



ساخت نانو حامل‌های نیوزومی حاوی عصاره آبی Hedera helix و مقایسه سمیت عصاره

آزاد و عصاره‌ی نیوزومه بر رده‌ی سلولی HT29 سرطان کولون

فاطمه پرنیان^۱، سیدحسین حکمتی‌مقدم^۲، محمد مجدی‌زاده^۳، علی جبالی^۴، بی‌بی فاطمه حقیرالسادات^{۵*}

- ۱- کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی - گروه زیست فناوری - پردیس بین‌الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد - یزد - ایران.
- ۲- دانشیار - گروه علوم آزمایشگاهی - دانشکده پیراپزشکی - دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد - یزد - ایران.
- ۳- کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی - گروه زیست فناوری - شرکت ریز زیست فناوران فردانگر - پارک علم و فناوری یزد - یزد - ایران.
- ۴- استادیار - گروه علوم آزمایشگاهی - دانشکده پیراپزشکی - دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد - یزد - ایران.
- ۵- استادیار - مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت - پژوهشکده علوم تولید مثل - دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد - یزد - ایران.
- ۶- گروه علوم و فنون نوین - دانشکده پیراپزشکی - دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد - یزد - ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۲۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۰۸

چکیده

مقدمه: نیوزوم حاملی لیبیدی هست که می‌تواند برخی چالش‌های پیش روی رسانش داروهای گیاهی به بافت‌ها را برطرف نماید. هدف از پژوهش حاضر ساخت و بررسی فیزیوشیمیایی نانوحامل‌های نیوزومی حاوی عصاره عشقه و ارزیابی سمیت آن بر رده سلولی HT29 سرطان کولون است.

مواد و روش‌ها: دو فرمولاسیون نیوزومی F0 (۳۰ درصد کلسترول و ۷۰ درصد توتین ۶۰) و F1 (۳۰ درصد کلسترول و ۷۰ درصد اسپن ۶۰) حاوی عصاره عشقه با استفاده از روش فیلم لایه نازک ساخته شد. سپس با توجه به میزان بارگذاری دارو، یکی از فرمولاسیون‌ها انتخاب گردید. الگوی رهایش دارو در شرایط سلول سالم و سرطانی، اندازه و بار سطحی نانو ذرات (با استفاده از DLS) و شکل ظاهری نانو ذرات (با استفاده از SEM) فرمولاسیون منتخب بررسی شد. در پایان سمیت سامانه نیوزومی حاوی عصاره و عصاره آزاد بر رده سلولی HT29 با استفاده از روش MTT بررسی شد و ورود سامانه‌ی نیوزومی به سلول‌های HT29 با استفاده از رنگ‌آمیزی سامانه و سلول، مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: درصد بارگذاری عصاره، اندازه و پتانسیل زتا برای فرمولاسیون منتخب (F1) به ترتیب $95/43 \pm 2/43$ درصد، $132/5nm$ و $41/47 \pm 2/69mV$ می‌باشد. رهایش دارو از سامانه نیوزومی طی ۴۸ ساعت در شرایط سلول سالم و سرطانی آهسته می‌باشد. شکل ظاهری نانو ذرات صاف و کروی بوده و عصاره نیوزومه در مقایسه با عصاره آزاد سمیت بیشتری بر روی رده سلولی HT29 سرطان کولون داشته است.

نتیجه‌گیری: فرمولاسیون نیوزومی حاصل از پژوهش حاضر را با توجه به برخورداری از ویژگی‌های فیزیوشیمیایی مناسب، می‌توان جهت انجام تحقیقات بیشتر در زمینه سرطان کولون پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی: نیوزوم، نانو حامل، سرطان کولون، رده سلولی HT29، عصاره Hedera helix.

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

ارجاع: پرنیان فاطمه، حکمتی‌مقدم سیدحسین، مجدی‌زاده محمد، جبالی علی، حقیرالسادات بی‌بی فاطمه. ساخت نانو حامل‌های نیوزومی حاوی عصاره آبی Hedera helix و مقایسه سمیت عصاره آزاد و عصاره‌ی نیوزومه بر رده‌ی سلولی HT29 سرطان کولون. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۳۹۹؛ ۱۵(۳): ۳۱-۴۵.

مقدمه

سرطان بیماری کشنده‌ای است که بر اثر رشد و تقسیم غیرعادی سلول‌ها در پی تغییرات ژنتیکی ایجاد می‌شود (۱). این بیماری در کشورهای توسعه‌یافته دومین عامل مرگ و میر و در کشورهای کمتر توسعه‌یافته، سومین عامل مرگ و میر افراد به شمار می‌آید (۲). سرطان کولون نیز یکی از سرطان‌های شایع دستگاه گوارش است که سالانه در سرتاسر جهان حدود یک میلیون مورد جدید ابتلا به این سرطان شناسایی می‌شود که حدود نیمی از آنها به مرگ منتهی می‌شود (۳). به گونه‌ای که در سال ۲۰۰۸ حدود ۱/۲ میلیون مورد جدید از ابتلا به این بیماری در دنیا شناسایی و حدود ۶۰۰ هزار مورد مرگ ناشی از این بیماری گزارش شده است (۴). بررسی‌های آماری نشان می‌دهد که شیوع بیماری سرطان کولون در کشورهای توسعه‌یافته نسبت به کشورهای دیگر بیشتر می‌باشد (۴ و ۵). سرطان کولون هرچند در ایران از شیوع بالایی برخوردار نیست، ولی میانگین سن ابتلا به آن در ایران نسبت به میانگین جهانی پایین‌تر می‌باشد (۶ و ۷). این بدخیمی در ابتلا نمودن مردان و زنان ایرانی به سرطان، به ترتیب رتبه‌ی سوم و چهارم را به خود اختصاص داده است (۸). افزایش سن، بیماری‌های التهاب روده، کمبود فیبرهای غذایی، سابقه ادنوم، سندرم‌های پولیپوز و غیره از جمله فاکتورهای افزایش‌دهنده‌ی خطر ابتلا به سرطان کولون است (۹ و ۱۰). در درمان بیماری سرطان کولون با توجه به مرحله و میزان گسترش آن به‌طور کلی از روش‌هایی نظیر جراحی، پرتو درمانی و شیمی درمانی استفاده می‌شود (۱۱). در شیمی درمانی برای درمان سرطان کولون معمولاً از داروهایی با پایه ۵-فلوراوراسیل (FU-۵) استفاده می‌شود که با از بین بردن سلول‌های سرطانی از پیشرفت این بیماری جلوگیری می‌کند (۱۲ و ۱۳). هرچند این داروها معمولاً از گسترش سرطان جلوگیری می‌کنند ولی با ایجاد عوارض جانبی نظیر تهوع، زخم‌های دهانی، اسهال، استفراغ و کم‌اشتهایی از کیفیت زندگی افراد مبتلا به سرطان طی شیمی درمانی می‌کاهند (۱۴). از این رو استفاده از ترکیبات سیتوتوکسیک با اثر بیشتر و عوارض کمتر، نظیر ترکیبات استخراج شده از گیاهان، جهت درمان سرطان ضروری است.

گیاه عشقه با نام علمی *Hedera helix* از خانواده *Araliaceae* است. این درختچه بالارونده و همیشه سبز، بومی اروپا بوده و به دلیل رشد فزاینده آن، به سایر نقاط دنیا انتقال داده شده و پراکندگی فراوانی دارد. برگ‌های این گیاه، متناوب، گوشتی، پایا و چرمی هستند و در برش عرضی آن علاوه بر اپیدرم بالایی و زیرین، میانبرگ‌های نرده‌ای به‌صورت دو ردیف از سلول‌های به هم فشرده و میانبرگ اسفنجی به‌صورت سلول‌هایی با فضای بین سلولی زیاد دیده می‌شود (۱۷-۱۵).

ساقه این گیاه، چوبی و در برش عرضی آن همانند بسیاری از گیاهان دولپه به‌ترتیب از خارج به داخل، روپوست، بافت کلانشیم، بافت پارانشیم، درون پوست و استوانه مرکزی قابل مشاهده می‌باشد (۱۶). بررسی‌های فیتوشیمیایی نشان می‌دهد که در عصاره گیاهان جنس عشقه ترکیبات شیمیایی نظیر آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها وجود دارد که برخی از آنها دارای خواص بیولوژیکی فراوانی از جمله ویژگی‌های آنتی‌اکسیدان و ضدتوموری هستند (۲۲-۱۷). هرچند امروزه به دلیل آشکار شدن اثرات جانبی فراوان ترکیبات دارویی صنعتی، استفاده از ترکیبات گیاهی گسترش چشمگیری نموده است، ولی استفاده از گیاهان و ترکیبات آن با چالش‌هایی نظیر اثرگذاری پایین بر بافت‌های هدف و اکسیدپذیری بالا روبرو است (۲۱ و ۲۲). بنابراین استفاده از حامل‌هایی که بتواند مشکلات موجود در استفاده از ترکیبات گیاهی را برطرف و یا کاهش دهد، ضرورتی اجتناب‌ناپذیر است.

نیوزوم‌ها حامل‌هایی در مقیاس نانو هستند که که توانایی انباشته کردن طیف وسیعی از داروهای آب دوست، آب گریز و دوگانه دوست را دارند. این حامل‌های دارویی که از خود تجمعی سورفکتانت‌های غیر یونی در محیط آبی، شکل می‌گیرند و ساختاری دو لایه را ایجاد می‌کنند، باعث هدایت اختصاصی‌تر دارو به بافت هدف نظیر تومورها و بافت‌های التهابی شده، در نتیجه غلظت تجمعی و تأثیر درمانی دارو افزایش یافته و عوارض جانبی کاهش پیدا می‌کند. تهیه و ذخیره‌سازی آسان، زیست تخریب‌پذیری، زیست سازگاری، غیر ایمونژن بودن، آزاد سازی کنترل شده‌ی دارو و افزایش پایداری دارو از جمله مزایای این نانوحامل می‌باشد (۲۵-۲۳).

هدف از پژوهش حاضر طراحی و ساخت نانوحامل‌های نیوزومی حاوی عصاره *Hedera helix* می‌باشد که طی آن این سامانه‌های حاوی عصاره از منظر میزان درون‌گیری دارو، الگوی رهایش ۴۸ ساعته، اندازه ذرات، بار سطحی (پتانسیل زتا)، شکل ظاهری مورد بررسی قرار گرفته و در پایان میزان سمیت عصاره‌ی آزاد و نانونیوزوم‌های حاوی عصاره و بر رده‌ی سلولی HT29 سرطان کولون ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر نوعی مطالعه‌ی آزمایشگاهی بوده که در دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد با کد اخلاق IR.SSU.MEDICINE.REC.1395.296 به انجام رسیده است.

الف) مواد شیمیایی

تویین ۶۰، اسپن ۶۰، کلسترول و ایزوپروپیل، کلروفرم متعلق به شرکت Merck آلمان و قرص Phosphate Buffered

(هایدولف، آلمان) با دور ۱۵۰rpm حل شده و تحت شرایط خلأ، فیلم نازک خشک هریک از فرمولاسیون‌های F0 و F1 تهیه گردید.

هیدراته کردن فیلم نازک لیپیدی و افزودن عصاره: هیدراته کردن با افزودن مقدار مشخصی آب مقطر استریل به همراه عصاره Heder helix، طی مدت ۶۰ دقیقه و در دمای ۵۰°C انجام گردید. سپس نانوذرات تهیه شده، با استفاده از سونیکیت حمامی به مدت ۲۰ دقیقه و در نهایت با استفاده از سونیکیت پروبی کاهش سایز داده شد (۲۲).

جدول ۱- ترکیبات و درصد مولی هر یک از آنها به‌منظور ساخت فرمولاسیون‌های F0 و F1

نام	درصد مولی	نوع سورفکتانت	نوع پایدار کننده	درصد مولی پایدار کننده
فرمولاسیون F0	۷۰	توئین ۶۰	کلسترول	۳۰
F1	۷۰	اسپن ۶۰	کلسترول	۳۰

ت) بررسی ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی نانوسامانه نیوزومی

برای بررسی میزان عصاره بارگذاری شده در حامل نیوزومی حاصل از فرمولاسیون‌های F0 و F1 ابتدا هریک از سامانه‌های نیوزومی حاصل از فرمولاسیون‌های F0 و F1 را بعد از کاهش سایز وارد کیسه دیالیز نموده و به مدت یک ساعت درون بشری با ۴۵۰ cc از بافر PBS و در دمای ۴°C قرار داده شد تا عصاره آزاد و درون‌گیری نشده حذف گردد. سپس نمونه نیوزومی حاوی عصاره با استفاده از حلال ایزوپروپیل، رقیق و زمان کافی داده شد تا نیوزوم شکسته شده و دارو آزاد شود. در ادامه میزان جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ماکزیمم عصاره Heder helix تعیین گردید و با توجه به معادله خط تعیین شده در نمودار استاندارد عصاره در حلال ایزوپروپیل و رابطه ۱، میزان بارگذاری عصاره تعیین گردید (۲۲).

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

رابطه (۱)

رهایش عصاره از نیوزوم‌ها به‌وسیله روش دیالیز در بافر PBS و آب دیونیزه به مدت ۴۸ ساعت در شرایط مشابه سلول سرطانی (۴۲°C و pH=۵/۴ و سلول سالم (۳۷°C و pH=۷/۴) مورد سنجش قرار گرفت. جهت بررسی فرآیند رهایش، میزان ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون نمونه، به‌صورت جداگانه درون دو کیسه دیالیز منتقل گردید. یکی از کیسه‌های دیالیز حاوی نمونه را در فالكون محتوی PBS و دیگری را در فالكون محتوی آب دیونیزه قرار داده و با ایجاد شرایط دمایی یادشده استیرر گردید. سپس در فواصل زمانی متفاوت نسبت به نمونه‌برداری از محیط اطراف کیسه‌های دیالیز اقدام و به همان نسبت بافر یا آب دیونیزه تازه جایگزین می‌گردد. سپس میزان جذب نمونه‌های برداشت شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین و در انتها با بهره‌گیری از معادله خط به‌دست آمده از نمودار استاندارد عصاره

Saline(PBS) متعلق به شرکت سیگما ایالات متحده آمریکا تهیه و خریداری شد.

ب) عصاره‌گیری

گیاه Heder helix در اردیبهشت ماه از شهرستان یزد جمع‌آوری و توسط متخصصین منابع طبیعی دانشگاه یزد تأیید گردید. عمل عصاره‌گیری از برگ این گیاه انجام گرفت که خلاصه آن بدین شرح است: ابتدا برگ‌های گیاه با آب شست و شو داده شده و در سایه خشک شدند. در مرحله بعد برگ‌های خشک شده با استفاده از آسیاب برقی پودر گردید. سپس ۲۰ گرم از پودر خشک شده برگ گیاه را درون ظرفی ریخته و به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و به مدت ۴ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. پس از آن محتویات ظرف بر روی پارچه‌ای به‌منظور فیلتراسیون و مایع عبور کرده از فیلتر پارچه‌ای جمع‌آوری شد. سپس مایع جمع‌آوری شده را به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ نموده و به پلیت شیشه‌ای منتقل شد. پلیت به‌مدت ۳ شبانه روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا آب موجود در مایع به‌طور کامل تبخیر شود.

ب) بررسی ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی عصاره Heder helix

اسپکتروفتومتری عصاره برای تعیین طول موج ماکسیمم و رسم نمودار استاندارد از عصاره در ایزوپروپیل، PBS و آب دیونیزه ابتدا استوک عصاره در حلال آبی در غلظت‌های متفاوتی تهیه گردید و طیف جذبی آن در بازه طول موج ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر رسم گردید. سپس بیشترین میزان جذب از این عصاره که در تمامی طیف‌ها تکرارپذیر بوده است بررسی و طول موج ماکزیمم عصاره انتخاب گردید. به‌منظور رسم نمودار کالیبراسیون عصاره و به‌دست آوردن معادله خط آن، غلظت‌های متعدد (W/V) از عصاره به روش سری استاندارد در ایزوپروپیل، PBS و آب دیونیزه ساخته شد. سپس جذب نوری آنها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ماکزیمم و تکرارهای ۳ تایی (محدوده تابعیت رابطه جذب و غلظت از قانون Beer-Lambert) اخذ گردید و در نهایت، نسبت به رسم نمودار، به‌دست آوردن معادله خط و ضریب رگرسیون اقدام گردید (۲۲).

پ) طراحی فرمولاسیون‌های نیوزومی و اقدام جهت آماده‌سازی و سنتز آن

در مطالعه حاضر با توجه به امکانات موجود از روش فیلم نازک به‌منظور ساخت ۲ سامانه‌ی نیوزومی (F0 و F1) استفاده شد که خلاصه آن به شرح زیر است:

ساخت فیلم نازک لیپیدی: کلسترول و اسپن ۶۰ مطابق با درصد مولی جدول ۱ به‌منظور ساخت فرمولاسیون F1 و کلسترول و توئین ۶۰ مطابق با درصد مولی جدول ۱ جهت ساخت فرمولاسیون F0 به‌صورت جداگانه در حلال کلروفرم و در دمای ۴۰°C بر روی روتاری

شده، استفاده گردید. در مرحله بعدی سلول‌های توموری را تریپسینه نموده، و حدود 105 Cells/mL از سوسپانسیون سلولی HT29 به همراه ۳ mL محیط کشت به چاهک‌های پلیت منتقل کرده و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت انجام می‌گیرد. سپس ۱۰ μl از سامانه نیوزومی که دارای عصاره و رنگ Dil است را به هر چاهک اضافه کرده و حدود ۳ تا ۴ ساعت زمان داده تا عمل تیمار صورت گیرد. در ادامه مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از اتانول ۹۵٪ برای تثبیت سلول‌ها به هر چاهک اضافه و سپس در حدود ۱۵ μl رنگ DAPI برای رنگ‌آمیزی هسته با غلظت ۱ μg/ml بر روی لام پخش و اسمیر می‌شود و در نهایت بررسی نمونه‌ها جهت فرآیند Uptake توسط میکروسکوپ فلورسنس انجام می‌گیرد.

نتایج

طیف جذبی عصاره گیاه *Hedera helix* در بازه‌ی ۲۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتری تهیه و رسم گردید (نمودار ۱). بررسی این طیف جذبی نشان می‌دهد که عصاره *Hedera helix* در طول موج ۲۴۸ nm دارای بیشترین جذب می‌باشد.

نمودار استاندارد برای عصاره در حلال ایزوپروپیل خطی راست با معادله‌ی $Y = 0.003X + 0.131$ است که دارای ضریب تعیین (R^2) ۰/۹۹۵۸ می‌باشد (نمودار ۲). این معادله به صورت درجه یک بوده و رابطه‌ی خطی میان جذب عصاره و غلظت آن را تأیید می‌کند. نمودار استاندارد عصاره *Hedera helix* در PBS، خطی راست با معادله درجه یک $Y = 0.004X + 0.008$ و ضریب تعیین ۰/۹۹۸۸ است (نمودار ۳).

همچنین نمودار استاندارد عصاره *Hedera helix* در آب دیونیزه رسم گردید و معادله خط راست آن که نوعی تابع درجه یک می‌باشد، به صورت $Y = 0.055X - 0.135$ با ضریب تعیین ۰/۹۹۵۸ محاسبه شد (نمودار ۴).

درصد بارگذاری عصاره *Hedera helix* درون سامانه‌های نیوزومی حاصل از فرمولاسیون‌های F0 و F1 و انتخاب فرمولاسیون مناسب با استناد به معادله خط نمودار استاندارد عصاره *Hedera helix* در ایزوپروپیل و با استفاده از رابطه ۱، میزان بارگذاری عصاره *Hedera helix* در سامانه نیوزومی برای فرمولاسیون‌های F0 و F1 به ترتیب $1.62 \pm 46/86$ و $2.43 \pm 95/43$ محاسبه گردید. با توجه به بارگذاری بیشتر عصاره در سامانه‌ی نیوزومی حاصل از فرمولاسیون F1، سامانه نیوزومی حاصل از فرمولاسیون F1 انتخاب و مورد بررسی‌ها و تجزیه و تحلیل‌های بعدی (بررسی رهائش، اندازه ذرات، پتانسیل زتا، شکل ظاهری و سمیت) قرار گرفت.

در PBS و آب دیونیزه نسبت به اندازه‌گیری غلظت عصاره در زمان‌های مختلف و رسم نمودار رهائش در PBS و آب دیونیزه اقدام گردید (۲۲ و ۲۶).

پتانسیل زتای (Zeta-Potential) فرمولاسیون‌های نیوزومی و اندازه آنها، با استفاده از دستگاه زتا سایزر شرکت Malvern Instruments مدل Nano-ZetaSizer ES در دمای اتاق و زاویه ۹۰° اندازه‌گیری گردید.

مقدار ۲۵ μl از نمونه نیوزومی بر روی یک لام ریخته و محلول در مجاورت هوا خشک شد. نمونه‌ها چند ثانیه با طلا پوشش داده شده تا رسنا شوند. سپس مورفولوژی سطحی نانوحامل‌ها (زبری، شکل، صافی و توده‌ای شدن) با استفاده از دستگاه Scanning Electron Microscopes (SEM) بررسی گردید.

ث) آنالیز سلولی

در این مطالعه از رده سلولی HT29 سرطان کولون استفاده شد که از بانک سلولی انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه گردیده بودند. سلول‌های این رده‌ی سلولی در فلاسک‌های یک بار مصرف کشت سلول در محیط کشت DMEM (Thermofisher - GIBCO) (U.S.A) غنی‌شده با Glutamine، ۱۰٪ درصد FBS، در دمای ۳۷°C با فشار ۵٪ نت از CO2 و ۹۵٪ بخار آب کشت داده شد.

سمیت سلولی با روش MTT برای فرمولاسیون مطالعه شده به کار گرفته شد. به منظور اندازه‌گیری سمیت، سلول‌های HT29 سرطان کولون به طور جداگانه با غلظت ۱۰۴ در هر چاهک در پلیت ۹۶ تایی به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نیوزوم بدون عصاره به مدت ۴۸ ساعت گردیدند تا میزان سمیت نیوزوم فاقد عصاره بررسی گردد. همچنین سلول‌ها با ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نیوزوم‌های حاوی عصاره و ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره آزاد به مدت ۴۸ ساعت تیمار گردیدند. پس از گذشت زمان تیمارهای موردنظر، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از آن مایع‌رویی 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 الایزا ریدر ثبت و در نهایت با توجه به رابطه‌ی زیر درصد زنده‌مانی سلول‌ها محاسبه شد (۲۷).

رابطه ۲:

میانگین جذب نوری در محیط کشت - میانگین جذب نوری در گروه آزمون

میانگین جذب نوری در محیط کشت - میانگین جذب نوری در گروه کنترل

جهت بررسی ورود سامانه‌ی ساخته شده به درون سلول‌های HT29، از پلیت‌های ۶ خانه‌ای که در کف هر کدام یک عدد لامل قرار داده

بارگذاری عصاره درون سامانه نیوزومی باعث مثبت‌تر شدن بار سطحی سامانه حدود ۵ میلی‌ولت شده است (شکل ۳ و ۴).

تصاویر حاصل از SEM (شکل ۵) حاکی از آن است که مورفولوژی نانوذرات حاصل از فرمولاسیون F1، کروی بوده و سطح آنها صاف و هموار است و همچنین نانوذرات هیچ‌گونه تجمع ناخواسته‌ای که سبب آگلومره شدن و ایجاد رسوب و ناپایداری گردد، نداشته است.

میزان سمیت سامانه‌ی نیوزومی فاقد عصاره، عصاره بارگذاری شده و عصاره‌ی آزاد (بارگذاری نشده) بر رده‌ی سلولی HT29 سرطان کولون بروش MTT محاسبه و در نمودار ۷ به صورت خلاصه گزارش شده است.

نتایج حاصل از آزمون MTT نشان می‌دهد که سامانه نیوزومی فاقد عصاره سمیت بسیار ناچیزی بر رده سلولی HT29 دارد. زیرا بر اثر تیمار سلول‌ها طی ۴۸ ساعت با این نانو سامانه فاقد عصاره حدود ۹۶/۵ درصد سلول‌ها زنده مانده‌اند.

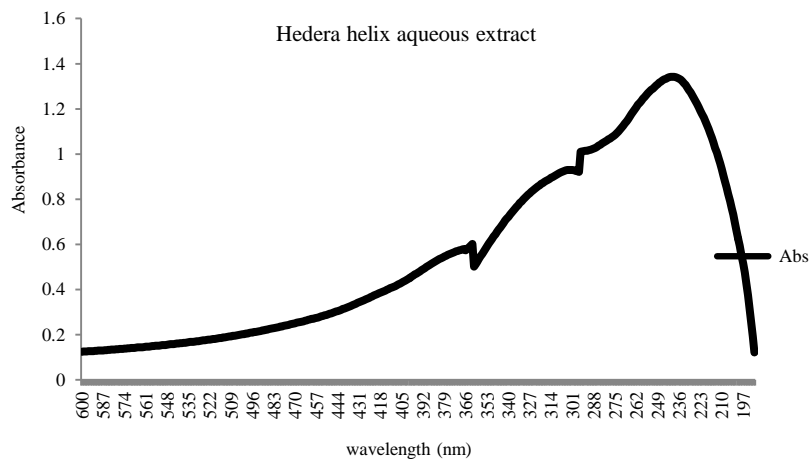
عصاره بارگذاری شده در سامانه‌ی نیوزومی حاصل از فرمولاسیون F1، نسبت به عصاره آزاد (نیوزومه نشده) در غلظت‌های مشابه، سمیت بیشتری بر رده‌ی سلولی HT29 دارد.

سمیت عصاره‌ی آزاد (نیوزومه نشده) و عصاره نیوزومه شده بر رده‌ی سلولی HT29، وابسته به غلظت بوده به گونه‌ای که با کاهش غلظت عصاره آزاد از ۱۰۰ به ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، میزان مرگ سلول‌ها از ۷۰ به ۲۳/۵ درصد کاهش یافته است و با کاهش غلظت نیوزوم حاوی عصاره از ۱۰۰ به ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، میزان مرگ سلول‌ها از ۸۲ به ۴۲ درصد کاهش یافته است.

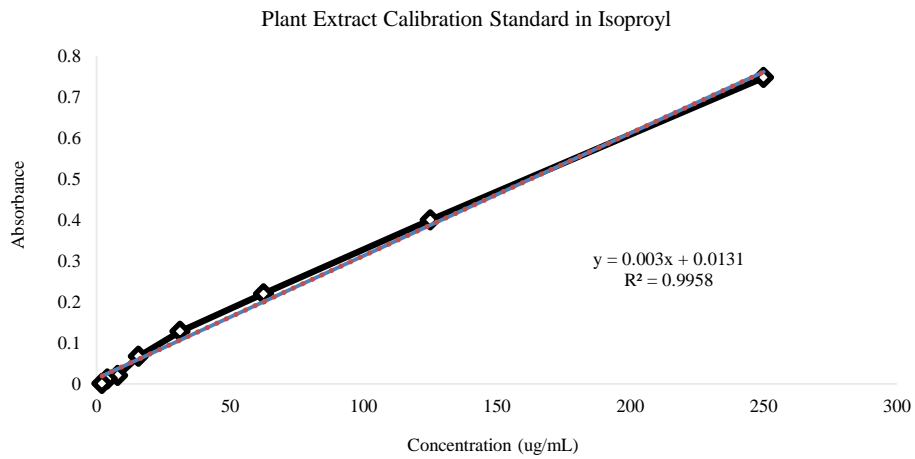
درصد رهایش تجمعی در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعته و در زمان‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت با استفاده از نمودار استاندارد عصاره *Hedera helix* در آب دیونیزه محاسبه (جدول ۲) و نمودار رهایش عصاره در شرایط مشابه سلول سالم و سرطانی رسم گردید (نمودار ۵). با بررسی داده‌های موجود در جدول و الگوی رهایش عصاره مشخص می‌شود که رهایش عصاره طی ۴۸ ساعت در آب دیونیزه پیوسته بوده است. همچنین این بررسی نشان می‌دهد که حداکثر رهایش عصاره در شرایط مشابه سلول سالم و سرطانی در آب دیونیزه طی ۴۸ ساعت به ترتیب ۷۶/۰۴ و ۸۳/۷۹ درصد می‌باشد. درصد رهایش تجمعی در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعته با استفاده از نمودار استاندارد عصاره *Hedera helix* در PBS محاسبه (جدول ۳) و نمودار رهایش عصاره در شرایط مشابه سلول سالم و سرطانی رسم گردید (نمودار ۶). با بررسی داده‌های موجود در جدول و الگوی رهایش عصاره، مشخص می‌شود که رهایش عصاره طی ۴۸ ساعت در PBS پیوسته بوده است. همچنین این بررسی نشان می‌دهد که حداکثر رهایش عصاره در شرایط مشابه سلول سالم و سرطانی در PBS طی ۴۸ ساعت به ترتیب ۳۴/۰۵ و ۴۵/۱۱ درصد می‌باشد.

نتایج حاصل از DLS نشان می‌دهد که اندازه ذرات سامانه نیوزومی حاصل از فرمولاسیون F1 قبل و بعد از بارگذاری دارو به ترتیب ۱۱۶/۹ و ۱۳۲/۵ نانومتر بوده است. این بررسی نشان می‌دهد که درون‌گیری دارو باعث افزایش اندازه ذرات سامانه نیوزومی به میزان ۱۵/۶ نانومتر شده است (شکل ۱ و ۲).

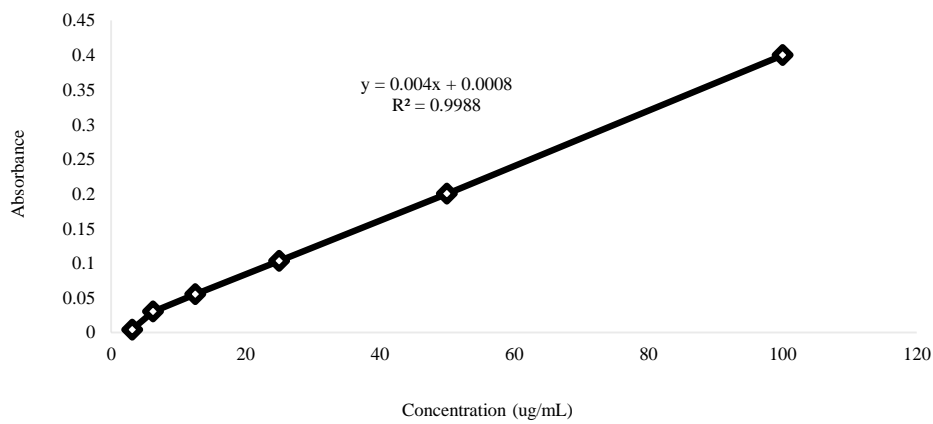
محاسبه بار سطحی (پتانسیل زتا) نانوذرات نیوزومی حاصل از فرمولاسیون F1 به ترتیب قبل و بعد از بارگذاری عصاره، $-۴۶/۷۴ \pm ۵/۵۵$ و $-۴۱/۴۷ \pm ۲/۶۹$ میلی‌ولت را نشان می‌دهد.



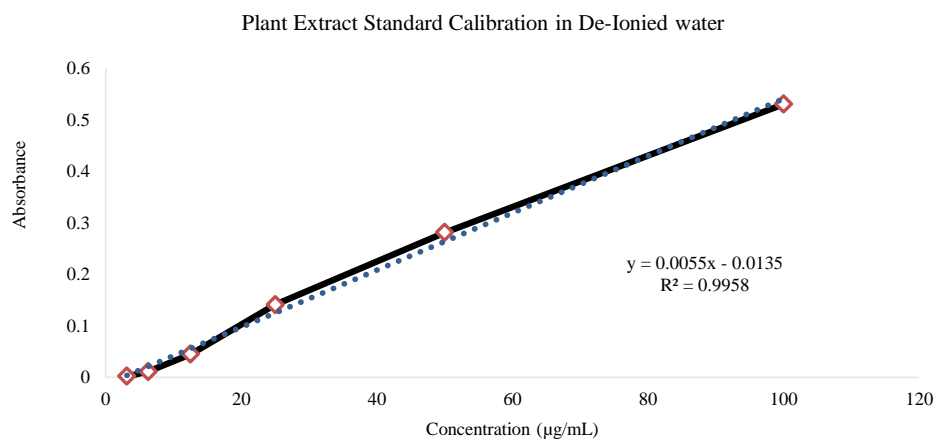
نمودار ۱- طیف جذبی عصاره آبی *Hedera helix* در بازه ۲۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر



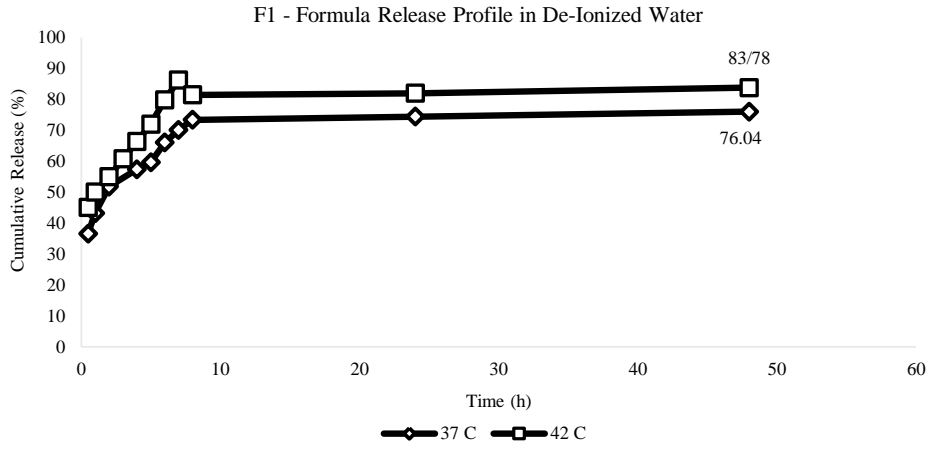
نمودار ۲- نمودار استاندارد عصاره آبی Hedera helix در ایزوپروپیل



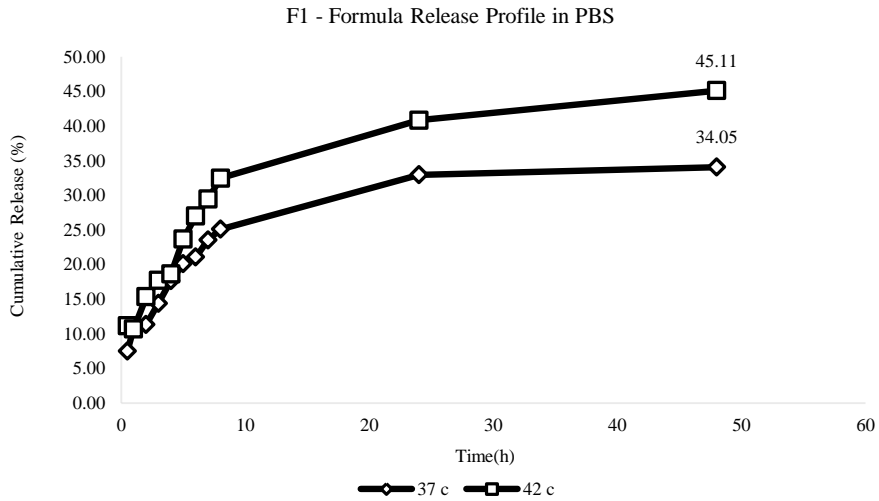
نمودار ۳- نمودار استاندارد عصاره آبی Hedera helix در PBS



نمودار ۴- نمودار استاندارد عصاره آبی Hedera helix در آب دیونیزه

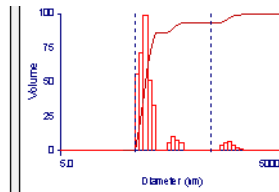


نمودار ۵- نمودار رهائشی عصاره آبی Hedera helix در آب دیونیزه



نمودار ۶- نمودار رهائشی عصاره آبی Hedera helix در PBS

Sample ID: bsad (Run 4)
 Date - Time: Jul 12, 2017 18:03:42
 Operator ID: hakimian
 Elapsed Time: 00:00:30
 Mean Diam.: 116.9 nm
 Rel. Var.: 2.435
 Skew: 3.899



d(nm)	G(d)	C(d)	d(nm)	G(d)	C(d)	d(nm)	G(d)	C(d)
36.4	0	0	138.6	5	88	527.7	0	94
41.1	0	0	156.5	10	91	595.9	0	94
46.4	0	0	176.7	7	93	672.9	3	95
52.4	56	16	199.6	5	94	759.9	5	97
59.2	72	36	225.4	0	94	858.1	6	98
66.8	100	64	254.5	0	94	969.0	4	99
75.5	51	78	287.4	0	94	1094.2	2	100
85.2	33	87	324.5	0	94	1235.6	0	100
96.2	0	87	366.4	0	94	1395.3	0	100
109.7	0	87	412.8	0	94	1475.6	0	100

Volume

Diameter (nm)

Volume

Copy for Spreadsheet

Copy to Clipboard

Close

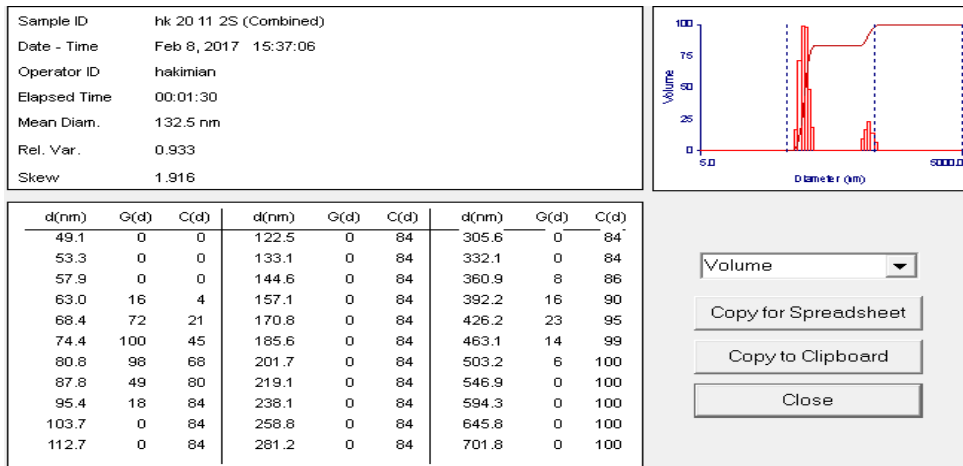
شکل ۱- اندازه‌ی ذرات در نانوسامانه نیوزومی حاصل از فرمولاسیون F1 قبل از بارگذاری عصاره

جدول ۲- درصد رهائش تجمعی در زمان‌های مختلف طی ۴۸ ساعت در شرایط مشابه سلول سالم و سرطانی در آب دیونیزه

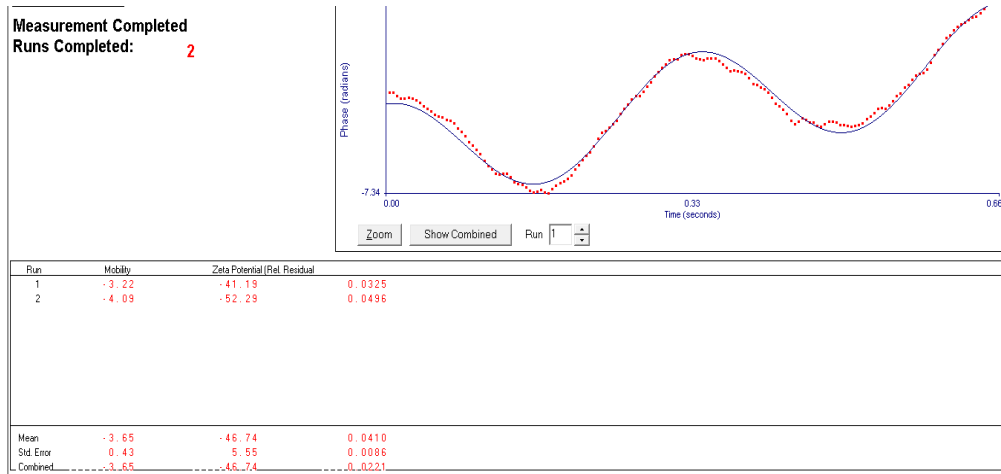
زمان (ساعت)	رهائش تجمعی (۳۷°C و pH= ۷/۴)	رهائش تجمعی (۴۲°C و pH= ۵/۴)
۰/۵	۳۶/۶۳	۴۵/۰۵
۱	۴۳/۲۴	۴۹/۹۸
۲	۵۱/۸۳	۵۴/۹۵
۳	۶۵/۵۲	۶۰/۸۰
۴	۵۷/۳۹	۶۶/۳۶
۵	۵۹/۷۱	۷۲/۰۰
۶	۶۶/۰۶	۷۹/۸۳
۷	۷۰/۱۵	۸۶/۳۷
۸	۷۳/۳۹	۸۱/۴۷
۲۴	۷۴/۴۴	۸۱/۹۸
۴۸	۷۶/۰۴	۸۳/۷۹

جدول ۳- درصد رهائش تجمعی در زمان‌های مختلف طی ۴۸ ساعت در شرایط مشابه سلول سالم و سرطانی در PBS

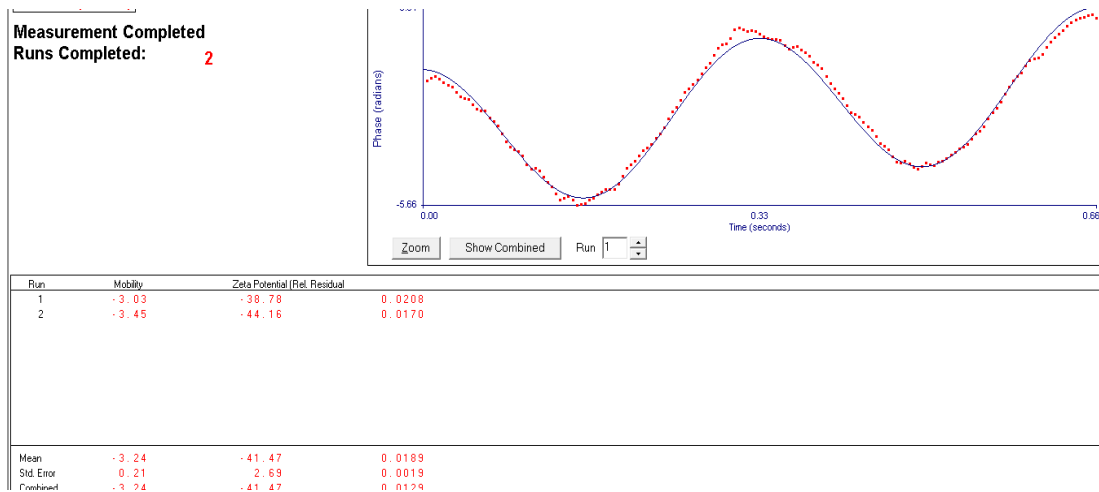
زمان (ساعت)	رهائش تجمعی (۳۷°C و pH= ۷/۴)	رهائش تجمعی (۴۲°C و pH= ۵/۴)
۰/۵	۷/۴۷	۱۱/۱۶
۱	۱۰/۸۵	۱۰/۶۹
۲	۱۱/۳۴	۱۵/۳۴
۳	۱۴/۴۰	۱۷/۷۲
۴	۱۷/۶۷	۱۸/۶۲
۵	۲۰/۱۱	۲۳/۶۸
۶	۲۱/۰۶	۲۷/۰۱
۷	۲۳/۵۵	۲۹/۴۴
۸	۲۵/۰۸	۳۲/۴۵
۲۴	۳۲/۹۴	۴۰/۸۳
۴۸	۳۴/۰۵	۴۵/۱۱



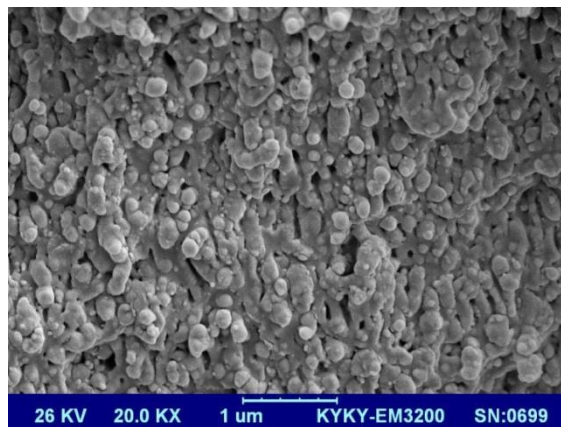
شکل ۲- اندازه‌ی ذرات در نانوسامانه نیوزومی حاصل از فرمولاسیون F1، بعد از بارگذاری عصاره



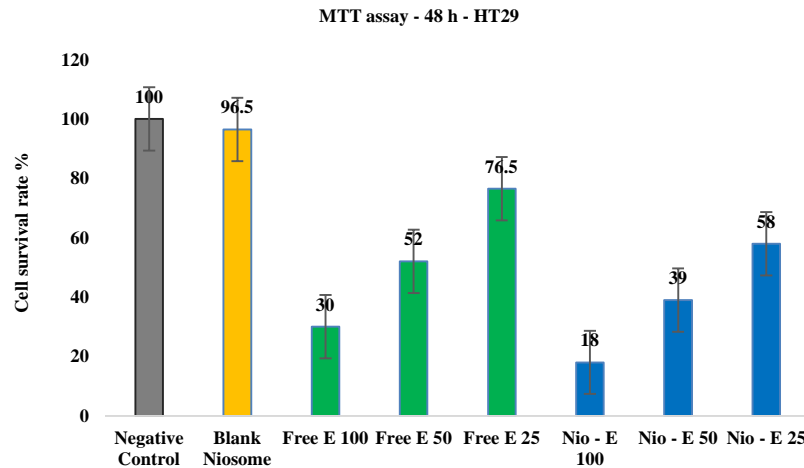
شکل ۳- بار سطحی (پتانسیل زتا) نانوسامانه نیوزومی حاصل از فرمولاسیون F1، قبل از بارگذاری عصاره



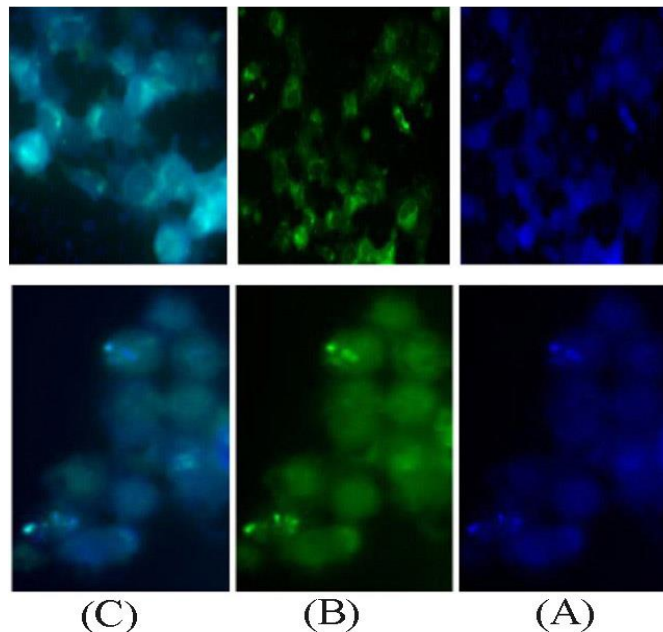
شکل ۴- بار سطحی (پتانسیل زتا) نانوسامانه نیوزومی حاصل از فرمولاسیون F1، بعد از بارگذاری عصاره



شکل ۵- شکل ظاهری نانوسامانه نیوزومی F1 دارای عصاره Hedera helix



نمودار ۷- میزان تأثیر سامانه نیوزومی فاقد عصاره، عصاره بارگذاری شده و عصاره‌ی آزاد بر رده‌ی سلولی HT29



شکل ۶- ورود نانوسامانه‌ی حاوی عصاره‌ی *Hedera helix* به سلول‌های HT29

بحث

در پژوهش حاضر دو سامانه‌ی نیوزومی حاوی عصاره *Hedera helix* که در ساختار یکی از سامانه‌ها توئین ۶۰ و در ساختار سامانه دیگر اسپن ۶۰ به کار رفته است، به ترتیب با درصد درون‌گیری $۹۵/۴۳ \pm ۲/۴۳$ و $۴۶/۸۶ \pm ۱/۶۲$ تولید شده‌اند. عوامل مختلفی از جمله، نوع سورفکتانت (غلظت مولی، طول بخش آبگریز، HLB)، میزان کلسترول موجود در ساخت سامانه، نوع ماده درون‌گیری شده و درجه خلوص مواد به کار رفته در ساخت سامانه بر میزان درون‌گیری عصاره در سامانه‌ی نیوزومی مؤثر است (۲۸ و ۲۹). با توجه به اینکه درصد

جهت بررسی ورود نانو سامانه دارای عصاره به سلول پس از آماده‌سازی نمونه‌ها طبق پروتکل شرح داده شده در مباحث قبلی نسبت به تصویربرداری نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت اقدام گردید. بر این اساس تصاویر A، B و C به ترتیب نشان‌دهنده هسته رنگ شده با رنگ DAPI در زیر فیلتر آبی، سامانه نیوزومی رنگ شده با Dil در زیر فیلتر سبز و تصویر فلورسنت ثبت شده با فیلتر Merge است که هم‌پوشانی میان فیلترهای آبی و سبز در تصویر C حاکی از ورود نانوسامانه به درون هسته سلول می‌باشد (شکل ۶).

پژوهش حاضر نشان می‌دهد که سمیت سامانه‌ی نیوزومی حاوی عصاره *Hedera helix* نسبت به عصاره‌ی آزاد (نیوزومه نشده) بر رده‌ی سلولی HT29 بیشتر می‌باشد. به نظر می‌رسد که این افزایش سمیت، ناشی از ورود کامل و رهایش آهسته و پیوسته عصاره از سامانه‌ی نیوزومی باشد. زیرا با توجه به تصاویر حاصل از آزمون uptake، مشخص شد که سامانه نیوزومی حاوی عصاره با موفقیت وارد سلول‌های HT29 و بدین ترتیب ترکیبات ضدتوموری عصاره، در داخل سلول آزاد می‌گردد، که اثرگذاری این ترکیبات در این شرایط، نسبت عصاره آزاد بر سلول سرطانی بیشتر خواهد بود.

تاکنون پژوهش‌های متعددی بر روی نانوحامل‌های لیپیدی حاوی ترکیبات گیاهی صورت پذیرفته است، والتی و همکاران در سال ۲۰۰۱، نانو لیپوزوم‌های چند لایه و تک لایه حاوی اسانس سانتولینا، تهیه نمودند که در نانو لیپوزوم‌های چند لایه، اندازه، شاخص پراکندگی ذرات و درصد درون پوشانی به ترتیب، ۴۶۷ nm، ۰/۳۳ و ۷۸/۵ درصد و در نانو لیپوزوم‌های تک لایه، اندازه، شاخص پراکندگی ذرات و درصد درون پوشانی به ترتیب، ۶۳ nm، ۰/۱۵ و ۸۰ درصد گزارش شده است (۳۸).

دتونی و همکاران در سال ۲۰۰۹، نانو لیپوزوم‌های چند لایه حاوی اسانس *Zanthoxylum tingoassuiba* با استفاده از روش فیلم نازک تهیه نمودند که اندازه آنها ۹۳۷ nm و درصد درون پوشانی ۴۳/۷ درصد گزارش شد (۳۹).

سلیا و همکاران در سال ۲۰۱۳ نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس ترنج را تهیه نمودند که این نانو ذرات ضمن افزایش میزان حلالیت اسانس و بهبود شاخصه‌های ضدسرطانی آن، دارای پتانسیل زتای ۶- و اندازه ذرات ۱۸۶ nm بودند (۴۰).

تاوو و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴، نانوذرات کیتوزان حاوی اسانس آویش تهیه نمودند که در این پژوهش میزان درون گیر شدن اسانس ۸۰ درصد و اندازه نانوذرات بین ۳۲۰۰ تا ۵۸۰ نانومتر گزارش شده است (۴۱).

حقیق و همکاران در سال ۲۰۱۵ نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس گزنه در غلظت‌های مختلفی از فسفاتیدیل کولین و کلسترول تهیه نمودند که حداکثر میزان درون پوشانی اسانس ۶۸/۸۳، محدوده اندازه ذرات بین ۸۱ تا ۹۴ نانومتر و شاخص پراکندگی ذرات مانند پژوهش حاضر، ۰/۳ گزارش شده است (۴۲).

بشیری و همکاران در سال ۲۰۱۵، نانو لیپوزوم‌های حاوی بتاکاروتن تهیه نمودند و به بررسی میزان پایداری این ذرات با گذشت زمان پرداختند. آنها گزارش کرده‌اند که اندازه نانو لیپوزوم‌های تهیه شده در حدود ۶۴ nm بوده و میزان درون پوشانی در بهترین فرمول حدود ۸۹/۷۷ درصد بوده است (۴۳).

خلوص مواد، نوع ماده‌ی درون‌گیری شده و غلظت مولی کلسترول در هر دو سامانه یکسان بوده است، علت تفاوت در بازده درون‌گیری عصاره در دو سامانه ناشی از تفاوت در نوع سورفکتانت به کار رفته در ساختار آنها است. HLB پایین‌تر و طول‌تر بودن طول زنجیره‌ی آبگریز در اسپن ۶۰ نسبت به توئین می‌تواند دلیلی بر بالا بودن درون‌گیری عصاره درون سامانه‌ی نیوزومی اسپن دار نسبت به سامانه‌ی نیوزومی توئین دار باشد به گونه‌ای که در اشیوکار و همکاران در سال در پژوهشی همانند پژوهش حاضر، نشان می‌دهند که سامانه‌ی نیوزومی ساخته شده از اسپن ۶۰ نسبت به سامانه‌ی نیوزومی ساخته شده از توئین ۶۰ بازده درون‌گیری بالاتری دارد (۳۰).

همچنین در این پژوهش، رهایش عصاره از سامانه‌ی نیوزومی در PBS و آب دیونیزه در شرایط مشابه سلول سالم و سرطانی آهسته می‌باشد. یکی از عوامل مؤثر در میزان رهایش از نانو سامانه‌های نیوزومی، کلسترول می‌باشد. پژوهش‌هایی نظیر حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۷، نشان دادند که افزایش غلظت کلسترول در ساختار سامانه‌ی لیپیدی باعث افزایش میزان رهایش می‌گردد (۳۱)، بنابراین انتخاب غلظت مولی مناسبی از کلسترول برای ساخت نانو سامانه لیپیدی ضرورتی اجتناب‌ناپذیر است. همچنین مقایسه نمودار رهایش عصاره در شرایط سلول سرطانی و سالم نشان می‌دهد که، سامانه نیوزومی در شرایط مشابه سلول سرطانی، مقدار بیشتری از عصاره را آزاد نموده است که می‌توان نتیجه گرفت، این سامانه، عصاره‌ی بیشتری را در اختیار سلول سرطانی نسبت به سلول سالم قرار می‌دهد، بنابراین سلول‌های سالم تا حدود زیادی از عوارض جانبی احتمالی عصاره مصون می‌مانند (۳۲ و ۳۳).

در پژوهش حاضر معین گردید که میزان بار سطحی (پتانسیل زتا) نانو سامانه‌ی لیپیدی $41/47 \pm 2/69$ است. از آنجا که یکی از عوامل افزایش‌دهنده‌ی پایداری نانو سامانه‌های لیپیدی، افزایش بار سطحی سامانه است، بنابراین نانو سامانه‌ی حاصل از این پژوهش با برخورداری از بار منفی بالا، می‌تواند از پایداری لازم برخوردار باشد، زیرا بار منفی زیاد موجود در سطح آن از به هم چسبیدن و رسوب نانو سامانه‌ها جلوگیری می‌کند (۳۴-۳۶). از سوی دیگر با بارگذاری عصاره درون نانو سامانه‌های حاصل از پژوهش حاضر، مقداری از بار منفی سطح نانو سامانه کاسته شده و پتانسیل زتای نانو سامانه نسبت به قبل از بارگذاری عصاره مثبت‌تر شده است، که این پدیده می‌تواند کارایی نانو سامانه در برابر سلول هدف افزایش دهد، زیرا پژوهش‌هایی نظیر حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۷، گزارش نموده‌اند که سامانه‌های لیپیدی با بار سطحی مثبت نسبت به سامانه‌های لیپیدی خنثی و آنیونی، سمیت بیشتری برای سلول‌های سرطانی دارند (۳۷).

دارای سمیت بالاتری بر رده‌ی سلولی MCF-7 می‌باشد. پژوهش برکت و همکاران همانند پژوهش حاضر تأیید می‌کند که عصاره بارگذاری شده درون سامانه‌های لیپیدی نسبت به عصاره آزاد از سمیت بالاتری بر رده‌های سلولی سرطان برخوردار است (۴۸). طالی اردکانی و همکاران در سال ۲۰۲۰، ضمن ساخت سامانه نیوزومی حاوی فلاونوئید کوئرستین، اندازه، پتانسیل زتا، درصد بارگذاری و الگوی رهایش دارو را در شرایط سلول سالم به ترتیب 170 nm ، $1/6$ - میلی‌ولت، $64/49$ درصد و آهسته گزارش نمودند (۴۹). پژوهش حاضر اگرچه باتوجه به نتایج حاصل از آن، منتهی به فرمولاسیون مناسب نیوزومی جهت رسانش عصاره *Hedera helix* به سلول‌های HT29 سرطان کولون، شد، ولی همانند بسیاری از پژوهش‌ها دارای نواقص و کاستی‌هایی نیز می‌باشد. عدم بررسی رهایش سامانه نیوزومی حاوی *Hedera helix* در pH‌های متفاوت، عدم استفاده از پلاسمای خون به جای آب دیونیزه و بافر PBS عدم بررسی پایداری سامانه نیوزومی، از جمله مهمترین کاستی‌های پژوهش حاضر می‌باشد که اصلاح و انجام هر یک از موارد ذکر شده به پژوهشگران بعدی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد بوده است. بدین‌وسیله از تمامی کسانی که در انجام این پروژه همکاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Pecorino Lauren. Molecular biology of cancer mechanism, targets and therapeutics. 3th ed. United Kingdom: Oxford University Press; 2012.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. CA: a Cancer Journal for Clinicians 2008;58:71-96. doi:10.3322/CA.2007.0010
3. Rahimi Pordanjani S, Baeradeh N, Lotfi MH, Pourmohammadi B. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival rates and risk factors. Razi Journal of Medical Sciences 2016;23:41-50.[Persian].
4. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2011;61:69-90. doi:10.3322/caac.20107
5. Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. BMJ: British Medical Journal. 2000 Sep 30;321:805. doi:10.1136/bmj.321.7264.805
6. Parsaee R, Fekri N, Shahid sales S, AfzalAghae M, Shaarbaf Eidgahi E, Esmaeily H. Prognostic Factors in the Survival Rate of colorectal cancer patients. JNKUMS 2015;7:45-5. doi:10.29252/jnkums.7.1.45
7. Emami S, Fatemi A, Farajzadegan Z, Movahed-Abtahi S. Epidemiology of colorectal cancer in Isfahan province. Govaresh 2005;10:134-9.[Persian].
8. Fakheri H, Janbabai G, Bari Z, Eshqi F. The Epidemiologic and Clinical-Pathologic Characteristics of Colorectal Cancers from 1999 to 2007 in Sari, Iran. J Mazandaran Univ Med Sci 2008;18:58-66.[Persian].

ابراهیمی خوسفی و همکاران در سال ۲۰۱۵، لیپوزوم‌های حاوی اسانس آویشن شیرازی تهیه نمودند که درصد وشانی را در نقطه بهینه $54/4$ درصد گزارش نمودند. همچنین پژوهش یادشده نشان می‌دهد که مهمترین شاخص مؤثر بر ریزپوشانی، درصد محتوای فسفاتیدیل کولین به کار رفته در سنتز لیپوزوم است و با کپسوله کردن اسانس آویشن می‌توان خاصیت آنتی‌باکتریال اسانس را افزایش داد (۴۴).

کوی و همکاران در سال ۲۰۱۵ نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس میخک تهیه نمودند که اندازه نانو ذرات را بین $78/3$ تا $156/1$ نانومتر، شاخص پراکندگی ذرات را $0/196$ ، پتانسیل زتا ذرات را $24/5$ - و میزان درون پوشانی را $20/41$ درصد گزارش نمودند (۴۵).

حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۶ نانو ذرات لیپیدی حاوی اسانس زنیان تهیه نمودند که میزان انکپسولاسیون اسانس $35/6$ درصد و اندازه نانو ذرات حاوی اسانس $186/1$ nm بوده است. همچنین پتانسیل زتای نانو ذرات در این پژوهش بین 1 - تا $6/7$ - گزارش شده است (۴۶). استفاده از سامانه نیوزومی، درصد بارگذاری بالاتر و اندازه ذرات کوچک‌تر، از جمله مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش حقیرالسادات و همکاران است.

قره نقده و همکاران در سال ۲۰۱۷، نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس مریم گلی با فرمول‌های مختلف ($80-100$ و $20-70$ میلی‌گرم) تهیه نمودند که اندازه ذرات و شاخص پراکندگی ذرات به ترتیب در محدوده $88-82$ نانومتر و $0/39$ - $0/42$ و میزان درون پوشانی اسانس در تمامی فرمول‌ها بالای 70 درصد گزارش شده است (۴۷). نتایج پژوهش قره نقده و همکاران نزدیک به پژوهش حار می‌باشد.

مجددی زاده و همکاران در سال ۲۰۱۸، نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس نعنای فلفلی تهیه نمودند که وزیکول‌های لیپوزومی حاوی اسانس با اندازه $13/39 \pm 247$ نانومتر، $2/7 \pm 61/38$ درصد میزان راندمان انکپسولاسیون، پتانسیل زتا $0/74 \pm 34/54$ میلی‌ولت و شاخص پراکندگی $0/1 \pm 0/32$ می‌باشد (۲۲).

استفاده از سامانه نیوزومی، درصد بارگذاری بالاتر و اندازه ذرات کوچک‌تر، از جمله مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش مجددی‌زاده و همکاران است که می‌تواند ناشی از تفاوت در نوع سامانه و نوع ماده‌ی درون‌گیری باشد که بر ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی سامانه تأثیر گذاشته است.

برکت و همکاران در سال ۲۰۱۹، موفق به ساخت سامانه لیپوزومی حاوی عصاره‌ی *Nepeta persica* شده به‌منظور اثرگذاری بر رده سلولی MCF-7، سرطان پستان شدند و راندمان بارگذاری عصاره را $67/11$ درصد، اندازه ذرات را $116/9$ nm و پتانسیل زتای ذرات را $13/24$ - میلی‌ولت گزارش نمودند. همچنین نتایج پژوهش برکت و همکاران نشان داد که که عصاره لیپوزومه شده نسبت به عصاره آزاد

9. Salari A, Dehghan H. Evaluation and Treatment of Colorectal Cancer in Shahid Rahmehoon and Afshar Hospitals, Yazd-Iran. *JSSU* 2007;15:20-25.[Persian].
10. Granados-Romero JJ, Valderrama-Treviño AI, Contreras-Flores EH, Barrera-Mera B, Herrera Enríquez M, Uriarte-Ruiz K, Ceballos-Villalba JC, Estrada-Mata AG, Alvarado Rodríguez C, Arauz-Peña G. Colorectal cancer: a review. *Int J Res Med Sci* 2017;5:4667. doi:10.18203/2320-6012.ijrms20174914
11. Juretić A, Fröbe A, Đaković N, Marić Brozić J, Beketić-Orešković L. Colorectal cancer treatment: an introduction. *Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti: Medicinske znanosti* 2017;5:47-54.
12. Davidov DN. Oxaliplatin/5-fluorouracil/leucovorin in the treatment of patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of IMAB-Annual Proceeding (Scientific Papers)* 2013;19:476-80.
13. Delavari M, Dalimi A, Ghaffarifar F, Sadraei J. Cytotoxic effects of 5-fluorouracil on *Leishmania major* promastigotes and induction of apoptosis in the parasite. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences* 2014;21:34-42.[Persian].
14. Thomas SA, Grami Z, Mehta S, Patel K. Adverse effects of 5-fluorouracil: focus on rare side effects. *Cancer Cell & Microenvironment* 2016;3:1-4 doi: 10.14800/ccm.1266
15. Mahmoudi M, Mohammadi S, Shahidi S. Antinociceptive Effect of Hydroalcoholic Leaf Extract of *Hedera helix* in Male Rat. *Avicenna J Clin Med* 2013;20:119-125.[Persian].
16. Mirzaei M, Babaloo F. Air pollutions effects on anatomical structure of English ivy (*Hedera helix*L) Quarterly journal of Development Biology 2009;1:41-7.[Persian].
17. Roşca-Casian O, Mircea C, Vlase L, Gheldiu AM, Teuca DT, Pârnu M. Chemical composition and antifungal activity of *Hedera helix* leaf ethanolic extract. *Acta Biologica Hungarica* 2017;68:196-207. doi:10.1556/018.68.2017.2.7
18. Lutsenko YU, Bylka WI, Matlawska I, Darmohray RO. *Hedera helix* as a medicinal plant. *Herba Polonica* 2010;56:83-96.
19. Al-Snafi AE. Pharmacological and therapeutic activities of *Hedera helix*-A review. *IOSR J. Pharm.* 2018;8:41-53.
20. Shahbazi R, Davoodi H, Esmaeili S. The anticancer effects of flavonoids: involment of PI3K/ Akt signaling pathway. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology* 2013;7:1-10.[Persian].
21. Sherry M, Charcosset C, Fessi H, Greige-Gerges H. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. *J Liposome Res.* 2013;23:268-75. doi:10.3109/08982104.2013.819888
22. Majdizadeh 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.[Persian].
23. Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug discovery today.* Elsevier; 2008;13:144-51. doi:10.1016/j.drudis.2007.10.021
24. Di Marzio L, Marianecchi C, Petrone M, Rinaldi F, Carafa M. Novel pH-sensitive non-ionic surfactant vesicles: comparison between Tween 21 and Tween 20. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* Elsevier; 2011;82:18-24. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.08.004
25. Mahale NB, Thakkar PD, Mali RG, Walunj DR, Chaudhari SR. Niosomes: novel sustained release nonionic stable vesicular systems—an overview. *Advances in colloid and interface science.* 2012;183:46-54. doi:10.1016/j.cis.2012.08.002
26. Shahi Malmir H, Kalantar SM, Sasani E, Asgari M, Majdizadeh 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.* 2019;26:879-94.[Persian].
27. Bahrami-Banan F, Hasan Sheikhha M, Ghasemi N, Majdizadeh M, Haghirsadat BF. Preparation and Study of Nano-Niosomes Containing Doxorubicin and Evaluation of its Toxicity on Acute Myeloblastic Leukemia Cell Line KG-1. *Journal of Payavard Salamat* 2018;12:309-323.[Persian].
28. Mohawed OA, El-Ashmoony MM, Elgazaverly ON. Niosome-encapsulated clomipramine for transdermal controlled delivery. *Int J Pharm Pharm Sci* 2014;6:567-75.
29. Ghanbarzadeh B, Pezeshky A, Hamishehkar H, Moghadam M. Vitamin A palmitate-loaded nanoliposomes: study of particle size, zeta potential, efficiency and stability of encapsulation. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 2016;12:261-75.[Persian].
30. Dharashivkar S, Sahasrabudhe S, Saoji A. Effect of few formulation variables on entrapment efficiency of silver sulfadiazine niosomes *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2014;3:692-701.
31. Haghirsadat F, Amoabediny G, Sheikhha MH, Zandieh-doulabi B, Naderinezhad S, Helder MN, Forouzanfar T. New liposomal doxorubicin nanoformulation for osteosarcoma: drug release kinetic study based on thermo and pH sensitivity. *chemical biology & drug design* 2017;90:368-79. doi:10.1111/cbdd.1295
32. Sasani E, Shahi Malmir H, Daneshmand F, Majdizadeh M, Haghirsadat BF. A new study on synthesize and optimization of PEGylated LipoNiosomal nanocarriers containing curcumin for use in cancer chemotherapy. *SSU_Journals* 2018;26:528-41.[Persian].
33. Moosavizadeh SM, Baghiani M, Majdizadeh M, Haghirsadat F, Moosavizadeh SM. Experimental study: experimental evaluation of phospholipid system containing doxorubicin HCL for use in chemotherapy. *SSU_Journals.* 2019 Mar 15;26:945-56.[Persian].
34. 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
35. 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.* Dove Press; 2011;6:3087. doi:10.2147%2FIJN.S25399
36. 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 Controlled Release.* Elsevier; 2010;148:135-46. doi:10.1016/j.jconrel.2010.08.027
37. Haghirsadat B F, Naderinezhad S, Amoabediny G, Montazeri F, Zandieh Doulabi B. Evaluation of the effects of surface charge on cytotoxicity of liposomal Doxorubicin on bone cancer cell line (Osteosarcoma). *Daneshvar Medicine* 2018;25:19-26.[Persian].
38. Valenti D, De Logu A, Loy G, et al. Liposome-incorporated santolina insularis essential oil: preparation, characterization and in vitro antiviral activity. *J Liposome Res* 2001;11:73-90. doi:10.1081/LPR-100103171
39. 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
40. Celia C, Trapasso E, Locatelli M, Navarra M, Ventura CA, Wolfram J, Carafa M, Morittu VM, Britti D, Di Marzio L. PD. 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
41. 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
42. 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].

43. Sahra Bashiri, Ghanbarzadeh B, Hamishekar H, Dehghannya J. Beta-Carotene loaded nanoliposome: effects of gamma-oryzanol on particle size stability and encapsulation. *J Res Innov Food Sci Technol*. 2015;4:365-82.[Persian].
44. Ebrahimi Khoufif M, Khosravi darani K, Hoseini H, Arabi S, Kamali Fonoud R, Kouhi Kamali P. Production of nanoliposomes containing essential oil of Boiss Zatariamultiflora by response surface method. *Nano Scale* 2014;1:119-28.[Persian].
45. Cui H, Zhao C, Lin L. The specific antibacterial activity of liposome-encapsulated Clove oil and its application in tofu. *Food Control*. 2015;56:128-34. doi:10.1016%2Fj.foodcont.2015.03.026
46. Haghirsadat F, Azhdari M, Kalantar SM, Nadermezhad S, Teymorizadeh K, Yazdani M, et al. 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. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2016;24:468-78.[Persian].
47. Gharenaghadeh S, Samadlouie HR, Sowti M, Hamishekar H, Mokaram RR. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant properties of Salvia essential oil nano liposome (Salvia multicaulis). *JFST* 2017;14:271-82.[Persian]
48. Barakat F, Aboee-Mehrizi F, Haghirsadat B F, 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].
49. Talei-Ardakani N, Daneshmand F, Mirhoseini M, Ebrahimpour M, Majdizadeh M. Haghirsadat BF, Fabrication and characterization of physicochemical niosomal nano-carriers containing quercetin flavonoids for therapeutic purposes, *Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences* 2020;15: doi:10.22100/jkh.v15i1.2329



Fabrication of Niosomal Nano-Carriers Containing Aqueous Extract of Hedera Helix and Comparison of Toxicity of Free Extract and Niosome Extract On HT29 Colorectal Cancer Cell Line

Fatemeh Parnian (M.Sc.)¹, Seyed Hossein Hekmati-Moghaddam (Ph.D.)², Mohammad Majdizadeh (M.Sc.)³, Ali Jebali (Ph.D.)⁴, Bibi Fatemeh Haghirsadat (Ph.D.)^{5,6*}

1- Dept. of Medical Biotechnology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

2- Dept. of Laboratory Sciences, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

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

4- Dept. of Laboratory Sciences, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

5- Medical Nanotechnology & Tissue Engineering Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

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

Received: 18 July 2020, Accepted: 28 November 2020

Abstract:

Introduction: Niosome is a lipid carrier that can resolve some of the challenges facing the delivery of herbal medicines to tissues. The aim of the present study is to fabricate and evaluate the physicochemical properties of niosomal carriers containing Hedera helix extracts and evaluation of its toxicity to the HT29 cell line of colon cancer.

Methods: Two niosomal formulations F0 (30% cholesterol and 70% tween60) and F1 (30% cholesterol and 70% spin60) containing extract of Hedera hilix were made using the thin film method. Then, according to the amount of drug loading, one of the formulations was selected. The pattern of drug release under normal and cancerous cell conditions, size and surface charge of the nanoparticles (using DLS) and the appearance of the nanoparticles (using SEM) of the selected formulation were investigated. Finally, the toxicity of the niosomal system containing extracts and free extracts on HT29 cell line was evaluated by MTT assay and niosomal system entry into HT29 cells was evaluated by system and cell staining.

Results: Extract loading percentage, size and zeta potential for the selected formulation (F1) containing the extract were $95/43 \pm 2/43\%$, $132/5\text{nm}$ and $-41/47 \pm 2/69\text{mV}$, respectively. Release of the extract from the niosomal system is slow within 48 hours in normal and cancerous cell conditions. The appearance of the nanoparticles was smooth and spherical and extract niosomal had more toxicity to HT29 cell line colon cancer than free extract.

Conclusion: The niosomal formulation of this study can be recommended for further research in colon cancer with respect to its physicochemical properties.

Keywords: Niosome, Nano-carrier, Colon cancer, HT29 cell line, Hedera helix extract.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: B.F. Haghirsadat, Email: Fhaghirosadat@gmail.com

Citation: Parnian F, Hekmati-Moghadam SH, Majdizadeh M, Jebali A, Haghirsadat BF. Fabrication of niosomal nano-carriers containing aqueous extract of hedera helix and comparison of toxicity of free extract and niosome extract on HT29 colorectal cancer cell line. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2020;15(3):31-45.