Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

Anti-Cancer Effects of Nanoliposomes Containing *Rosemary* and *Zataria multiflora Boiss* Essential Oils on HepG2 Cell Line under in Vitro Conditions

S. Ghafarkhani (MSc)[1], M. H. Aarabi (PhD)[2], M. Safari (PhD)[3], M. Shafee Ardestani (Pharm D, PhD)[4], N. Kheiripour (PhD)[*1]

1.Biochemistry and Nutrition Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R.Iran.
2.Department of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R.Iran.
3.Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R.Iran.
4.Department of Radiopharmacy, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

Article Type

Research Paper

Received:
Feb 12nd 2021
Revised:
May 29th 2021
Accepted:
Aug 23rd 2021

ABSTRACT

Background and Objective: In recent years, with increasing interest in the use of natural substances such as essential oils, extensive studies have been conducted to use them more efficiently in the form of nanoliposomes. The present study was conducted to investigate the anti-cancer effects of nanoliposomes containing *Rosemary* and *Zataria multiflora Boiss* essential oils on HepG2 cell line under in vitro conditions.

Methods: In this basic-applied research, nanoliposomes containing *Rosemary* and *Zataria multiflora Boiss* essential oils were used. The mortality rate of HepG2 cell line was calculated using MTT method and IC50 was obtained. The study groups calculated according to IC50 were: control group, the group receiving 79.72 µg/ml *Zataria multiflora Boiss* nanoliposome for 48 hours and the group receiving 53.50 µg/ml *Rosemary* nanoliposome for 72 hours. The rate of apoptosis and necrosis of cancer cells and the type of cancer cell cycle were determined by flow cytometry.

Findings: The results showed that nanoliposomes containing *Rosemary* essential oil after 72 hours (53.50 µg/ml) and *Zataria multiflora Boiss* after 48 hours (79.72 µg/ml) showed the highest capability to inhibit the growth of HepG2 cell line ($p<0.05$). The type of cell mortality was significantly apoptotic compared to the control group, as nanoliposomes containing *Zataria multiflora Boiss* caused apoptosis in 37.3% and *Rosemary* nanoliposomes in 32.1% of cells ($p<0.05$). Inhibition of cancer cells was in the G2 phase, which indicates that nanoliposomes inhibit cancer cells in the cell division phase ($p<0.05$).

Conclusion: The results showed that nanoliposomes containing essential oils have anti-cancer properties, cause cell apoptosis and stop cell growth in the G2 phase of the cell cycle.

Keywords: *Liver Cancer, Nanoliposomes, Essential Oils, Rosemary, Zataria multiflora Boiss, HepG2.*

Cite this article: Ghafarkhani S, Aarabi MH, Safari M, Shafee Ardestani M, Kheiripour N. Anti-Cancer Effects of Nanoliposomes Containing *Rosemary* and *Zataria multiflora Boiss* Essential Oils on HepG2 Cell Line under in Vitro Conditions. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2022; 24(1): 141-50.

© The Author(S).
Publisher: Babol University of Medical Sciences

*Corresponding Author: N. Kheiripour (PhD)
Address: Biochemistry and Nutrition Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R.Iran.
Tel: +98 (31) 55540021. **E-mail:** nejatkh.bio@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.19.5]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.141]

Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

اثرات ضد سرطانی نانولیپوزوم های حاوی اسانس رزماری و آویشن بر روی رده سلول HepG2 در محیط invitro

سمیرا غفار خانی (MSc)[۱]، محمدحسین اعرابی (PhD)[۲]، مصطفی صفاری (PhD)[۳]، مهدی شفیعی اردستانی (Pharm D, PhD)[۴]، نجات خیری پور (PhD)[۱*]

۱. مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۲. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳. گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۴. گروه داروسازی هسته‌ای، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نوع مقاله
مقاله پژوهشی

دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۴
اصلاح: ۱۴۰۰/۳/۸
پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۱

چکیده

سابقه و هدف: در سال های اخیر، با افزایش علاقه به استفاده از مواد طبیعی مانند اسانس ها، مطالعات گسترده ای جهت استفاده کارآمدتر از آنها به شکل نانولیپوزوم صورت گرفته است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات ضد سرطانی نانولیپوزوم های حاوی اسانس رزماری و آویشن بر روی رده سلول HepG2 در محیط invitro می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه بنیادی- کاربردی نانولیپوزوم های حاوی اسانس رزماری و آویشن بهینه شده، استفاده شد. با استفاده از روش MTT میزان مرگ و میر رده سلول HepG2 محاسبه شده و IC50 به دست آمد. گروه های مورد مطالعه بر اساس IC50 محاسبه شده شامل: گروه کنترل، گروه دریافت کننده نانولیپوزوم آویشن ۷۹/۷۲ µg/ml به مدت ۴۸ ساعت و گروه دریافت کننده نانولیپوزوم رزماری ۵۳/۵۰ µg/ml به مدت ۷۲ ساعت می باشد. میزان آپوپتوز و نکروز سلول های سرطانی و نوع چرخه سلول های سرطانی به روش فلوسایتومتری مشخص گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد نانولیپوزوم های حاوی اسانس رزماری پس از ۷۲ ساعت (۵۳/۵۰ µg/ml) و آویشن شیرازی پس از ۴۸ ساعت (۷۹/۷۲ µg/ml) بیشترین توانایی مهار رشد رده سلول HepG2 را دارند (p<۰/۰۵). نوع مرگ و میر سلول ها نسبت به گروه کنترل به صورت معنی داری به صورت آپوپتوز بود، به صورتیکه نانولیپوزوم های حاوی آویشن سبب آپوپتوز ۳۷/۳٪ و نانولیپوزوم رزماری ۳۲/۱٪ از سلول ها شده بودند (p<۰/۰۵). مهار سلول های سرطانی در مرحله G2 بود که نشان می دهد نانولیپوزوم ها سلول های سرطانی را در مرحله تقسیم سلولی مهار می کنند (p<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد نانولیپوزوم های حاوی اسانس دارای خاصیت ضد سرطانی بوده، سبب آپوپتوز سلولی و توقف رشد سلول ها در مرحله G2 سیکل سلولی می شوند.

واژه‌های کلیدی: سرطان کبد، نانولیپوزوم، اسانس، رزماری، آویشن، HepG2.

استناد: سمیرا غفار خانی، محمدحسین اعرابی، مصطفی صفاری، مهدی شفیعی اردستانی، نجات خیری پور. اثرات ضد سرطانی نانولیپوزوم های حاوی اسانس رزماری و آویشن بر روی رده سلول HepG2 در محیط invitro. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل، ۱۴۰۱؛ ۲۴(۱): ۵۰-۱۴۱.

© The Author(S).
Publisher: Babol University of Medical Sciences

[DOI: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.19.5]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.141]

▣ این مقاله مستخرج از پایان نامه سمیرا غفار خانی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی بالینی و طرح تحقیقاتی به شماره ۹۸۰۱۳ دانشگاه علوم پزشکی کاشان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر نجات خیری پور
آدرس: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری های متابولیک. تلفن: ۰۳۱-۵۵۵۴۰۰۲۱ رایانامه: nejatkh.bio@gmail.com

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی از دیرباز برای درمان بیماری ها به دلیل عوارض جانبی کمتر، دسترسی آسان تر و هزینه های کمتر رایج بوده است (۱). آویشن شیرازی (*Zataria multiflora Boiss*) از تیره نعناعیان و گونه ای است که متعلق به جنس زاتاریا بوده و بومی ایران، افغانستان و پاکستان است (۲). ترکیبات مهم موجود در آویشن شیرازی تیمول (Thymol) و کارواکرول (Carvacrol) هستند (۴و۳). مطالعات گسترده ای بر روی خواص ضد سرطانی آویشن انجام شده است (۶و۵). در یک مطالعه در سال ۲۰۲۰ گزارش شده است که اسانس آویشن شیرازی به صورت وابسته به زمان و دوز از طریق افزایش ROS داخل سلولی باعث مهار تکثیر سلولی و همچنین آپوپتوز در رده سلولی سرطان کولون می شود (۷). رزماری (*Rosmarinus offcinalis L*) نیز عضو دیگری از خانواده نعناعیان است. مطالعات نشان می دهند که رزماری دارای خواص آنتی اکسیدانی بوده که مربوط به دو دی ترپن فنولی کارنوسیک اسید (Carnosic acid) و کارنوزول (Carnosol) موجود در ترکیبات این گیاه می باشد (۸). در یک مطالعه ای در سال ۲۰۱۶ نشان داده شده است که عصاره رزماری در سلول های سرطان ریه از طریق سرکوب مسیر Akt/mTOR/p70S6K سبب مهار تکثیر، سرکوب بقاء و افزایش مرگ سلولی برنامه ریزی شده، می گردد (۹). در سال ۲۰۱۷ در مطالعه ای گزارش شد که عصاره رزماری از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول های سرطان کبد می تواند سبب مهار تکثیر و کاهش بقا گردد (۱۰).

اسانس ها ترکیبات ناپایدار، فرار و دارای ماهیت هیدروفوبی هستند که حلالیت آنها در آب پایین است، که منجر به کاهش فراهمی زیستی (Bioavailability) و افزایش پاکسازی آنها در بدن می شود و در نتیجه سبب افزایش دوز مصرفی و تجویز مکرر و نهایتاً محدودیت استفاده از آنها در درمان می گردد. سیستم های دارو رسانی نوین رویکردی جدید به منظور رفع این محدودیت ها ارائه می کنند (۱۱). اخیراً روش های جدیدی معرفی شده است تا پایداری و زیست دسترسی داروها را افزایش دهند که از جمله آنها محصور کردن (Encapsulation) در لیپوزوم است. لیپوزوم ها ذرات کروی با یک یا چند غشای دولایه ای هستند که از تجمع مولکول های چربی یا فسفولیپید و با صرف انرژی در محیط آبی تشکیل می شوند (۱۲). بارگیری و محصور سازی انواع داروها درون لیپوزوم ها اثر قابل توجهی در بهبود اثر دارویی و توزیع بافتی آنها دارد (۱۳). از آنجاییکه اثرات ضد سرطانی دو اسانس رزماری و آویشن شیرازی به اثبات رسیده و همچنین محصور سازی اسانس ها در مطالعات قبلی تائید گردیده است (۱۵و۱۴)، لذا در تحقیق حاضر اثرات ضد سرطانی نانولیپوزوم های حاوی اسانس رزماری و آویشن بر روی رده سلول HepG2 در محیط invitro مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

تهیه اسانس و نانولیپوزوم های حاوی اسانس آویشن و رزماری: در این مطالعه بنیادی- کاربردی که با کد اخلاق IR.KAUMS.MEDNT.REC.1398.017 در دانشگاه علوم پزشکی کاشان به تصویب رسیده است، اسانس رزماری و آویشن به صورت آماده از شرکت باریج اسانس تهیه گردید. همچنین نانولیپوزوم های مورد استفاده در مطالعات قبلی در دانشگاه علوم پزشکی کاشان بهینه شده اند (۱۵و۱۴).

بررسی میزان زنده بودن سلول های رده HepG2 با استفاده از روش MTT: پس از کشت رده سلولی HepG2 در چاهک های پلیت ۹۶ خانه و پس از رسیدن به تراکم ۸۰٪ محیط رویی سلول ها برداشته شد و تیمار سلول ها توسط دوزهای مختلف از نانولیپوزوم حاوی رزماری و آویشن انجام گرفت. سپس پلیت های مربوطه به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. گروه های مور مطالعه شامل: گروه کنترل، گروه دریافت کننده نانولیپوزوم آویشن برابر ۷۹/۷۲ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۴۸ ساعت، و گروه دریافت نانولیپوزوم رزماری برابر ۵۳/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۴۸ ساعت بود. بعد از گذشت زمان مورد نظر سلول ها ابتدا با PBS شستشو داده شد و سپس به هر چاهک محلول MTT (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS) اضافه شده و به مدت ۳ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. در این مدت محلول MTT با استفاده از آنزیم سوکسینات دهیدروژناز احیا شده و رنگ آبی فورمازان ایجاد می شود که تعداد سلول زنده در هر چاهک با میزان تولید رنگ رابطه مستقیم دارند. سپس محلول رویی را خارج کرده و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید. در نهایت میزان رنگ در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شده و میزان IC50 محاسبه گردید (۱۶).

بررسی آپوپتوز و نکروز در رده سلولی HepG2 با استفاده از روش فلوسایتومتری: جهت تعیین تعداد سلول های آپوپتوز و نکروز شده، رنگ آمیزی سلول ها با دو رنگ Annexin- FITC و پروپیدیوم یدید (PI) طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار دستگاه و در پی تقسیم بندی منحنی دو بعدی FITC-Annexin علیه PI به چهار ناحیه Q1 تا Q4 صورت گرفت (ناحیه Q1 سلول های نکروزی (annexin V-/PI+)، ناحیه Q2 سلول های در مراحل نهایی آپوپتوز (annexin V/PI+)، ناحیه Q3 سلول های آپوپتوزی (annexin V+/PI-) و ناحیه Q4 سلول های سالم و ویژگی (annexin V/PI-). برای آماده سازی سلول ها بعد از تیمار کردن، با توجه به میزان IC50 برای هر

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.19.5]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.141]

نانولیپوزوم پس از گذشت ۴۸ ساعت برای آویشن و ۷۲ ساعت برای رزماری، محیط رویی چاهک ها تخلیه شده به هرکدام از چاهک ها ۴۰۰ µl تریپسین اضافه کرده و پس از ۵ دقیقه انکوباسیون ۱ میلی لیتر محیط کشت حاوی DMEM اضافه شد تا اثر پروتئازی متوقف شود و سوسپانسیون سلولی ایجاد گردد. سلول ها به لوله های مخصوص فلوسایتومتری انتقال داده شدند و سپس ۵ دقیقه سانتریفیوژ با نیروی ۴۰۰g انجام گرفت. محیط رویی را خالی کرده و سلول ها دو بار با PBS شستشو داده شد. سپس مقدار ۲ میکرولیتر Annexin- FITC و ۲ میکرولیتر PI به ۵۰ میکرولیتر بافر اتصال اضافه شده و با آب مقطر دیونیزه به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. به هرکدام از لوله ها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فوق حاوی رنگ های مورد نظر اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و دور از نور، سانتریفوژ انجام گرفت. محلول حاوی رنگ از روی سلول ها برداشته شد و به هر کدام از لوله ها ۵۰۰ میکرولیتر PBS اضافه شد. برای بررسی تعداد سلول های واکنش داده با Annexin- FITC و PI با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر BectonDikenson مدل BD FacsCalibur و تحت تأثیر تابش ۴۸۸ nm، پرتوهای ساطع شده در طول موج های ۵۳۰ nm و ۶۰۰ nm خوانده شدند (۱۷).

بررسی چرخه سلولی در رده سلولی HepG2 با استفاده از روش فلوسایتومتری: رنگ های متصل شونده به DNA استوکیومتریک هستند و اتصال آنها در سلول به میزان DNA بستگی دارد. سلول هایی که در فاز S هستند DNA بیشتری نسبت به سلول های G1 دارند و به نسبت رنگ بیشتری را جذب میکنند و با دو برابر شدن محتوای DNA شدت رنگ فلورسنت بیشتر می شود. به همین میزان شدت رنگ سلول های DNA در فاز G2 دو برابر فاز G1 می باشد. برای اندازه گیری محتوای DNAدر سلول های یک جمعیت سلولی، به منظور مقایسه نحوه توزیع سلول ها در فازهای مختلف چرخه سلولی در نمونه های تیمار شده با دارو و نمونه کنترل منفی، از نشانگر DAPI استفاده شد. بعد از تیمار کردن سلول ها، تعداد 5×10^5 سلول در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی با محلول DAPI در بافر PBS با غلظت ۱۰ µg/ml حاوی TritonX-100 ۶٪ انکوبه گردید. سپس نشر فلوئورسانس نشانگر پس از برانگیختگی در طول موج 359 nm ثبت گردید. ثبت فوتون های نشری در طول موج 461 nm و تجزیه و تحلیل داده ها به روی منحنی دو بعدی تعداد سلول ها با استفاده از نرم افزار FlowJo انجام شد (۱۸).

پردازش داده های فلوسایتومتری با استفاده از نرم افزار FlowJo انجام و تجزیه و تحلیل آماری داده ها با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و به دنبال آن آزمون Tukey با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد و $p\leq0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

بررسی اثر نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن بر روی درصد زنده ماندن سلول ها: درصد زنده ماندن سلول های HepG2 در معرض غلظت های مختلف به صورت وابسته به دوز از نانولیپوزوم های حاوی اسانس آویشن و رزماری در مقابل گروه کنترل سنجیده شد. با استفاده از نمودار مربوطه، غلظت مؤثر دارو برای کاهش ۵۰ درصدی رشد و تکثیر سلول میزان IC50 در زمان های ۴۸ ساعت برای نانولیپوزوم آویشن برابر ۷۹/۷۲ میکروگرم بر میلی لیتر، و ۷۲ ساعت برای نانولیپوزوم رزماری برابر ۵۳/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود (نمودار ۱) و در تمامی آزمایشات بعدی در این مطالعه از این دوز ها استفاده شد.

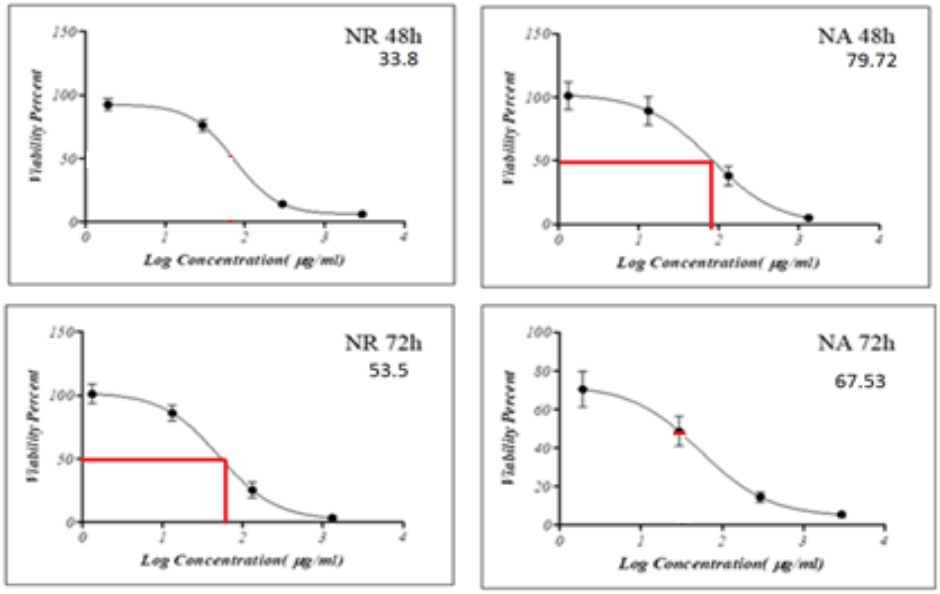
بررسی اثر نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن و رزماری بر روی سیکل سلولی: نتایج حاصل از تست بررسی سیکل سلولی نشان داد که سلول های تحت تیمار بیشتر در فاز G2 تجمع یافته اند که نشان دهنده اثرات بازدارندگی رشد سلول های سرطانی توسط نانولیپوزوم های حاوی رزماری و آویشن می باشد (نمودار ۲).

با مقایسه نتایج سیکل سلولی مشخص شد که تجمع سلول ها در فاز G1 در گروه کنترل با اختلاف معنی داری بیشتر از گروه های نانولیپوزوم رزماری و آویشن می باشد. ولی در فاز G2، تجمع سلول ها در گروه های نانولیپوزوم حاوی رزماری و آویشن به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل می باشد (نمودار ۳). همچنین تفاوت معنی داری در فاز S مشاهده نشد.

بررسی وضعیت زنده ماندن سلول ها در مجاورت نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن و رزماری با استفاده از روش فلوسایتومتری: نتایج آزمایش فلوسایتومتری بر روی نمونه کنترل نشان دادکه ۹۴/۷٪ از سلول ها زنده می باشند و فقط ۴/۴۰٪ از سلول ها دچار آپوپتوز شده اند (شکل ۱). همچنین سلول هایی که در مجاورت نانولیپوزوم های حاوی آویشن قرار گرفته اند، بعد از گذشت زمان ۴۸ ساعت، ۴۶/۶۳٪ زنده بودند و ۳۷/۳٪ از سلول ها دچار آپوپتوز شدند (شکل ۲). نتایج نشان داد که در سلول هایی که در مجاورت با نانولیپوزوم رزماری قرار گرفته اند، بعد از گذشت زمان ۷۲ ساعت به طور میانگین ۶۳/۰۳٪ زنده بوده اند و ۳۲/۱٪ از سلول ها دچار آپوپتوز شده اند (شکل ۳).

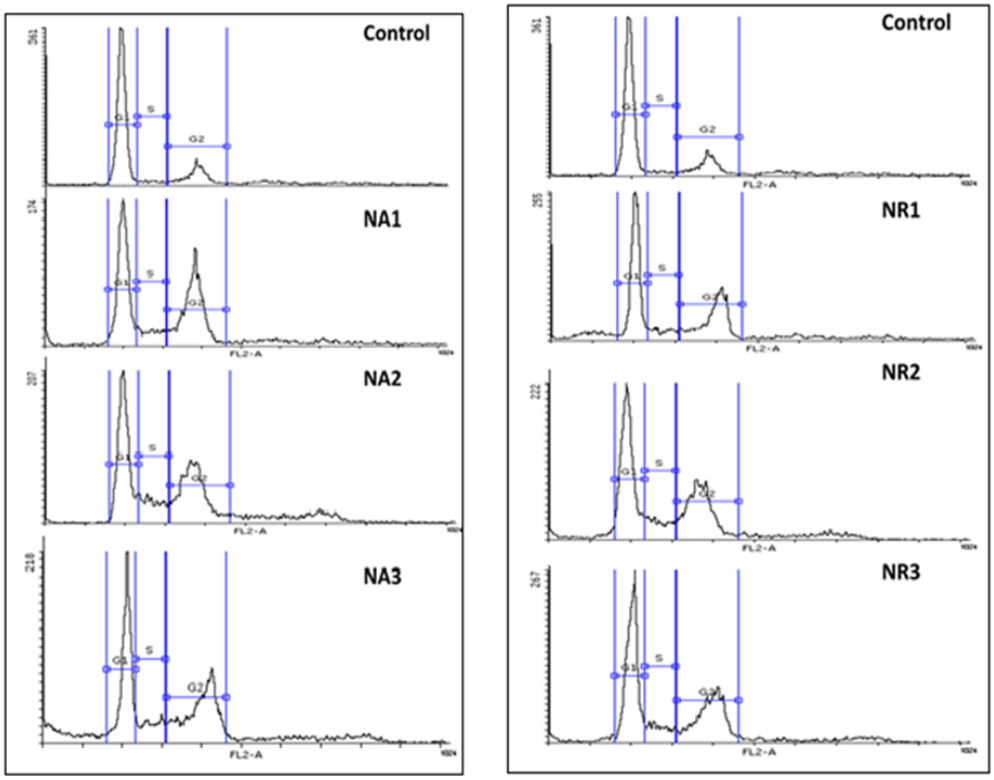
تنها میزان آپوپتوز در گروه های دریافت کننده دارو های مورد بررسی با اختلاف معنی داری بیشتر از گروه کنترل می باشد ($p=0/001$). همچنین اختلاف معنی داری در مراحل انتهایی آپوپتوز و نکروز مابین گروه های مورد مطالعه مشاهده نشد (نمودار ۴).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.19.5]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.141]



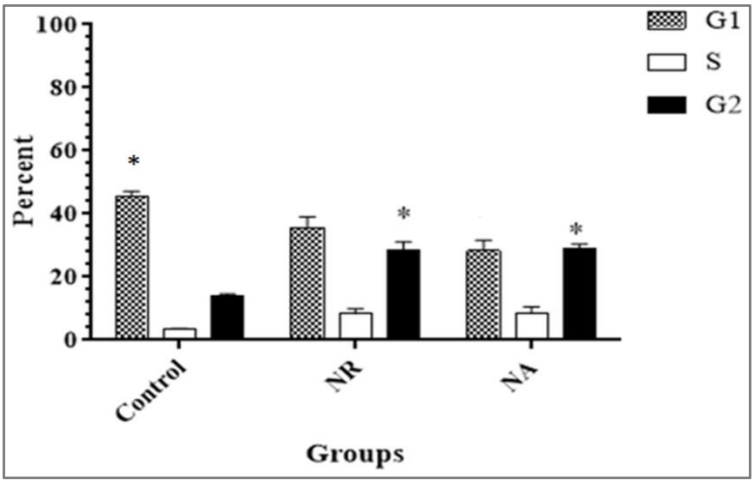
نمودار ۱. نمودار IC50 نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن و رزماری بر روی رده سلولی HepG2 بعد از ٤٨ و ٧٢ ساعت. اثر بازدارندگی نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن و رزماری بر روی توان زیستی سلول ها به صورت تابعی از غلظت و زمان (۳ بار تکرار).

NA= نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن، NR= نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری.

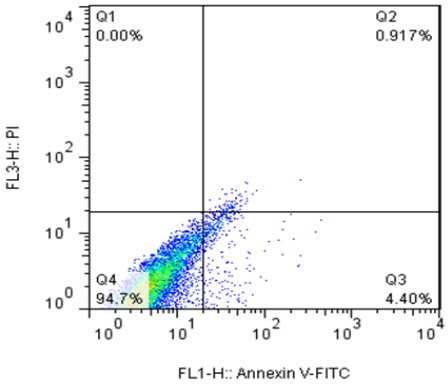


نمودار ۲. چرخه سلولی HepG2 در اثر مجاورت با نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن بعد از ٤٨ ساعت و نانولیپوزوم رزماری بعد از ٧٢ ساعت (۳ بار تکرار). NA= نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن، NR= نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری.

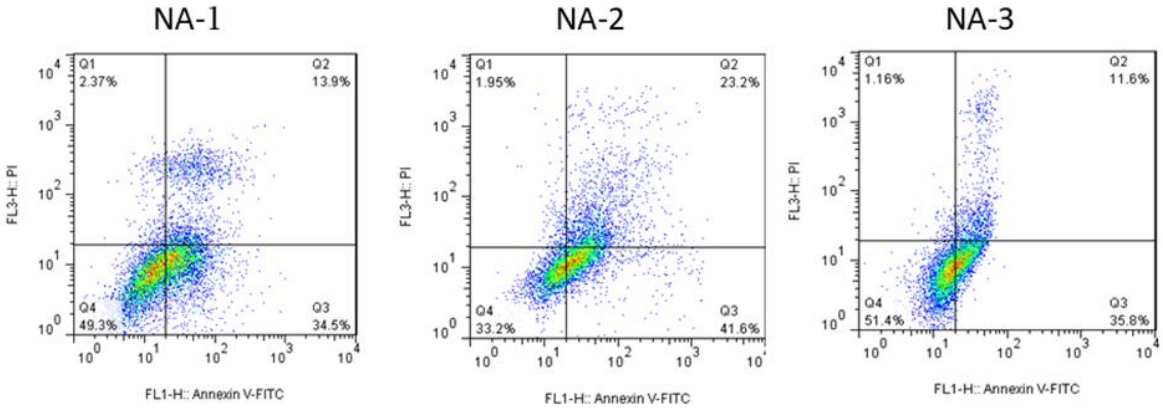
[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.19.5]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.141]



نمودار ۳. مقایسه چرخه سلولی HepG2 در اثر نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن و رزماری در مقایسه با گروه کنترل. NA= نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن، NR= نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری. *p<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار مابین گروه کنترل و گروه های تیمار شده با نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن و رزماری.

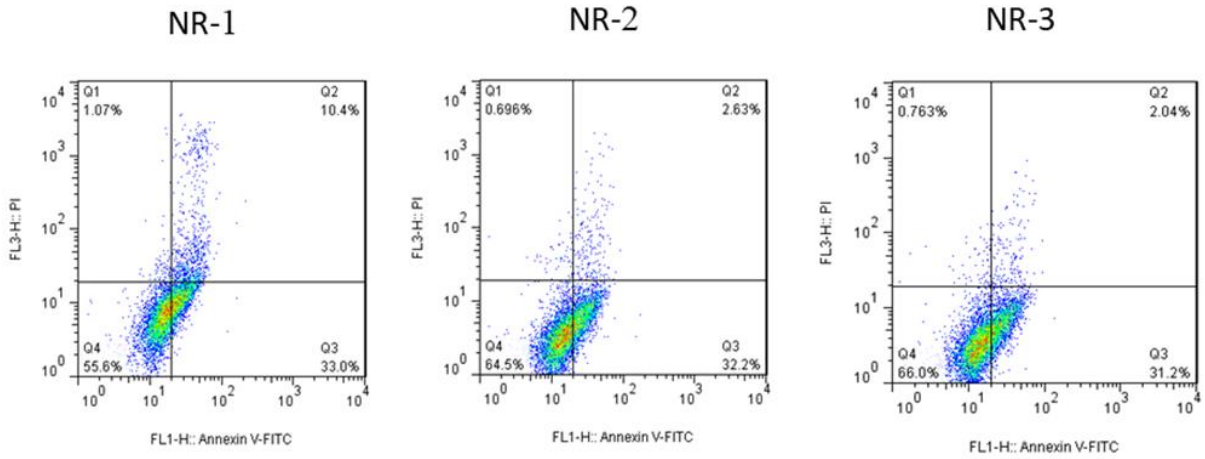


شکل ۱. بررسی وضعیت زنده ماندن سلول های گروه کنترل با استفاده از روش فلوسایتومتری (۳ بار تکرار). NA= نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن، NR= نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری.

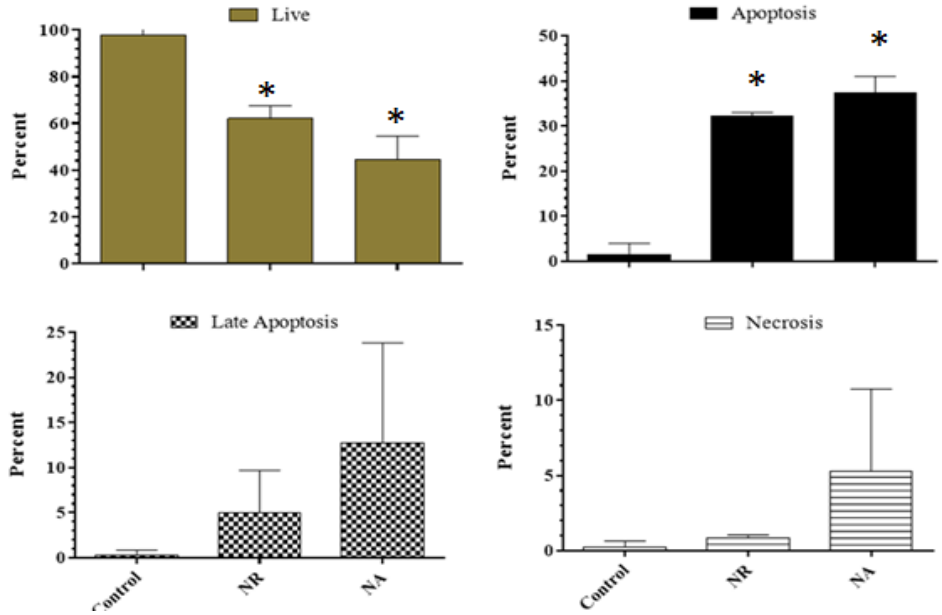


شکل ۲. بررسی وضعیت زنده ماندن سلول ها در مجاورت با نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن بعد از ٤٨ ساعت با استفاده از روش فلوسایتومتری (۳ بار تکرار). NA= نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن، NR= نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری.

[DOI: 10.22088/jbums.24.1.141] [DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.19.5]



شکل ۳. بررسی وضعیت زنده ماندن سلول ها در مجاورت با نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری بعد از ۷۲ ساعت با استفاده از روش فلوسایتومتری (۳ بار تکرار). NA= نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن، NR= نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری.



نمودار ٤. مقایسه نتایج فلوسایتومتری سلول HepG2 در اثر مجاورت با نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن و رزماری در مقایسه با گروه کنترل (۳ بار تکرار). NA= نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن، NR= نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری. *p<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل.

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اثرات ضد سرطانی نانو لیپوزوم های حاوی اسانس رزماری نسبت به گروه کنترل کاملاً معنی دار بوده است. همچنین نتایج فلوسایتومتری در این مطالعه القای آپوپتوز در سلول های HepG2 توسط نانولیپوزوم های گیاه رزماری را تائید کرد. در بررسی های آزمایشگاهی مختلف، اثرات ضد سرطانی عصاره رزماری روی رده های مختلف سلول های سرطانی کولون، پانکراس، پستان، پروستات، ریه، مثانه، کبد و لوسمی بیان شده است و اثرات ضد سرطانی آن را به صورت کاهش تکثیر و بقا سلولی و القای آپوپتوز به صورت وابسته به دوز و زمان نشان داده اند (۱۹). در مطالعه Shabani

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.19.5]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.141]

و همکارانش نتایج نشان داد که عصاره گیاه رزماری توانایی مهار رشد سلول های سرطانی غدد پستانی سگ را داشته و در دوز ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر و در ۴۸ ساعت پس از درمان بیشترین اثربخشی را داشته است. همچنین نتایج نشان دهنده بیان میزان بالای ژن BAX بعنوان یک ژن پیشبرنده آپوپتوز در همین دوز دارویی و بازه زمانی بوده است (۲۰). در یک مطالعه نتایج نشان داد که تجویز خوراکی عصاره رزماری، سبب کاهش اندازه تومور کولون در موش های سوری از طریق افزایش بیان ژن GCNT3 و همچنین تغییرات اپی ژنتیک و کاهش بیان ژن کد کننده miR-15b شده است (۲۱). همچنین تجویز عصاره حل شده در روغن به مدت ۴ هفته از طریق افزایش بیان ژن Nrf2 تشکیل تومور زنوگرافت HCT116 را در موش های صحرایی مهار کرد (۲۲). مسیر سیگنال دهی Nrf2/ARE در محافظت از سلول ها در برابر سرطان زایی مورد توجه است و ایجاد سرطان را از طریق خنثی کردن گونه های واکنش پذیر اکسیژن و عوامل سرطان زا کاهش می دهد و عصاره رزماری بیان پروتئین های این مسیر مانند سسترین ۲ و نیز اکسیژناز ۱ را در سلول های سرطانی کولون افزایش می دهد (۲۳). آنالیز بیوشیمیایی سرم در موش های نژاد اسپراگ داولی تیمار شده با عصاره رزماری نشان داد که عصاره با تغییر سیگنالینگ ژن و پروتئین β-catenin, K-ras و c-myc اثر ضد سرطانی قابل توجه داشته است (۲۴). همچنین عصاره رزماری در رده سلول سرطانی لوسمی، بیان mRNA و پروتئین AKT۱ را مهار نموده است. این پروتئین در مسیر سیگنالینگ PI3K/AKt سبب افزایش بقای این رده سلولی می شود. توقف چرخه سلولی مانع از تکثیر بیشتر سلول می شود و عصاره رزماری می تواند چرخه سلولی را در تعدادی از سلول های سرطانی متوقف کند و ژن شماره ۲ وابسته به رتینوبلاستوما که ورود به چرخه سلولی را تنظیم می کند، افزایش می دهد (۲۵). عصاره رزماری باعث افزایش تولید نیتریک اکسید و فاکتور نکروز دهنده توموری در سلول های سرطانی پانکراس و کبد می شود که نشان دهنده افزایش مرگ سلولی و آپوپتوز وابسته به نیتریک اکساید است (۲۷و۲۶).

همچنین نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده است که اسانس و نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن دارای اثرات سیتوتوکسیک بر روی رده سلول سرطانی HepG2 می باشند. علاوه بر این نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان داده است که نانولیپوزوم حاوی اسانس آویشن موجب القای آپوپتوز در سلول های HepG2 شده است که با نتایج حاصل از مطالعات قبلی کاملاً همسو می باشد. بر اساس نتایج یک پژوهش و بررسی کاهش توانایی زیستی سلول های سرطانی تیمار شده با اسانس آویشن مشخص شد که این اسانس در شرایط invitro مانع از رشد سلول های سرطانی سنگفرشی حاصل از تومور سر و گردن در انسان می شود (۲۸). در پژوهشی که توسط Kim و همکارانش انجام شده، رد پای آنزیم های سیکلواکسیژناز و استرس اکسیداتیو در جریان دگرگونی‌های رشد و تمایز سلول، از جمله سرطان به تأئید رسیده و مشخص شده که در عصاره هیدروالکلی گیاه آویشن ترکیباتی وجود دارند که آنزیم های مذکور را مهار کرده و موجب کاهش استرس اکسیداتیو می شوند (۲۹). همچنین Liang و همکارانش دریافتند که فلاونوئیدهای موجود در آویشن، PPARγ را فعال کرده و به موجب آن بیان COX-۲ را مهار می نمایند (۳۰).

یکی از ویژگی های این مطالعه و نقطه اختلاف با اکثر مطالعات انجام شده، استفاده از نانولیپوزوم در این مطالعه بوده است. با توجه به نتایج حاصل از مطالعه اخیر، اثرات سایتوتوکسیک رزماری و آویشن در فرم نانولیپوزوم با اختلاف معنی داری بیشتر از اسانس گیاهان مذکور بوده است. نتایج حاصل از این تحقیق اثر سیتوتوکسیک نانولیپوزوم های حاوی اسانس رزماری و آویشن بر روی سلول سرطانی HepG2 را اثبات کرد. نانولیپوزوم رزماری و آویشن موجب القای آپوپتوز در رده سلول سرطانی HepG2 شده، همچنین سلول های سرطانی در مجاورت با نانولیپوزوم رزماری و آویشن در مرحله G2 از چرخه سلولی توقف می کنند و این نشان دهنده نقش دارو در ممانعت از تکثیر سلول می باشد. هم راستا با نتایج حاصل از مطالعه حاضر، در یک مطالعه در سال ۲۰۲۱ گزارش شد که تیمار سلول های MCF-7 و Hella توسط داروی میتومایسین پوشش داده شده با نانوامولسیون رزماری، حتی در دوزهای کم داروی میتومایسین سبب القا آپوپتوز در سلول های سرطانی کشت داده شده، می گردد (۳۱).

با توجه به نتایج حاصل از مطالعه اخیر و سایر مطالعات صورت گرفته در این زمینه، پیشنهاد می شود که از گیاهان دارویی و به خصوص فرم نانو این ترکیبات به عنوان یک راهکار کمک درمانی مناسب جهت درمان سرطان استفاده شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری دانشکده علوم پزشکی کاشان جهت تامین بودجه پژوهش و دانشکده داروسازی دانشگاه آزاد واحد تهران به دلیل انجام آزمایش های مربوطه، قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.19.5]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.141]

References

1.Thapa RK, Muhammad Khan G, Parajuli-Baral K, Thapa P. Herbal medicine incorporated nanoparticles: advancements in herbal treatment. Asian J Biomed Pharm Sci. 2013;3(24):7-14.

2.Ali MS, Saleem M, Ali Z, Ahmad VU. Chemistry of Zataria multiflora (Lamiaceae). Phytochemistry. 2000;55(8):933-6.

3.Shafiee A, Javidnia K. Composition of essential oil of Zataria multiflora. Planta Med. 1997;63(4):371-2.

4.Ebrahimzadeh H, Yamini Y, Sefidkon F, Chaloosi M, Pourmortazavi SM. Chemical composition of the essential oil and supercritical CO2 extracts of Zataria multiflora Boiss. Food Chem. 2003;83(3):357-61.

5.Shokrzadeh M, Azadbakht M, Ahangar N, Naderi H, Saeedi Saravi SS. Comparison of the cytotoxic effects of Juniperus sabina and Zataria multiflora extracts with Taxus baccata extract and Cisplatin on normal and cancer cell lines. Pharmacogn Mag. 2010;6(22):102-5.

6.Dadkhah A, Fatemi F, mohammadi Malayeri MR, Rasooli A. Cancer chemopreventive effect of dietary Zataria multiflora essential oils. Turk J Biol. 2014;38(6):930-9.

7.Ahani N, Sangtarash MH, Alipour Eskandani M, Houshmand M. Zataria multiflora Boiss. Essential Oil Induce Apoptosis in Two Human Colon Cancer Cell Lines (HCT116 & SW48). Iran J Public Health. 2020;49(4):753-62.

8.Frankel EN, Huang S-W, Aeschbach R, Prior E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. J Agric Food Chem. 1996;44(1):131-5.

9.Moore J, Megaly M, MacNeil AJ, Klentrou P, Tsiani E. Rosemary extract reduces Akt/mTOR/p70S6K activation and inhibits proliferation and survival of A549 human lung cancer cells. Biomed Pharmacother. 2016;83:725-32.

10.Tong X-P, Ma Y-X, Quan D-N, Zhang L, Yan M, Fan X-R. Rosemary extracts upregulate Nrf2, Sestrin2, and MRP2 protein level in human hepatoma HepG2 cells. Evid Based Complement Alternat Med. 2017;2017:7359806.

11.Liolios CC, Gortzi O, Lalas S, Tsaknis J, Chinou I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of Origanum dictamnus L. and in vitro antimicrobial activity. Food Chem. 2009;112(1):77-83.

12.Mozafari MR, Johnson C, Hatziantoniou S, Demetzos C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. J Liposome Res. 2008;18(4):309-27.

13.Alexis F, Basto P, Levy-Nissenbaum E, Radovic-Moreno AF, Zhang L, Pridgen E, et, al. HER-2-Targeted Nanoparticle-Affibody Bioconjugates for Cancer Therapy. ChemMedChem. 2008;3(12):1839-43.

14.Arabi MH, Chabok H, Mirzapour A, Shafiee Ardestani M, Saffari M. Preparation of Nanoliposomes Containing Rosmarinus Officinalis L Essential Oil: a Comparative Study. Biosci Biotech Res Comm. 2017;10(1):103-8.

15.Arabi MH, Mirzapour A, Chabok H, Shafiee Ardestani M, Saffari M. Preparation methods of nanoliposomes containing Zataria multiflora essential oil: A comparative study. Biosci Biotech Res Comm. 2017;10(1):151-60.

16.Ilbeigi D, Nourbakhsh M, Khaghani S, Einollahi N, Kheiripour N, Gholinejad Z, et al. Enterolactone Reduces Telomerase Activity and The Level of Its Catalytic Subunit in Breast Cancer Cells. Cell J. 2017;19(Suppl 1):37-43.

17.Gholinejad Z, kheiripour N, Nourbakhsh M, Ilbeigi D, Behroozfar K, Hesari Z, et al. Extracellular NAMPT/Visfatin induces proliferation through ERK1/2 and AKT and inhibits apoptosis in breast cancer cells. Peptides. 2017;92:9-15.

18.Bahmani F, Esmaeili S, Bashash D, Gharehbaghian A. Cytotoxicity of Three Species of Centaurea Genus on Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line (Nalm-6). J Med Plants. 2018;17(66):156-66. [In Persian]

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.19.5]

[DOI: 10.22088/jbums.24.1.141]

19.Mohammadi T, Hoveizi E. Comparison of Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) hydroalcoholic extract on the viability of head and neck cancer cells Line HN5 and neuronal progenitor cells of Mouse. J Dev Biol. 2017;9(3):13-22. [In Persian]

20.Shabani S, Mortazavi P. Study of Rosemary Extract on Bcl2 and Bax Gene Expression in Canine Mammary Gland Carcinoma Cell Line (Cf41.Mg). J Comparat Pathobiol. 2017;14(1):2105-12. [In Persian]

21.González-Vallinas M, Molina S, Vicente G, Zarza V, Martín-Hernández R, García-Risco MR, et al. Expression of microRNA-15b and the glycosyltransferase GCNT3 correlates with antitumor efficacy of Rosemary diterpenes in colon and pancreatic cancer. PLoS One. 2014;9(6):e98556.

22.Yan M, Li G, Petiwala SM, Householter E, Johnson JJ. Standardized rosemary (Rosmarinus officinalis) extract induces Nrf2/sestrin-2 pathway in colon cancer cells. J Funct Foods. 2015;13:137-47.

23.Ahmad HH, Hamza A, Hassan AZ, Sayed AH. Promising therapeutic role of Rosmarinus officinalis successive methanolic fraction against colorectal cancer. Int J Pharm Pharm Sci. 2013;5(4):164-70.

24.Moore J, Yousef M, Tsiani E. Anticancer Effects of Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) Extract and Rosemary Extract Polyphenols. Nutrients. 2016;8(11):731.

25.Kontogianni VG, Tomic G, Nikolic I, Nerantzaki AA, Sayyad N, Stosic-Grujicic S, et al. Phytochemical profile of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. Food Chem. 2013;136(1):120-9.

26.Peng C-H, Su J-D, Chyau C-C, Sung T-Y, Ho SS, Peng C-C, et al. Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects. Biosci Biotechnol Biochem. 2007;71(9):2223-32.

27.Craig WJ. Health-promoting properties of common herbs. Am J Clin Nutr. 1999;70(3 Suppl):491S-9S.

28.Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J. 1998;12(12):1063-73.

29.Kim H-J, Chung J-I, Lee SH, Jung Y-S, Moon C-H, Baik EJ. Involvement of endogenous prostaglandin F2alpha on kainic acid-induced seizure activity through FP receptor: the mechanism of proconvulsant effects of COX-2 inhibitors. Brain Res. 2008;1193:153-61.

30.Liang YC, Tsai SH, Tsai DC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by flavonoids in mouse macrophages. FEBS Lett. 2001;496(1):12-8.

31.Al-otaibi W. Rosemary oil nano-emulsion potentiates the apoptotic effect of mitomycin C on cancer cells in vitro. Pharmacia. 2021;68(1):201-9.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.19.5]

[DOI: 10.22088/jbums.24.1.141]