, Hadaruga N. Antioxidant activity of hepatoprotective *Silymarin* and *Silybum marianum* L. extract. *Chem Bull* 2009;54:2.
4. Litman T, Druley T, Stein W, Bates S. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems their properties and clinical significance. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 2001;58:931-59.

24. Billah MM, Anthes JC. The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochemical Journal* 1990;269:281-91.
25. Pezeshky A, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, Moghadam M, Babazadeh A. Vitamin A palmitate-bearing nanoliposomes: Preparation and characterization. *Food Bioscience* 2016;13:49-55.
26. Ghanbarzadeh B, Pezeshky A, Hamishehkar H, Moghadam M. Vitamin A palmitate-loaded nanoliposomes: study of particle size, zeta potential, efficiency and stability of encapsulation. 2016;12:261-75
27. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2013;12:265-73. doi:10.4314/tjpr.v12i2.19
28. Zhao W, Song Zhuang X-RQ. Comparative study of the in vitro and in vivo characteristics of cationic and neutral liposomes. *International Journal of Nanomedicine* 2011;6:3087. doi:10.2147/IJN.S25399
29. Danhier F, Feron O, Préat V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of ControlledRelease* 2010;148:135-46. doi:10.1016/j.jconrel.2010.08.027
30. Sasani E, Shahi Malmir H, Daneshmand F, Majdzadeh M, Haghirsadat BF. A new study on synthesise and optimization of PEGylated LipoNiosomal nanocarriers containing curcumin for use in cancer chemotherapy. *SSU_Journals* 2018;26:528-41.
31. Karimi-Moghddam A, Nikounahad-Lotfabadi N, Haghirsadat BF, Majdzadeh 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;6:1-12.
32. Detoni CB, Hohlemweger SVA, Sampaio C, Barros TF. Essential oil from *Zanthoxylum tingoassuiba* loaded into multilamellar liposomes useful as antimicrobial agents. *J Microencapsul* 2009;26:684-91. doi:10.1080/02652040802661887
33. Celia C, Trapasso E, Locatelli M, Navarra M, Ventura CA, Wolfram J, et al. Anticancer activity of liposomal bergamot essential oil (BEO) on human neuroblastoma cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013;112:548-53. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.09.017
34. Tao F, Hill L, Peng Y, Gomes C. Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Sci Technol* 2014;59:247-55. doi:10.1016/j.lwt.2014.05.037
35. Haghjoo S, Ghanbarzadeh B, Hamishekar H, Asnaashari S, Dehghannia J. Evaluation of colloidal and antioxidant properties of nano liposomes containing nettle extract. *Innov Food Technol* 2015;2:11-23.[Persian].
36. Haghirsadat F, Azhdari M, Kalantar SM, Nadernezhad S, Teymorizadeh K, Yazdani M, et al. Strategy of Improvements in the rapetic index of medicinal herbs of Iranianin digenous: Synthesis and characterization of phospholipid lipid-based vesicles in corporated *Trachyspermum opticum*. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2016;24:468-78. [Persian].
37. Gharenaghadeh S, Samadlouie HR, Sowti M, Hamisekar H, Mokaram RR. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant properties of *Salvia* essential oil nano liposome (*Salvia multicaulis*). *JFST* 2017;14:271-82. [Persian].
38. Barakat F, Aboee-Mehrizi F, Haghirsadat BF, Dehghani Ashkezari M. Designing and optimization of liposomal nano-carriers containing *Nepeta persica* extract and study of its cytotoxicity on the breast cancer cell line (MCF-7) . *JSSU* 2019;27:1202-15.[Persian].
39. Talei-Ardakani N, Daneshmand F, Mirhoseini M, Ebrahimpour M, Majdzadeh M, Haghirsadat BF. Fabrication and characterization of physicochemical niosomal nano-carriers containing quercetinflavonoidsfor therapeutic purposes. *Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences* 2020;15:32-40. doi:10.22100/jkh.v15i1.2329



Fabrication of Liposomal Nanoparticles Containing Hydroalcoholic Extract of Silybum 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)

Mohammad Taebpour (M.Sc.)¹, Mohammad Majdizadeh (M.Sc.)², Bibi Fatemeh Haghirsadat (Ph.D.)^{3,4*},
Milad Akhlaghi (M.Sc.)⁵

1- Dept. of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

2- Nano-Biotech Foresight Company Biotechnology Campus, Science & Technology Park of Yazd, Yazd, Iran.

3- Assistant Professor, Medical nanotechnology & tissue engineering research center, Yazd reproductive sciences institute, shahid sadoughi university of medical sciences, Yazd, Iran.

4- Dept. of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

5- Dept. of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

Received: 8 April 2021, Accepted: 28 January 2021

Abstract:

Introduction: The aim of this study was to fabricate nanoliposomes containing Silybum marianum extract and evaluating effect of its toxicity on SAOS-2 cancer cell line and evaluating effect of the toxicity of free extract and empty liposomes on HFF cell line.

Methods: Three liposomal systems containing extract with different molar percentages of soybean phosphatidylcholine (60% and 80%) with cholesterol were prepared by thin film. Then the most suitable formulation was selected according to the loading percentage and release rate. The release pattern of the extract from the selected formulation was evaluated and the size, and surface charge of the particles were investigated. Finally, the toxicity of the selected system containing the extract, and the free extract and the system without the extract on the SAOS-2 cell line, and the toxicity of the free extract and the essential oil-free system on the HFF cell line were measured.

Results: amount of extract loading in the selected formulation, particle size, polydispersity index, and zeta potential for the selected formulation were 84.16 ± 0.15 , 98nm, 0.286 and -17.2mV, respectively. The release of the extract is slow at temperatures similar to those of healthy and cancer cells. Also, liposome extract had more toxicity on SAOS-2 cell line than free extract, and liposome-free extract and free extract had less toxicity on HFF cell line.

Conclusion: Based on the results, the liposomal system containing the extract, with its physicochemical properties and appropriate toxicity on the SAOS-2 cell line, can be a suitable carrier for the delivery of plant compounds to target cells.

Keywords: Liposome, Silybum marianum L, Osteosarcoma, Fibroblasts, Nanoparticle.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: BF. Haghirsadat, Email: Fhaghirsadat@gmail.com

Citation: Taebpour M, Majdizadeh M, Haghirsadat BF, Akhlaghi M. Fabrication of liposomal nanoparticles containing hydroalcoholic extract of Silybum 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 & Health in Basic Medical Sciences 2021;16(1):61-73.