

بررسی اثر نانوذرات لیپیدی حاوی داروی ضد سرطان سیلیبینین بر مهار رشد

سلولی در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان

ارسلان کریمی مقدم^۱، نرگس نیکونهاد لطف آبادی^{۱*}، بی بی فاطمه حقیرالسادات^۲، محمد مجدی زاده^۳

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه علم و هنر یزد، ایران.
۲. گروه علوم و فنون نوین، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
۳. گروه زیست فناوری، شرکت ریز زیست فناوران فردانگر، پارک علم و فناوری یزد، یزد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سیلیبینین ترکیبی فلاونو لیگنان است که از گیاه *Silybum marianum* استخراج می شود و خواص ضد سرطانی آن بر روی سلول های پستان مورد بررسی قرار گرفته است. هدف از این مطالعه، تهیه و ارزیابی فیزیوشیمیایی فرمولاسیون های مختلفی از سامانه های نیوزومی حاوی سیلیبینین به منظور دستیابی به فرمولاسیونی هدفمند، جهت مبارزه بهتر با سلول های سرطان پستان است.

روش ها: نانوحامل ها با استفاده از نسبت های مولی مختلف از کلسترول و پلی سوربات ۲۰ و ۶۰ سنتز و از میان ۹ فرمولاسیون سنتزی، بهترین فرمولاسیون با استناد به بازده درون گیری انتخاب گردید. در ادامه الگوی رهایش دارو در محیط شبیه سلول سرطانی، اندازه، بار سطحی نانو حامل، برهمکنش دارو و نانو سامانه با بررسی طیف های IR و مورفولوژی ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی گردید. در پایان میزان سمیت سیلیبینین نیوزومه بر رده سلولی MCF-7 به روش MTT تعیین شد.

نتایج: فرمولاسیون نهایی حاوی سیلیبینین، دارای اندازه ی ۱۱۸ نانومتر، بازده انکپسولاسیون $92/87 \pm 5\%$ ، پتانسیل زتا $0/9 \pm 31/33$ میلی ولت می باشد. حداکثر رهایش دارو از نانو سامانه در شرایط سلول های سرطانی، طی ۴۸ ساعت $89/03\%$ بوده است. بررسی نتایج حاصل از MTT نشان داد که میزان سمیت سیلیبینین انکپسوله نسبت به سیلیبینین انکپسوله نشده بر رده سلولی MCF-7 سرطان پستان بیشتر می باشد.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که سامانه های نیوزومی با برخورداری از ویژگی های فیزیوشیمیایی مناسب، باعث افزایش سمیت سیلیبینین بر رده سلولی MCF-7 گردیده است. بنابراین می تواند حاملی مناسب برای رسانش دارو به سلول های سرطانی باشد.

کلید واژه ها:

نیوزوم، سیلیبینین، حامل های دارویی، عامل ضد سرطان، سلول های MCF-7

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه محفوظ است.

مقدمه

و سلول های عادی به فرایندهای دقیق کنترل چرخه سلولی پاسخ نمی دهند و در اثر تکثیر کنترل نشده ی این سلول ها، توده ای از سلول ها بنام تومور ایجاد می شود (۱-۳).

سرطان پستان از شایع ترین سرطان ها در زنان و دارای بیشترین میزان مرگ و میر در سطح جهان می باشد. به گونه ای که از هر ۹ زن، یک نفر در طول عمر خود، این بیماری را تجربه

سرطان به مجموعه ای از بیماری ها اطلاق می شود که شاخص مشترک همه آن ها، از حذف محدودیت های تقسیم سلولی است که معمولاً می تواند در هر بافتی از بدن روی دهد. فرایند اصلی این بیماری کشنده، در انواع مختلف آن یکسان است که طی آن بر اثر تغییرات ژنتیکی ناشی از هورمون ها، مواد شیمیایی و گاهی اوقات ویروس ها، تنظیم چرخه سلولی دچار نقض می شود

پیشنهاد شده و اثر ضد سرطانی آن در درمان سرطان های اپیتلیالی مانند پوست، پروستات و ریه مشخص شده است (۱۰). در میان تمامی این مزایا، استفاده از ترکیبات گیاهی با چالش های جدی از جمله، اثرگذاری نامطلوب بر ارگان های غیر هدف و اکسید شدن برخی از مواد موثره روبرو است، که فناوری نانو با ساخت و تهیه نانو حامل های دارویی از جمله لیپوزوم و نیوزوم توانسته است برخی از مشکلات یاد شده را کاهش داده و یا برطرف نماید. نیوزوم ها وزیکولهای سورفاکتانت غیر یونی هستند که در اثر هیدراتاسیون سورفاکتانت های غیر یونی مرکب یا بدون اختلاط کلسترول و دیگر چربی ها تشکیل می گردند. سیستم وزیکولی آنها می تواند به عنوان حامل داروهای آبدوست (لیپوفیل) و آبگریز (هیدروفوب) استفاده شود. همچنین غیر یونی بودن آن باعث سمیت کمتر و محدود شدن واکنش آن با سلول می گردد که این امر به نوبه خود منجر به افزایش شاخص درمانی داروی کپسوله شده می گردد (۱۱). طراحی و ساخت آسان، هزینه اقتصادی پایین تر، سمیت کم تر، بازده درونگیری بالاتر، فراهمی زیستی بیشتر، انعطاف پذیری بالا در برابر تغییرات، امکان تغییر بار سطحی آن بصورت آسانتر و غیره از جمله مزایای نانوذرات نیوزومی نسبت به لیپوزوم ها هستند (۱۲). هدف از این مطالعه، تهیه و ارزیابی فیزیوشیمیایی فرمولاسیون های مختلفی از سامانه های نیوزومی حاوی سیلیبینین به منظور دستیابی به فرمولاسیونی هدفمند، جهت مبارزه بهتر با سلولهای سرطان پستان است.

روش کار

مواد شیمیایی: داروی سیلیبینین متعلق به شرکت Sigma آمریکا، کلسترول، پلی سوربات ۶۰ (Tween60) و پلی سوربات ۲۰ (Tween20) متعلق به شرکت Merck آلمان تهیه و خریداری شد.

رسم نمودار استاندارد سیلیبینین در ایزوپروپیل و بافر Phosphate buffered saline (PBS): به منظور رسم نمودار استاندارد سیلیبینین، غلظت های مختلفی از استوک سیلیبینین در ایزوپروپیل و PBS به روش سری استاندارد ساخته شد. سپس

می نماید (۴). سبب شناسی سرطان پستان چند عاملی بوده که مهم ترین آن، شامل سن، یائسگی دیررس، مصرف داروهای خوراکی ضد بارداری، هورمون درمانی، ژنتیک، سابقه بیماریهای خوش خیم پستان، چاقی مفرط و وزن بالا می باشد (۵).

به منظور درمان سرطان ها، معمولاً از سه روش جراحی، رادیودرمانی و شیمی درمانی استفاده می شود که در این بین شیمی درمانی با وجود داشتن محدودیتهایی از قبیل، هدفمند نبودن داروهای شیمی درمانی، نیازمند بودن به دوزهای بالای دارو برای مبارزه با سلولهای سرطانی، مقاومت دارویی و عوارض جانبی متعدد، هنوز هم بعنوان یکی از روش های درمانی موثر در مبارزه با سلولهای سرطانی بشمار می آید (۶)، عوارض قلبی، تاول زایی، ریزش مو (آلوپسی)، تاثیرات مخرب بر مغز استخوان و غیره از جمله عوارض ناخواسته ی حاصل از داروهای رایج شیمی درمانی است، که هر ساله گریبان شمار زیادی از بیماران مبتلا به سرطان را می گیرد (۸)، بنابراین دستیابی به درمان سرطان یکی از دغدغه های عمده پژوهشگران در زمینه پزشکی است و پژوهشگران بدنبال کشف عوامل ضد سرطانی با کمترین خطر و بیشترین اثر برای بیماران می باشند. مطالعات زیادی در زمینه ترکیبات دارویی با منشأ طبیعی توجه محققین را به خود جلب کرده است، که خاصیت ضد سرطانی برخی از آن ها به مرحله کار آزمایی بالینی رسیده است (۹).

سیلیمارین و ماده تشکیل دهنده آن سیلیبینین که از عصاره گیاه *Silybum marianum* به دست می آیند، از قدیم در درمان بیماری های زیادی از جمله بیماریهای کبدی مورد استفاده قرار گرفته است و ضمن برخورداری از خواص درمانی بالا، عوارض جانبی بسیار کمی دارد. این ترکیب آنتی اکسیدان ضمن احیا کردن رادیکالهای آزاد، می تواند مکانیسم های مختلفی از جمله تنظیم چرخه سلولی، مهار رگزایی، تهاجم و متاستاز را تحت تاثیر قرار دهد، بنابراین در درمان سرطان های مختلف مورد بررسی قرار گرفته و به عنوان یک داروی ضد سرطان

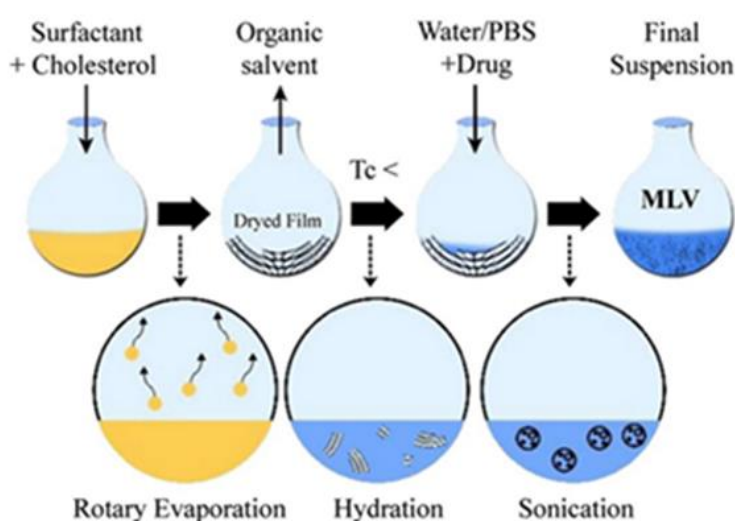
همراه سیلیبیین (جدول ۱)، در حلال کلروفرم و در دمای 42°C بر روی روتاری (هایدولف، آلمان) حل کرده و تحت شرایط خلأ، فیلم نازک خشک تهیه گردید. سپس عمل هیدراته کردن با افزودن مقدار مشخصی آب مقطر استریل، طی مدت ۶۰ دقیقه و در دمای 52°C انجام گردید. سپس نانوذرات تهیه شده، با استفاده از سونیکیت پروبی با توان ۶۰٪ (Amplitude) به مدت ۱۰ دقیقه (۱۰ ثانیه روشن و ۱۵ ثانیه خاموش) کاهش اندازه داده شد (۱۴). (شکل شماره ۱)

جذب نوری آنها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ماکزیمم سیلیبیین (240 nm)، با تکرارهای ۳ تایی گرفته شده و سپس نمودار کالیبراسیون رسم و معادله خط آن محاسبه گردید (۱۳).

تهیه‌ی نیوزومهای حاوی سیلیبیین: به منظور تهیه‌ی نانونیوزومهای حاوی سیلیبیین از روش هیدراتاسیون لایه نازک استفاده شد که خلاصه آن بدین شرح است: ابتدا توپین ۶۰ و توپین ۲۰ و کلسترول را به ترتیب با نسبتهای مولی به

جدول ۱. نسبتهای مولی مورد استفاده در ساخت فرمولاسیونهای نیوزومی

Formula Code	Tween-60 %	Cholesterol %	Tween-20	Drug / Lipid
A-1	۹۰	۱۰	$\mu\text{l}10$	۳۰
A-2	۸۰	۲۰	$\mu\text{l}10$	۳۰
A-3	۷۰	۳۰	$\mu\text{l}10$	۳۰
B-1	۹۰	۱۰	$\mu\text{l}10$	۲۰
B-2	۸۰	۲۰	$\mu\text{l}10$	۲۰
B-3	۷۰	۳۰	$\mu\text{l}10$	۲۰
C-1	۹۰	۱۰	$\mu\text{l}10$	۱۰
C-2	۸۰	۲۰	$\mu\text{l}10$	۱۰
C-3	۷۰	۳۰	$\mu\text{l}10$	۱۰



شکل ۱: تصویر مراحل ساخت نانو نیوزوم بروش هیدراتاسیون فیلم نازک (۱۵)

Nano-ZetaSizer ES در دمای اتاق و زاویه 90° اندازه‌گیری گردید.

آنالیز سامانه‌ی نیوزومی حاوی سیلیبیین، توسط دستگاه طیف سنجی مادون قرمز: هدف این مرحله بررسی برهمکنش-های شیمیایی میان سامانه نیوزومی و دارو است. برای این منظور حامل‌های نیوزومی با سانتریفیوژ از سوسپانسیون جدا شده و محلول اضافی تبخیر گردید. نمونه‌ها با پتاسیم برمید (KBr) مخلوط شده و در درون پلیت فشرده می‌شوند. طیف FT-IR به منظور بررسی گروه‌های عاملی نانو نیوزومی در محدوده طول موج $4000-400\text{ cm}^{-1}$ برای نمونه‌های جامد، و طیف AT-IR $4000-600\text{ cm}^{-1}$ برای نمونه‌های مایع، اسکن گردید. در پایان، نمودار FT-IR دایوری سیلیبیین، سامانه نیوزومی فاقد دارو و سامانه نیوزومی حاوی دارو تهیه و با یکدیگر مقایسه گردیدند.

تصویربرداری از نانو نیوزومهای حاوی سیلیبیین

مقدار $25\text{ }\mu\text{L}$ از نمونه حاوی داروی ساخته شده بر روی یک لام ریخته و محلول در مجاورت هوا خشک شد. نمونه‌ها چند ثانیه با طلا پوشش داده شده تا رسانا شوند. سپس مورفولوژی سطحی نانوحامل‌ها (زبری، شکل، صافی و توده‌ای شدن) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) با قدرت $100\times$ و وات بررسی و تصویر نانوذرات حاوی دارو با بزرگمایی $40\times$ تهیه گردید.

رده سلولی و محیط کشت: در این مطالعه از رده سلول‌های سینه (MCF-7) 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) غنی شده با Glutamine 10% ، FBS درصد 10% ، در دمای 37°C با فشار 5% از CO_2 و 95% بخار آب کشت داده شد.

تعیین سمیت سلولی و بقای سلول: سمیت سلولی با روش MTT برای فرمولاسیون مطالعه شده به کارگرفته شد. به منظور اندازه‌گیری سمیت، سلول‌های MCF-7 سرطان پستان به

محاسبه راندمان انکپسولاسیون: جهت محاسبه‌ی میزان انکپسولاسیون سیلیبیین، ابتدا نانوحامل‌های حاوی سیلیبیین را بعد از کاهش سایز وارد کیسه دیالیز نموده و به مدت یک ساعت درون بشری محتوی بافر (PBS) و در دمای 4°C قرار داده شد تا سیلیبیین انکپسوله نشده حذف گردد. سپس نیوزومهای دارای سیلیبیین با نسبت‌های حجمی $1:10$ و $1:20$ با ایزوپروپیل مخلوط کرده تا دیواره لیپیدی اطراف سیلیبیین شکسته شود و دارو آزاد گردد. در مرحله بعد میزان جذب سیلیبیین انکپسوله شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ماکزیم سیلیبیین (240 nm) محاسبه شد. در پایان با استفاده از نمودار استاندارد سیلیبیین در ایزوپروپیل، و رابطه (۱)، درصد بارگذاری سیلیبیین در نیوزومهای دارای سیلیبیین محاسبه گردید ($14, 13$).

رابطه ۱:

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

بررسی سنتیک رهایش دارو از سامانه‌ی نیوزومی حاوی سیلیبیین: به منظور شبیه سازی رهایش دارو از حامل در محیط درون تنی، از PBS و دمای 37°C استفاده شد، تا بتوان شرایط مشابه درون تنی را برقرار ساخت. در مرحله‌ی نخست 1 mL از محلول نیوزومی حاوی سیلیبیین درون کیسه دیالیز قرار گرفت. در مرحله‌ی دوم کیسه دیالیز درون یک محیط ایزوله (فالکون استریل و بسته) با تنظیمات یاد شده قرار داده شد و استیرر گردید. در مرحله‌ی سوم از آن محیط اطراف کیسه دیالیز در زمان‌های مشخص صورت نمونه‌برداری شد. در پایان نیز با بهره‌گیری از معادله کالیراسیون سیلیبیین در بافر PBS نسبت به محاسبه غلظت‌های آزاد شده دارو در دمای 4°C و با $\text{pH} = 5/4$ در زمان‌های مختلف و رسم نمودار آن اقدام گردید (14).

تعیین اندازه نانو ذرات و پتانسیل زتا: پتانسیل زتای (Zeta-Potential) فرمولاسیون نیوزومی و سایز آن، با استفاده از دستگاه زتا سایزر (ساخت شرکت مالورن، انگلستان) مدل

توسط دستگاه الیزا ریدر ثبت و در نهایت با توجه به رابطه‌ی زیر درصد زنده‌مانی سلولها محاسبه شد.

رابطه (۲):

$\times 100$ میانگین جذب نوری در محیط کشت - میانگین جذب نوری در گروه آزمون
میانگین جذب نوری در محیط کشت - میانگین جذب نوری در گروه کنترل

نتایج

میزان بارگذاری سیلیبینین، انتخاب فرمول نهایی و بررسی الگوی رهایش دارو از فرمول نهایی: راندمان انکپسولاسیون برای هریک از فرمولاسیون‌ها با توجه به نمودار کالیراسیون سیلیبینین در ایزوپروپیل (تصویر ۲-ا) و همچنین حداکثر رهایش دارو از نانونیوزومهای حاوی سیلیبینین در شرایط شبه سلول سرطانی و با استناد به نمودار کالیراسیون سیلیبینین در PBS (تصویر ۲-ب) محاسبه گردید و نتایج حاصل در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. حداکثر رهایش داروی سیلیبینین طی ۴۸ ساعت و درصد بارگذاری دارو در فرمولاسیونهای نیوزومی مختلف

نام فرمولاسیون	درصد بارگذاری دارو	حداکثر رهایش ۴۸ ساعته
A-1	$53/03 \pm 2$	58/72
A-2	$86/04 \pm 0/01$	34/72
A-3	93/72	67/69
B-1	$22/01 \pm 1$	51/7
B-2	$83/71 \pm 0/09$	67/15
B-3	$82/88 \pm 2$	77/35
C-1	$66/01 \pm 1$	75/72
C-2	$92/87 \pm 5$	89/03
C-3	$67/59 \pm 1/4$	58/42

نانونیوزومهای حاصل از فرمولاسیون C-2 رسم گردید (تصویر ۲-ج).

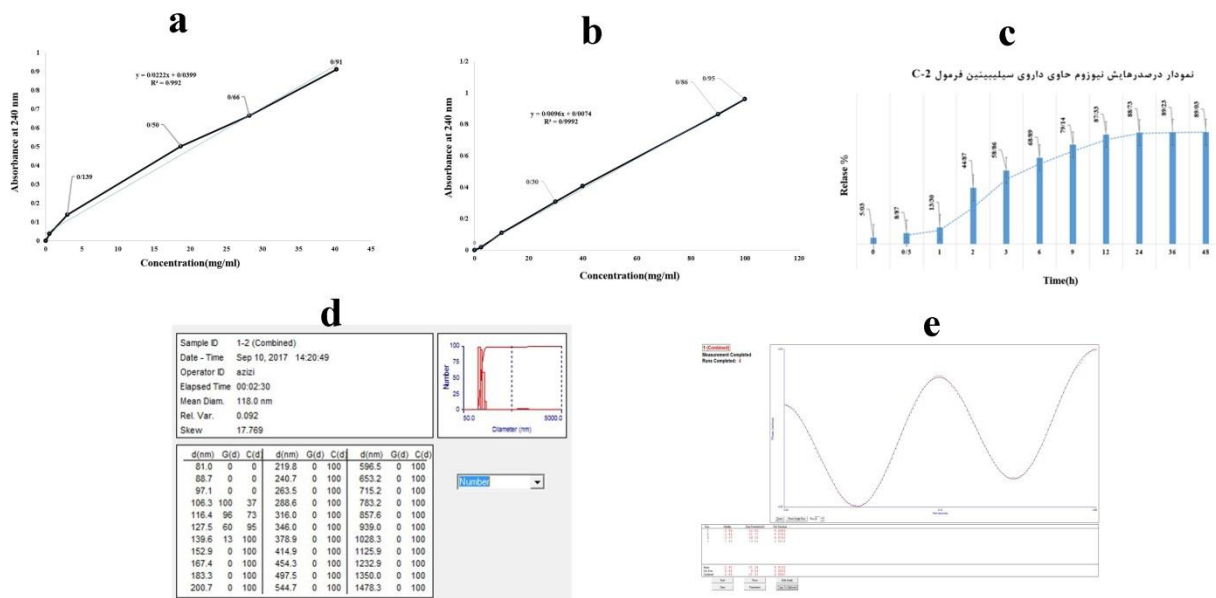
بررسی الگوی رهایش دارو از نیوزومهای حاصل از فرمولاسیون C-2 نشان می‌دهد که، در ۱۲ ساعت اولیه به دلیل اختلاف غلظت زیاد دارو میان نانونیوزوم و محیط (بافر)، رهایش دارو با سرعت زیادی انجام میگیرد و در ادامه با کاهش این غلظت شیب رهایش دارو کاهش می‌یابد.

طور جداگانه با غلظت 10^4 در هرچاهک در پلیت ۹۶ تایی به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس، غلظتهای ۱۰۰ و ۱۰۰۰ و ۵ میکروگرم بر میلی لیتر از نیوزوم بدون دارو تهیه و سلولها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت با آنها تیمار گردیدند تا میزان سمیت نیوزومهای فاقد دارو بررسی گردد. همچنین غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ از سیلیبینین و $100 \mu\text{g/ml}$ نانونیوزومهای حاوی سیلیبینین تهیه و سلول های موجود در پلیت ۹۶ خانه برای زمان های ۲۴، ۴۸ ساعت با غلظت های ذکر شده تیمار گردیدند. پس از گذشت زمان تیمارهای مورد نظر، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر به هر چاک 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

بنابراین با توجه به درصد بارگذاری دارو در نانونیوزومها و همچنین میزان رهایش دارو از نانونیوزومها طی ۴۸ ساعت، فرمولاسیون C-2 به دلیل برخورداری از درصد بارگذاری بالاتر ($92/87 \pm 5$ درصد) و نیز حداکثر رهایش دارو طی ۴۸ ساعت به میزان $89/03$ درصد، بعنوان فرمولاسیون منتخب برگزیده شده تا سایر بررسیهای فیزیکوشیمیایی بر روی آن انجام گیرد. همچنین با استناد به نمودار کالیراسیون سیلیبینین (تصویر ۲-ب) نمودار رهایش داروی سیلیبینین از

۱۱۸ (تصویر ۲-d) و حاوی بار سطحی (پتانسیل زتا) $\pm 0.9 \text{ mV}$
 ۳۳/۲۱- می باشد (تصویر ۲-e).

اندازه و پتانسیل زتا فرمولاسیون منتخب (C-2): با استاندارد به نتایج حاصل از آنالیز نانونیوزوم حاوی دارو توسط دستگاه DLS، نانونیوزوم حاصل از فرمولاسیون C-2 دارای اندازه



تصویر ۲. (a) نمودار استاندارد سیلیبینین در ایزوپروپیل، (b) نمودار استاندارد سیلیبینین در PBS، (c) نمودار رهش داروی سیلیبینین در شرایط شبه سلول سرطانی (C ۲۲°) از فرمولاسیون C-2، (d) اندازه ذرات سامانه نیوزومی حاوی سیلیبینین، (e) پتانسیل زتا سامانه نیوزومی حاوی سیلیبینین

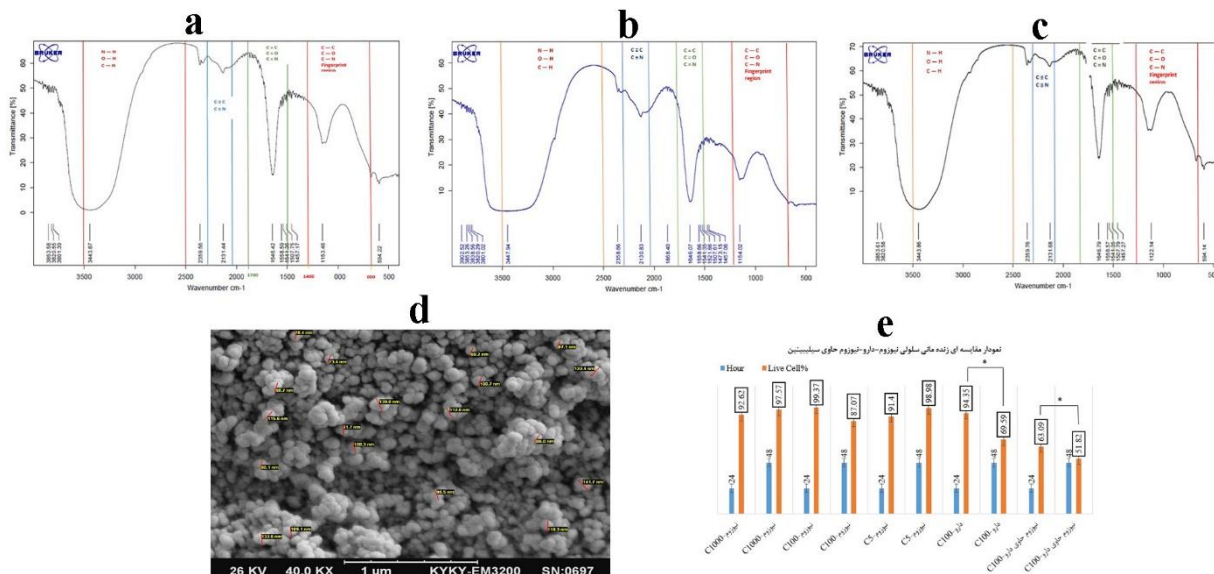
نداشته است و پیک جدیدی مبنی بر برهمکنش دارو و نانوسامانه در طیف نانوسامانه دارو مشاهده نمی شود. بررسی تصویر میکروسکوپ الکترونی از نیوزومهای حاوی دارو در فرمولاسیون C-2: تصویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان می دهد که نانونیوزومهای حاوی دارو از شکل کروی و همگنی برخوردار هستند. همچنین این تصویر نشان می دهد که چسبیدگی میان ذرات مشاهده نمی شود (تصویر ۳-d).

بررسی سمیت سلولی نانوسامانه بهینه دارای سیلیبینین: بررسی نتایج حاصل از تست سمیت بر ردهی MCF-7 نشان می دهد که، با توجه به بقای بیش از ۸۵ درصد سلولها در اثر تیمار با نانونیوزوم فاقد دارو در تمامی غلظت ها (۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۵ میکروگرم بر میلی لیتر) در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، این نانو سامانه فاقد دارو از سمیت پایین برخوردار می باشد. همچنین مقایسه سمیت داروی آزاد سیلیبینین و داروی سیلیبینین نیوزومه شده بر ردهی سلولی MCF-7، نشان می دهد که در

نتایج بررسی طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR): در طیف FT-IR داروی سیلیبینین پیکهای شاخصی همچون 1646 cm^{-1} ، 1547 cm^{-1} ، 1350 cm^{-1} و 1154 cm^{-1} است که به نظر می رسد به ترتیب متعلق به گروه های کربونیل، هیدروکسیل، کربن دی اکسید و C-O های اتری می باشد (تصویر ۳-a). همچنین بررسی طیف FT-IR نیوزوم فاقد داروی سیلیبینین نشان که پیک 1646 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی گروه OH و پیک 1154 cm^{-1} مربوط به یک سری حلقه های پنج تایی می باشد که در ساختار شیمیایی C-O های اتری قابل مشاهده است (تصویر ۳-b). با مقایسه طیف FT-IR نانونیوزوم فاقد دارو و طیف FT-IR نانونیوزوم حاوی دارو (تصویر ۳-c) شباهت زیادی دیده میشود به گونه ای که اکثر پیکهای اصلی سامانه فاقد دارو با اندکی جا به جایی (شیفت) در سامانه حاوی دارو قابل مشاهده است که نشان دهنده این واقعیت است که دارو ضمن انکپسوله شدن مناسب در نانونیوزوم، با نانوسامانه برهمکنش شیمیایی

داروی انکپسوله شده نشان می‌دهد که سمیت دارو آزاد و سمیت نانونیوزوم حاوی دارو وابسته به زمان بوده و با افزایش زمان تیمار از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت، سمیت بیشتری را ایجاد نموده است (تصویر ۳-ع).

غلظت‌های مشابه (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از دارو و نانونیوزوم حاوی دارو، سمیت سیلیبینین انکپسوله شده در مقایسه با داروی آزاد، در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت بیشتر است ($P < 0.05$). از طرف دیگر مقایسه میزان سمیت داروی آزاد و



تصویر ۳. (a) طیف FT-IR دارو سیلیبینین، (b) طیف FT-IR نانونیوزوم فاقد دارو سیلیبینین (c)، طیف FT-IR نانونیوزوم حاوی دارو سیلیبینین، (d) تصویر SEM از نانونیوزومهای حاوی دارو، (e) نمودار میزان سمیت سیلیبینین انکپسوله شده و سیلیبینین آزاد بر رده MCF-7 (علامت * نشان دهنده تفاوت‌های معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$))

سمیت بیشتر داروی لیپوزوم نسبت به شکل آزاد است (۱۶). علوی و همکاران (۲۰۱۳) نیز، اثر گذارای هیدروکسی اوره‌ی لیپوزوم را بر رده‌ی سلولی سرطان سینه ارزیابی نمودند و نشان دادند که سمیت داروی لیپوزوم نسبت به داروی آزاد بیشتر است (۱۷). علاوه بر این علوی و همکاران (۲۰۱۴)، نانولیپوزومهای پگیله‌ی محتوی هیدروکسی اوره به منظور اثرگذاری بر رده‌ی سلولی MCF-7 تهیه کرده و گزارش نمودند که اثرگذاری داروی لیپوزوم نسبت به داروی آزاد بر رده سلولی MCF-7 به مراتب بیشتر است (۱۸). پژوهشهای ملکپور و همکاران (۱۶) و علوی و همکاران (۱۷) همانند پژوهش حاضر نشان میدهد که استفاده از نانوحاملهای لیپیدی برای رسانش داروهای ضد سرطان، باعث افزایش اثرات ضد سرطانی این داروها می‌شود.

اوچی اردبیلی و همکاران (۲۰۱۵) نانوذرات لیپوزومی حاوی سیلیبینین با اندازه ذرات ۴۶/۳ نانومتر، پتانسیل زتای ۲۳/۲۵- و

نتیجه‌گیری در پژوهش حاضر، فرمولاسیونی از نانونیوزومهای حاوی داروی سیلیبینین پیشنهاد شد که ضمن برخورداری از بار سطحی منفی، انکپسولاسیون ۹۵/۵۸٪ و اندازه‌ی ۱۱۸ nm دارای رهایش آهسته در شرایط شبه سلول سرطانی است به گونه‌ای که حداکثر رهایش دارو برای این نانو سامانه‌ی لیپیدی در مدت زمان ۴۸ ساعت در شرایط سلول سرطانی ۸۹/۰۳٪ می‌باشد. همچنین بررسی سمیت سلولی این نانوحامل حاوی دارو نشان می‌دهد که در غلظت‌های یکسان، میزان سمیت سیلیبینین نیوزومه در مقایسه با سیلیبینین آزاد بر روی رده سلولی MCF-7 سرطان پستان بیشتر است.

تاکنون پژوهش‌های متعددی بر روی نانوحامل‌های لیپیدی صورت پذیرفته است، ملکپور و همکاران (۲۰۱۰)، سمیت داروی دوکسوروبیسین لیپوزوم و آزاد را بر رده‌ی سلولی MDA-MB-231 پستان ارزیابی نمودند که نتایج آن حاکی از

انکپسولاسیون ۹۲/۳٪ و رهایش ۸۰٪ به روش Solvent evaporation تهیه و گزارش نمودند که میزان سمیت آن بر ردهی سلولی A2780 تخمدان نسبت به داروی آزاد کورکومین بیشتر است (۲۳). همچنین شیرزاد و همکاران در سال ۲۰۱۷، اثر نانولیپوزومهای پگیله‌ی حاوی سیس پلاتین را بر روی ردهی سلولی A2780CP تخمدان ارزیابی نمودند که گزارش نمودند که انکپسولاسیون دارو باعث افزایش کارایی آن بر سلولهای تخمدان می‌شود (۲۴). نتایج پژوهش‌های Kanaani و شیرزاد همانند پژوهش حاضر تاییدی بر افزایش سمیت داروهای ضد سرطان نیوزومه شده نسبت به داروهای آزاد (نیوزومه نشده) بر سلولهای سرطانی است.

نادری‌نژاد و همکاران (۲۰۱۷)، نانو نیوزومهای محتوی کورکومین به منظور اثر گذاری بر سرطان استخوان تهیه که دارای اندازه ذرات ۲۴۲ نانومتر، پتانسیل زتا -۳۸ میلی ولت و درصد بارگذاری ۹۵/۲٪ بودند. همچنین این پژوهش نشان داد که میزان سمیت داروی کورکومین نیوزومه نسبت به حالت آزاد بر رده سلولی MG-63 بیشتر است (۲۵).

حقیرالسادات و همکاران (۲۰۱۷)، فرمولاسیون جدیدی برای تهیه نانولیپوزومهای حاوی دوکسوروبیسین پیشنهاد نمودند که سایز متوسط و زیگول‌ها، بازده درون‌گیری، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتای فرمول پیشنهاد شده به ترتیب ۹۳/۶۱، ۸۲/۸، ۰/۱۴ و -۲۳ میلی ولت بودند (۲۶). Castoldi و همکاران (۲۰۱۷)، لیپوزومهای حاوی کلسیفیدول تهیه نمودند که دارای راندمان انکپسولاسیون ۲۳ درصد، شاخص پراکندگی ۰/۱، پتانسیل زتا -۸ میلی ولت و اندازه ذرات زیر ۲۰۰ نانومتر بوده است. همچنین این پژوهش نشان می‌دهد که کلسیفیدول انکپسوله شده باعث کاهش بقای عفونت باکتریایی در برونشهای انسانی می‌شود (۲۷).

حقیرالسادات و همکاران (۲۰۱۸)، اثر گذاری نانولیپوزومهای دارای دوکسوروبیسین با شارژهای سطحی متفاوت را بر روی ردهی سلولی سرطان استخوان بررسی نمودند که نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که میزان سمیت داروی دوکسوروبیسین

میزان بارگذاری دارو ۲۴/۳۷٪ را تهیه نمودند. در این پژوهش ضمن تایید آهسته رهش بودن نانولیپوزومهای حاوی سیلیبینین، گزارش شده است که حداکثر رهایش دارو از این نانو سامانه طی ۷۵ ساعت ۲۴/۸۷٪ می‌باشد (۱۹). استفاده از نانو ذره نیوزومی و درصد بارگذاری بالاتر دارو در پژوهش حاضر از جمله مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش اوچی اردبیلی و همکاران است.

Shah و همکاران (۲۰۱۶)، فرمولاسیونهای مختلفی از نانولیپوزومهای حاوی داروی ناپروکسن را تهیه و گزارش نمودند که اندازه، حداکثر بارگذاری دارو و رهایش دارو طی ۱۲ ساعت در این نانو سامانه با توجه به فرمولاسیونهای مختلف به ترتیب بین ۳۸۱ تا ۴۱۴ نانومتر، ۶۰/۳۶ تا ۷۱/۹۸٪ و ۶۵/۹۱ تا ۷۵/۲۴٪ متغیر بوده است (۲۰). بررسی الگوی رهایش طی ۴۸ ساعت، اندازه ذرات کوچکتر و میزان بارگذاری بیشتر دارو، از جمله مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش Shah و همکاران است.

Ying و همکاران (۲۰۱۶)، نانو نیوزومهای حاوی کورکومین با درصد بارگذاری ۹۲/۳٪ تهیه نمودند و سمیت آن را بر رده سلولی سرطان تخمدان ارزیابی نمودند. این پژوهش نشان می‌دهد که کورکومین نیوزومه در مقایسه با کورکومین آزاد از سمیت بالاتری برخوردار است (۲۱). پژوهش Ying و همکاران همانند پژوهش حاضر نشان می‌دهد که استفاده از نیوزوم جهت رسانش داروهای ضد سرطان باعث افزایش سمیت دارو نسبت به شکل آزاد دارو (نیوزومه نشده) بر سلولهای سرطانی می‌شود.

Naderinezhad و همکاران در سال ۲۰۱۷ نانولیپونیوزومهای حاوی دوکسوروبیسین تهیه و سمیت آن را بر رده‌های سلولی KG-1 مغز استخوان، Saos-2 استئوسارکوما و MG-63 استیوبلاست، سنجیده و گزارش نمودند که دوکسوروبیسین محبوس شده باعث کاهش بیشتر بقای سلولهای سرطانی نسبت به شکل آزاد این دارو می‌شود (۲۲). Kanaani و همکاران (۲۰۱۷)، نیوزومهای حاوی کورکومین را با درصد

بهرامی بنان (۲۰۱۸)، ضمن ساخت سامانه‌های نیوزومی حاوی داروی دوکسوروبیسین ارزیابی میزان سمیت آن را بر رده KG-1 مغز استخوان گزارش نمودند که وزیکولهای نیوزومی حاصل به ترتیب دارای اندازه، پتانسیل زتای و راندمان انکپسولاسیون، $160/37 \pm 2/65$ نانومتر، $58/11$ میلی ولت $94/18\%$ می‌باشد و میزان سمیت داروی انکپسوله نسبت به داروی آزاد بر رده KG-1 بیشتر بوده است (۳۱). نتایج پژوهش بهرامی بنان به دلیل تشابه در روش ساخت و نوع نانو ذره به نتایج پژوهش حاضر بسیار نزدیک بوده و همانند پژوهش حاضر مویید این نکته است که انکپسوله کردن داروهای ضد سرطان باعث افزایش سمیت آنها بر رده‌های مختلف سلولهای سرطانی می‌شود.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر فرمولاسیونهای مختلفی از نانوحاملهای لیپیدی حاوی سیلیبینین طراحی و ساخته شد که سرانجام منتهی به فرمولی نهایی (C-2) با درصد بارگذاری بالا از این نانوسامانه‌ی حاوی سیلیبینین شد که با برخورداری ویژگیهای فیزیکوشیمیایی مناسب، رهایش کنترل شده‌ای در شرایط سلول سرطانی دارد و باعث افزایش سمیت سیلیبینین در حالت انکپسوله شده در مقایسه با حالت آزاد گردیده است. بنابراین با توجه به شواهد فوق، نانو سامانه‌های نیوزومی حاضر را میتوان احتمالا به عنوان حاملی مناسب جهت رسانش داروی سیلیبینین به سلولهای سرطانی از جمله سرطان پستان پیشنهاد نمود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد می‌باشد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از تمامی کسانی که در اجرای پژوهش حاضر همکاری نمودند، تقدیر و تشکر نمایند.

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان گزارش نشده است.

در حالت لیپوزومه نسبت به حالت آزاد بیشتر است. علاوه بر این این پژوهش گزارش می‌دهد که سمیت دارو در نانولیپوزومهای کاتیونی نسبت به آنیونی بیشتر است (۲۸). اگرچه پژوهش حقیرالسادات و همکاران از منظر نوع نانو ذره مورد استفاده و نوع داروی محبوس شده با پژوهش حاضر متفاوت است، ولی همانند پژوهش حاضر نشان میدهد که نانو ذرات لیپیدی حاملهای مناسبی جهت رسانش داروهای ضد سرطانی به رده‌های سلولهای سرطانی هستند.

مجدی زاده و همکاران (۲۰۱۸)، نانولیپوزومهای حاوی اسانس نعناع فلفلی تهیه نمودند که وزیکولهای لیپوزومی حاوی اسانس با اندازه $13/39 \pm 247$ نانومتر، $2/7 \pm 61/38\%$ میزان راندمان انکپسولاسیون، پتانسیل زتا $0/74 \pm 34/54$ میلی ولت و شاخص پراکندگی $0/01 \pm 0/32$ می‌باشد (۱۳). اندازه ذرات کوچکتر، درصد بارگذاری بیشتر و استفاده از نانوحامل نیوزومی، از جمله مزیت‌های پژوهش حاضر نسبت به پژوهش مجدی زاده و همکاران میباشد که به نظر میرسد تفاوت در نوع ماده بارگذاری در پژوهش مجدی زاده نسبت به پژوهش حاضر، دلیل اصلی تفاوت زیاد درصد انکپسولاسیون و اندازه ذرات باشد.

ساسانی و همکاران (۲۰۱۸)، هیبریدهای لیپونیوزومی حاوی کورکومین تهیه نمودند که به ترتیب دارای اندازه، پتانسیل زتای و راندمان احتباس، $147/5$ نانومتر، $8/9$ میلی ولت و $1/85 \pm 98/12$ درصد می‌باشد (۲۹). نتایج بدست آمده از پژوهش ساسانی و همکاران به دلیل تشابه در روش ساخت و استفاده از نانوحاملهای مشابه به نتایج پژوهش حاضر بسیار نزدیک بوده است. هرچند مثبت‌تر بودن بار سطحی وزیکولهای پژوهش ساسانی و همکاران، از مزیت‌های آن بر پژوهش حاضر می‌باشد. Tang و همکاران (۲۰۱۸)، لیپوزومهایی دارای گامبوجیک اسید تهیه نموده اند که ضمن برخورداری از فعالیت ضد توموری بالا نسبیبت به گامبوجیک اسید انکپسوله نشده، دارای راندمان انکپسولاسیون ۹۵ درصد و اندازه ذرات ۷۵ نانومتر بوده است (۳۰).

References

1. Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, & Aggarwal BB. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *pharm res.* 2008; 25(9): 2097–116.
2. Clark WH. Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer.* 1991; 64(4): 631–44. 3.
3. Dellaire G, Berman N J and Arceci J R. Cancer Genomics: From Bench to Personalized Medicine. Academic Press. 2014; 194-211.
4. Salehi Z, Mohammaddoust S, Saedi H. The Genetic Association of SEP15 G1125A Polymorphism with breast. *jour guilan uni med sci.* 2017;26(101):1–7.
5. Nelson NJ. Migrant studies aid the search for factors linked to breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(7):436-8.
6. Das M, Mohanty C, Sahoo SK. Ligand-based targeted therapy for cancer tissue. *Expert Opin Drug Deliv.* 6(3):285–304.
7. Poste G, Kirsh R. Site-Specific (Targeted) drug delivery in cancer therapy. *natuer biotechnology.* 1983; 1:869-78
8. Tinsley R. Harrison, Braunwald E. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17th ed. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2008
9. Pashaei-Asl F, Pashaiasl M. Anti-Cancer Effect of Silibinin on Epithelial Ovarian Cancer Cell Line and P21 Gene Expression. *J Ardabil Univ Med Sci.* 2016; 16 (3) :300-308
10. Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Silibinin induces apoptosis and inhibits proliferation of estrogen receptor (ER)-negative breast carcinoma cells through suppression of nuclear factor kappa B activation. *Archives of Iranian medicine.* 2014 May 1;17(5):366. Pawar SD, Pawar RG, Kodag PP, Waghmare AS, Niosome: An Unique Drug Delivery System, *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*, 3, 2012, 409-412.
11. Pawar SD, Pawar RG, Kodag PP, Waghmare AS. Niosome: an unique drug delivery system. *International journal of biology, pharmacy and allied sciences.* 2012; 3: 409-412.
12. Mujoriya RZ, Dhamande K, Bodla RB. Niosomal drug delivery system—a review. *Int J Appl Pharm.* 2011 May 28;3(3):7-10.
13. 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. *J Shaeed Sdoughi Univ Med Sci Yazd.* 2018;25(10):853–64. [Persian]
14. Haghirsadat BF, Amouabedini G, Naderinezhad S, Sheikhha MH, Malaei-balasi Z, Akbarzadeh A, et al. An evaluation of the transmembrane ammonium sulfate gradients method in lipid system to improve trapping capacity of amphipathic weak. *New Cell Mol Biotechnol J.* 2017;7(28):49–60. [Persian]
15. Moghassemi S, Hadjizadeh A. Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review. *Journal of controlled release.* 2014 Jul 10;185:22-36.
16. Malekpour B, Jalalinadoushan mohammad reza, Mansoori S, Hajihoseini R, Mirzaei M, Jamali D. Comparison of the Killing Effect of Free, Negative and Neutral Charged Liposomal Doxorubicin on Breast Cancer Cell Line. *Daneshvar Medicine.* 2010;17(85): 63–70. [Persian]
17. Alavi seyed ebrahim, Koohi-moftakhar-esfahani M, Akbarzadeh A. Evaluating the effect of nanoliposomal hydroxyurea urea on the breast cancer cell line. *New Cellular & Molecular Biotechnology Journal.* 2013; 3(11): 63–7. [Persian]
18. Alavi seyed ebrahim, Koohi-moftakhar-esfahani M, Akbarzadeh A. Cytotoxic activity of pegylated nanoliposomal hydroxyurea in MCF-7 cell line. *New Cellular & Molecular Biotechnology Journal.* 2014; 4(13): 33–6. [Persian]
19. Ochi Ardebili M, Amoabediny G, Rezayat S, Akbarzadeh A, Ebrahimi B. Design and Preparation of Encapsulated Nano-Liposome Controlled Release including Silibinin Anti-Cancer Herbal Drug (Nano Phytosome). *JSSU.* 2015; 23 (3) :2000-2012. [Persian]
20. Shah N, Gupta MK, Jain NK & Jain N. Charcterization, optimization and niosome containing Naproxen. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research* 2016; 5(1): 1-6.
21. Xu YQ, Chen WR, Tsosie JK, Xie X, Li P, Wan JB, He CW, Chen MW. Niosome encapsulation of curcumin. *Journal of Nanomaterials.* 2016 Mar 1;2016:15.

22. Naderinezhad S, Amouabedini G, Haghirsadat F. Co-delivery of hydrophilic and hydrophobic anticancer drugs using biocompatible pH-sensitive lipid-based nano-carriers for multidrug-resistant cancers. *RSC Adv.* 2017;7(1):30008–19
23. Kanaani L, Mazloumi Tabrizi M & Akbarzadeh Khiyavi A. Improvement the efficacy of cisplatin by Niosome Nanoparticles against human Breast cancer cell line BT-20: An in vitro study. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology* 2017; 2(2): 25-6.
24. Shirzad M, Jamehbozorgi S, Aghabozorg H, Akbarzadeh A. Drug Delivery of Pegylated Nanoliposomal Cisplatin in Ovarian Cancer Cell Line A2780CP: in vitro Study. *New Cellular & Molecular Biotechnology Journal.* 2017; 7(25): 77–84. [Persian]
25. Naderinezhad S, Haghirsadat BF, Amouabedini G, Naderinezhad A, Esmaeili Z, Akbarzadeh A. Synthesis of biodegradable and self-assembled anionic nano –carrier: Novel approach for improvement of Curcumin- delivery to bone tumors cells & Mathematical modeling of drug-release kinetic. *New Cell Mol Biotechnol J.* 2017;7(27):77–84. [Persian]
26. Haghirsadat F, Amoabediny G, Sheikha MH, Zandieh-doulabi B, Naderinezhad S, Helder MN, et al. New liposomal doxorubicin nanoformulation for osteosarcoma : Drug release kinetic study based on thermo and pH sensitivity. *Chem Biol Drug Des.* 2017;90(3):368–79.
27. Castoldi A, Herr C, Niederstraßer J, Labouta HI, Melero A, Gordon S, Schneider-Daum N, Bals R, Lehr CM. Calcifediol-loaded liposomes for local treatment of pulmonary bacterial infections. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2017 Sep 1;118:62-7.
28. Haghirsadat BF, Nadernezhad S, Amoabediny G, Montazeri F, Zandieh-doulabi B. effects of surface charge on cytotoxicity of liposomal Doxorubicin on bone cancer cell line. *Daneshvar Med.* 2018;25(133):19–26. [Persian]
29. Sasani E, Shahi Malmir H, Daneshmand F, Majdizadeh M, Haghirsadat B F. A new study on synthesize and optimization of PEGylated LipoNiosomal nanocarriers containing curcumin for use in cancer chemotherapy . *JSSU.* 2018; 26 (6): 528-541. [Persian]
30. Tang WL, Tang WH, Szeitz A, Kulkarni J, Cullis P, Li SD. Systemic study of solvent-assisted active loading of gambogic acid into liposomes and its formulation optimization for improved delivery. *Biomaterials.* 2018 Jun 1;166:13-26.
31. Bahrami-Banan F, Shekhha M H, Ghasemi N, Majdizadeh M, Haghirsadat B F. Preparation and Study of Nano-Niosomes Containing Doxorubicin and Evaluation of its Toxicity on Acute Myeloblastic Leukemia Cell Line KG-1. *payavard.* 2018; 12 (4). [Persian]

Investigating the effect of lipid nanoparticles containing silibinin anti-cancer drug on the growth of breast cancer MCF-7 cell line

Arsalan Karimi-Moghddam¹, Narges Nikoonahad Lotfabadi^{1*}, Bibi Fatemeh Haghirsadat²,
Mohammad Majdizadeh³

1. Department of Biology, Sciences Faculty, Science and Arts University, Yazd, Iran
2. Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
3. Department of Nano-Biotechnology, Nano-Biotech Foresight Company, Science & Technology Park of Yazd, Yazd, Iran

Corresponding author: nikounahad_1976@yahoo.com

Abstract

Background & Aim: Silibinin is a blend of flavonoids, which is extracted from *Marianum Silybum*, and its anti-cancer effects on breast cells have been studied. The aim of this study was to provide physiochemical evaluation of various formulations of the niosomal system containing silibinin, in order to achieve targeted formulation to better fight breast cancer cells.

Methods: Nano-carriers were synthesized using different molar ratios of structural elements such as Cholesterol, Polysorbates 20 and 60 and of the 9 synthetic formulations; the best formulation was selected based on the encapsulation efficiency. Then, the pattern of drug release in conditions similar to cancerous cells, the size of nano-carrier and surface charge were investigated. Furthermore, the interaction of drugs and nano-carries was studied by investigating IR spectra and particle morphology using scanning electron microscopy. At the end, using the MTT method, niosomal silibinin toxicity was measured on the MCF-7 cell line.

Results: The final formulation containing silibinin, had 118nm size, 92.87±5% encapsulation efficiency, -31.33±0.9 mV zeta potential. The maximum release rate of the drug for this nano-carrier in cancerous cells within 48 hours was 89.03%. The results of MTT show that the amount of toxicity of encapsulated silibinins is higher than the non-capsulated silibinin on MCF-7 cell line.

Conclusion: The results of this study showed that the niosomal system, having the proper physiochemical properties, increases the toxic effect of silibinin on MCF-7 cell line. Therefore, it can be a suitable carrier for drug delivery to cancer cells.

Keywords:

Niosome,
Silibinin,
Drug Carriers,
Anti-neoplastic Agents,
MCF-7 cells

©2018 Torbat Heydariyeh
University of Medical Sciences.
All rights reserved.

How to Cite this Article: Karimi-Moghddam A, Nikoonahad Lotfabadi N, Haghirsadat 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. 2018;6(4):1-12.