

بارگذاری عصاره دود گیاه اسپند توسط نانوذرات کیتوسان و بررسی سمیت و القاء آپوپتوز آن بر روی سلول‌های سرطانی رده A2780

ملیحه منفرد^۱، علی نعمتی^{۲*}، مسعود همایونی تیریزی^۳

تاریخ دریافت ۱۴۰۱/۰۶/۰۳ تاریخ پذیرش ۱۴۰۱/۰۹/۰۴

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: نانو ذرات به دلیل توانایی ایجاد سمیت و القاء آپوپتوز و خواص آنتی‌باکتریایی، بر روی سلول‌های سرطانی و نیز درمان بیماری‌ها مؤثر هستند. دانه‌های گیاه اسپند غنی از کربوهیدرات، لیپید، پروتئین، املاح معدنی، الکتروئید و اسیدهای آمینه است. از جمله آلکالوئیدهای مهم آن می‌توان به هارمالین، هارمین، هارمالول و وازیسین اشاره کرد که در صنعت و پزشکی کاربردهای فراوانی دارند. هدف این تحقیق بررسی اثرات دود گیاه اسپند بارگذاری شده توسط نانو کیتوسان بر روی سمیت سلولی، القاء آپوپتوز و نیز اثرات آنتی‌باکتریایی آن است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی که به صورت *in vitro* انجام شده است. جهت بررسی اثر سمیت نانوذرات کیتوسان بارگذاری شده با دود گیاه اسپند بر روی رده سلولی سرطان تخمدان A2780 و سلول نرمال فیبروبلاست HFF از آزمون MTT استفاده شد. همچنین جهت بررسی القاء آپوپتوز از روش تعیین بیان ژن کاسپاز ۳ و نیز جهت بررسی خاصیت آنتی‌باکتریایی از روش دیسک دیفیوژن بر روی باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتوس* و باکتری‌های گرم منفی *شرشیا کلی* و *سودوموناس آئروزیینوزا* استفاده شد. آنالیز آماری توسط نرم‌افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام شد. $P < 0.05$ به‌عنوان معیار معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتیجه آزمون MTT، مقدار IC50 را برای سلول سرطان تخمدان در ۴۸ ساعت بعد از تیمار برابر ۱۷/۱۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد. درحالی‌که در غلظت مشابه برای رده سلولی نرمال میزان زنده‌مانی ۹۸ درصد بود. همچنین القاء آپوپتوز سلول‌های سرطانی A2780 بر اساس افزایش معنی‌داری در بیان ژن کاسپاز ۳ مشاهده شد. علاوه بر آن، این نانو ذرات دارای اثر مهاری بر روی رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتوس* بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: نانوذرات کیتوسان بارگذاری شده توسط دود گیاه اسپند دارای فعالیت ضد سرطانی، القاء آپوپتوز و آنتی‌باکتریایی بودند.

کلیدواژه‌ها: آپوپتوز، ضد سرطان، کیتوسان، نانوذره، سرطان تخمدان، گیاه اسپند

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و سوم، شماره پنجم، ص ۳۶۰-۳۵۰، مرداد ۱۴۰۱

آدرس مکاتبه: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران، تلفن: ۹۸۵۱۳۸۴۳۵۰۰۰

Email: neamati.ali@gmail.com

مقدمه

خنثی هستند یا در یک محیط اسیدی بار منفی دارند. این ویژگی به آن اجازه می‌دهد تا با سایر پلیمرهای مصنوعی یا طبیعی دارای بار منفی، مجتمع‌های الکترواستاتیک یا ساختارهای چندلایه را تشکیل دهد. ویژگی‌های جالب‌توجه کیتوسان مانند سازگاری زیستی، غیر سمی بودن، حساسیت‌زایی کم و تجزیه بیولوژیکی امکان استفاده از آن را در کاربردهای مختلف فراهم می‌کند. علاوه بر این گزارش شده است که کیتوسان دارای خواص بیولوژیکی دیگری مانند فعالیت ضد تومور، ضد میکروبی است (۳). درجه

کیتوسان، یک پلی ساکارید خطی است که از داستیلاسیون کیتین حاصل می‌شود. کیتین عنصر ساختاری در اسکلت بیرونی حشرات، سخت‌پوستان، و دیواره سلولی قارچ‌ها و دومین پلی ساکارید طبیعی فراوان بعد از سلولز است (۱). پیچیدگی ساختار کیتین، دشواری در استخراج و عدم حل شدن آن در محلول آبی، تحقیقات روی این پلیمر را تا دهه ۱۹۸۰ محدود کرد (۲). ماهیت کاتیونی کیتوسان نسبتاً خاص است، زیرا اکثر پلی ساکاریدها معمولاً

^۱ کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

^۲ دانشیار فیزیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ دانشیار بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی شدند و رسوب حاصل (نانوذرات تشکیل شده) در دمای اتاق خشک گردید (۸).

کشت سلول و بررسی سمیت سلولی:

رده سلولی سرطانی A2780 و نرمال فیبروبلاست از مرکز تحقیقات بوعلی مشهد تهیه شد. سلول A2780 در محیط کشت کامل ۱۰ درصد (DMEM) (Sigma, France) و سلول های HFF در محیط کشت کامل ۱۰ درصد RPMI (Sigma, France) حاوی ۱۰ میلی لیتر FBS (Gibco, USA) و ۱ میلی لیتر آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین (Sigma, France) درون فلاسک های T25 مخصوص کشت سلولی، کشت داده شدند و در انکوباتور CO2 دار (در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۸۰ درصد، فشار کربن دی اکسید ۵ درصد) نگهداری گردید. به منظور بررسی اثر سمیت نانوذرات کیتوسان از تست MTT (Sigma, France) استفاده شد. در سلول های زنده بلورهای تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی احیاء و کریستال های فورمازان تشکیل می شوند. این کریستال های آبی رنگ تنها در حلال های آبی مثل ایزوپروپانول و DMSO (Merk, Germany) قابل حل شدن هستند که با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب نوری خوانده می شود و درصد سلول های زنده تعیین می گردد (۹). در ابتدا برای هر رده سلولی پلیت های ۹۶ خانه ای تهیه شد و به هر یک از چاهک های پلیت، ۵۰۰۰ سلول اضافه گردید. شمارش سلول ها با استفاده از لام نئوبار و رنگ تریپان به لو انجام شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون و اطمینان از چسبندگی سلول ها به بستر پلیت، محیط تازه با غلظت های مختلف از نانوکیتوسان بارگذاری شده با دود گیاه اسپند (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر) به هر چاهک اضافه شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، به هر یک از چاهک ها محلول MTT اضافه شد. سپس پلیت ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند و بعد از تخلیه رنگ به آن ها ۱۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید. جذب در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ایزاریدر (Stat fax2100, Germany) خوانده شد و درصد زنده ماندن سلول ها در مقایسه با سلول های کنترل که هیچ تیماری روی آن ها صورت نگرفته بود محاسبه گردید. نمودار نتایج حاصل از آزمون MTT ترسیم و با کمک آن IC50 غلظتی از نانو ذره کیتوسان بارگذاری شده توسط دود گیاه اسپند (Peganum harmala) که سبب کشته شدن ۵۰ درصد سلول ها می گردد، برای نانو ذره به دست آمد.

سنجش بیان ژن کاسپاز-۳ دخیل در آپوپتوز با استفاده از

Real time PCR:

کاسپازها از واسطه های مهم مرگ برنامه ریزی شده سلول هستند و میان آن ها کاسپاز-۳ یک پروتئاز است که هنگام وقوع

استیل زدایی که توسط کسری مولی واحدهای استیل یا درصد استیلاسیون توصیف می شود و وزن مولکولی کیتوسان بر این خصوصیات تأثیر می گذارد (۴).

نانوذرات کیتوسان در درمان بیماری ها و سرطان های مختلف از جمله سرطان سینه و تخمدان مورد استفاده قرار گرفته است. سیستم هایی که بر پایه پلیمر کیتوسان بنا شده است در انتقال و رهاسازی پروتئین ها، پپتیدها، فاکتورهای رشد، داروهای ضد درد و التهاب، داروهای ضد سرطان، آنتی بیوتیک ها و همچنین در درمان نارسائی های ژنی مورد استفاده قرار می گیرد (۵).

گیاه اسپند دارای فعالیت ضد سرطانی قابل توجهی است. با در نظر گرفتن مکانیسم انواع داروهای ضد سرطان و شباهت عملکردی آن ها با اسپند، آلکالوئیدهای مشتق شده از این گیاه به ویژه هارمین، می توانند به عنوان یک داروی ضد سرطان جدید معرفی شوند (۶). در این تحقیق نانو کیتوسان بارگذاری شده با دود گیاه اسپند در معرض سلول های سرطان تخمدان A2780 قرار گرفت و باعث مهار رشد سلول های سرطانی و مرگ سلول هدف شد. مرگ سلولی ناشی از آپوپتوز است که توسط دو مسیر ذاتی و خارجی ایجاد شده است (۷). هدف از این مطالعه، سنتز نانوکیتوسان بارگذاری شده با دود گیاه اسپند و بررسی سمیت سلولی، القاء آپوپتوز و بررسی اثرات آنتی میکروبی آن بر روی سرطان تخمدان رده سلولی A2780 در مقایسه با سلول نرمال فیبروبلاست HFF بود.

مواد و روش ها

سنتز نانو کیتوسان بارگذاری شده با دود گیاه اسپند:

ابتدا ۵۰۰ گرم از دانه های خشک اسپند در یک فلاسک تقطیر ۱۰۰۰ میلی لیتری ریخته و سوزانده شد. اکسیژن مورد نیاز برای فرآیند سوزاندن با سرعت یک پاف در هر پنج دقیقه سوزاندن تزریق شد. محصول دود خنک شده و سپس توسط یک لوله کندانسور تقطیر شد. مخلوطی متشکل از ۸۰ میلی لیتر n-Hexan و آب مقطر (۱۲۰ میلی لیتر) به عنوان حلال قطرات دود مورد استفاده قرار گرفت. برای تبخیر حلال و جداسازی دود، عصاره دود اسپند چهار روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد و سپس مورد استفاده قرار گرفت. روش ژلاسیون یونی جهت سنتز نانوذرات استفاده شد. بدین منظور ۲ میلی گرم بر میلی لیتر کیتوسان به ۲۰ میلی لیتر اسید استیک ۱ درصد اضافه شد و ۲۰ میلی گرم از عصاره دود اسپند به محلول اضافه شد. تنظیمات PH انجام شد (۵/۴) و محلول در دور ۴۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴ ساعت بر روی استیرز قرار گرفت. تیمین پیرو فسفات (TPP) با غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر به صورت قطره به مخلوط اضافه شد و به مدت ۱ ساعت هم زده شد. سرانجام نانوذرات تشکیل شده با استفاده از سانتریفیوژ با دور

و روش سایبرگرین بهره گرفته شد. در ابتدا RNA سلول با استفاده از کیت استخراج RNA (کیژن، آمریکا) طبق دستورالعمل استخراج و غلظت آن به وسیله دستگاه نانودراپ (GmbH IMPLLEN، آلمان) اندازه گیری شد. سنتز مولکول‌های cDNA با استفاده از کیت Revert Aid™ First strand cDNA (لایتوانی، Synthesis) صورت گرفت. ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی مورداستفاده قرار گرفت. پس از آن که چرخه‌های تکثیر به پایان رسید، برای حصول اطمینان از عدم وجود فرآورده‌های غیر اختصاصی، منحنی ذوب ترسیم شد. به‌منظور سنجش تغییرات نسبی بیان ژن‌ها، از روش $\Delta\Delta Ct$ استفاده گردید و همگی واکنش‌ها به طور دوتایی تکرار شد.

آپوپتوز فعال می‌شود و تکه تکه کردن بسیاری از پروتئین‌های کلیدی سلول را کاتالیز می‌کند. جهت سنجش میزان بیان ژن و آماده سازی سلول‌ها برای استخراج RNA، ابتدا کشت رده سلولی A2780 صورت پذیرفت. پس از آن، با غلظت‌های (۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر) از نانوکیتوسان بارگذاری شده با دود گیاه اسپند به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. پس از آن، جداسازی سلول‌ها از کف فلاسک شد. بعد از انجام سانتریفیوژ، استخراج RNA و سنتز cDNA انجام و جهت ارزیابی تغییرات بیان ژن، Real time PCR انجام شد.

سنتز cDNA و اندازه گیری بیان ژن کاسپاز ۳:

برای تعیین کمی میزان بیان ژن کاسپاز ۳ از دستگاه BioRad

جدول (۱): توالی پرایمرهای ژن‌های کاسپاز ۳ و ژن GAPDH

ژن	توالی پرایمر
کاسپاز ۳	Forward 5' ATGGGAGCAAGTCAGTGGAC 3'
	Revers 3' CGTACCAGAGCGAGATGACA 5'
GAPDH	Forward 5' CGTCTGCCCTATCAACTTTCG 3'
	Revers 3' CGTTTCTCAGGCTCCCTCT 5'

MBC و MIC:

به‌منظور تعیین MIC و MBC از روش میکروبراث دایلووشن استفاده شد. در این روش از میکروپلیت ۲۴ چاهکی استفاده شد. عصاره‌ها با غلظت‌های 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1 (ماده با آب مقطر رقیق شد و غلظت‌های مختلف را تهیه کردیم) تهیه شدند. از پودر آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان کنترل استفاده شد. پس از تلقیح باکتری‌ها در چاهک‌ها، میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C در انکوباتور قرار گرفت. پس از انکوباسیون، اولین چاهکی که در آن رشدی مشاهده نشد به‌عنوان حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) در نظر گرفته شد. از این رقت و رقت‌های بالاتر، ۱۰ ماکرولیترو روی محیط کشت نوترینت آگار برده شد، رقتی که در آن رشدی مشاهده نشد به‌عنوان حداقل غلظت کشنده رشد (MBC) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از سنتز و بررسی نانو کیتوسان:

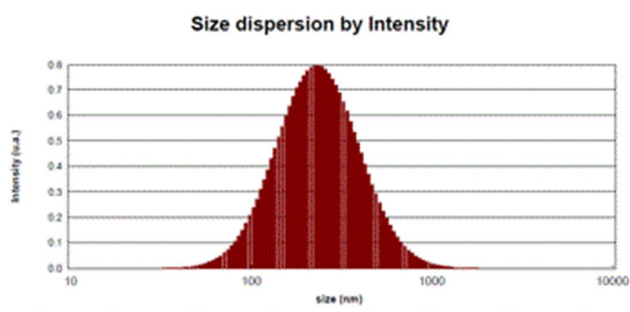
بر اساس نمودار ۱، موفقولوژی نانو ذرات کیتوسان به‌صورت یکنواخت و با پراکندگی خوبی مشاهده می‌شود. اندازه نانو ۱۵/۷۸ است (PDI=0.2).

جهت بررسی بیان ژن آپوپتوزی کاسپاز ۳- و ارزیابی اختلاف معناداری در یافته‌ها، از نرم‌افزار SPSS استفاده و نمودارها توسط Excel رسم شد. سطح اطمینان ۰/۰۵ برای محاسبات در نظر گرفته شد.

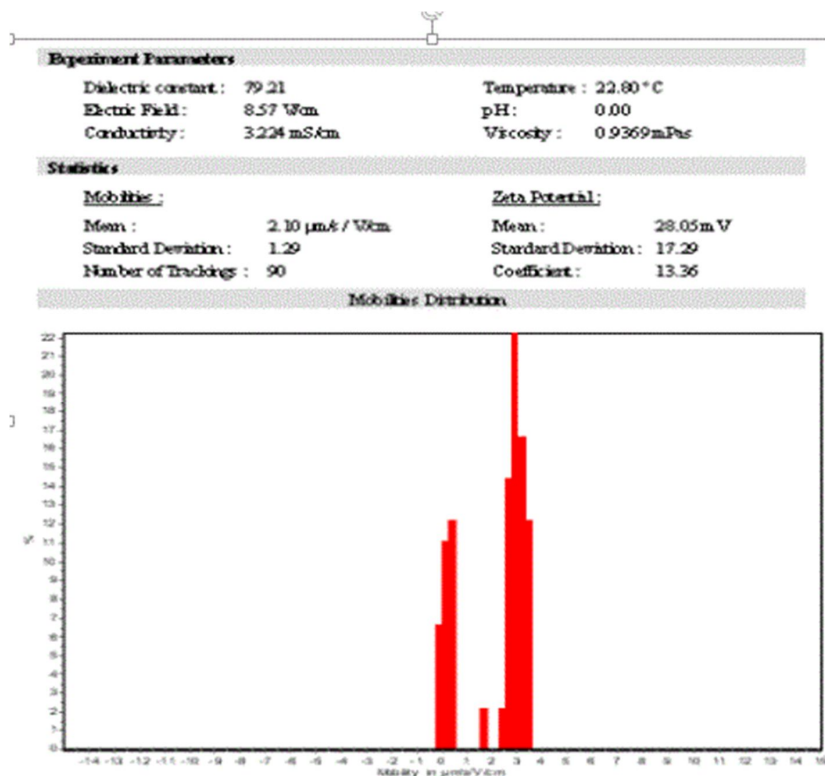
فعالیت ضد میکروبی نانوکیتوسان بارگذاری شده با دود گیاه اسپند:

در این راستا از باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 23592) و میکروکوکوس لوتئوس (ATCC 14408) و باکتری‌های گرم منفی اشریشیا کلی (ATCC 1330) و سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 1407) استفاده شد. جهت تهیه دیسک آنتی‌بیوتیکی از دیسک بلانک استفاده شد. هر دیسک بلانک به ۳۰ میکرولیتر کیتوسان اسپند آغشته شد. با کمک سوآب استریل از سوسپانسیون باکتریایی (معادل کدورت لوله نیم مک فارلند) بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت یکنواخت داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی با فواصل استاندارد بر روی سطح محیط قرار داده شدند. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط هوازی به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. بعد از این مدت قطر هاله عدم رشد هر آنتی‌بیوتیک بر حسب میلی‌متر با استفاده از خط کش اندازه گیری شد. جهت تأیید آزمایش‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی، از دیسک آنتی‌بیوتیکی جنتامایسین (به‌عنوان شاهد) استفاده شد و تمامی مراحل فوق، ۳ مرتبه تکرار گردید.

Cumulants method				Zaverage (nm):	222.28
Dv10:	102.38	Dv50:	281.91	Dv90:	489.91
PDI:	0.2680				
Dmean Intensity:	267.16	Dmean volume:	302.89	Dmean number:	78.15



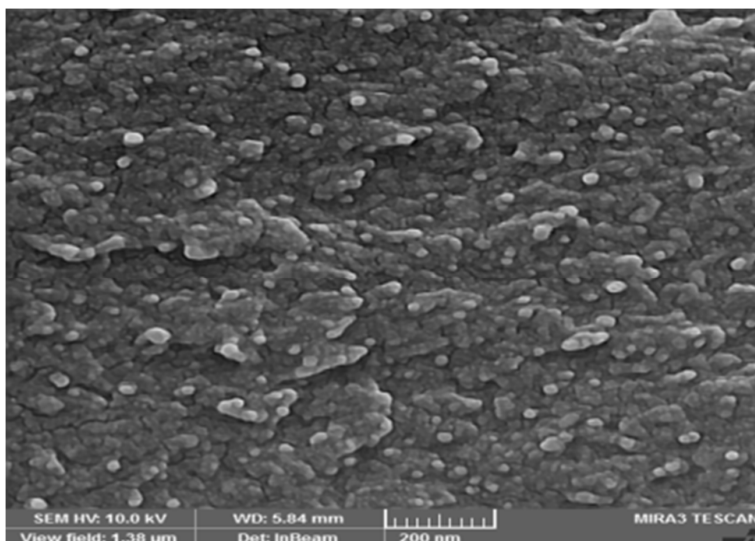
نمودار (۱): تعیین اندازه نانوذرات سنتزی



نمودار (۲): تعیین پتانسیل زتای نانوذرات

با بار مشابه بیشتر و ذرات پایدارتر بوده و مانع تجمع آن‌ها می‌شود در نتیجه نمونه ما دارای پایداری می‌باشد.

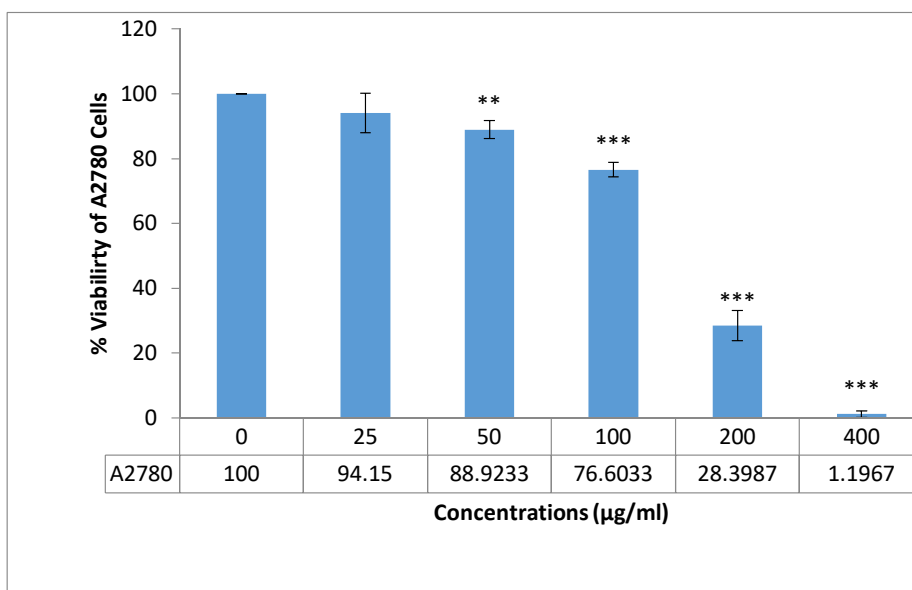
پتانسیل زتا نانوذره ۲۸ میلی ولت می‌باشد هر چه پتانسیل زتا منفی‌تر و یا مثبت‌تر باشد در نتیجه دافعه الکترواستاتیک بین ذرات



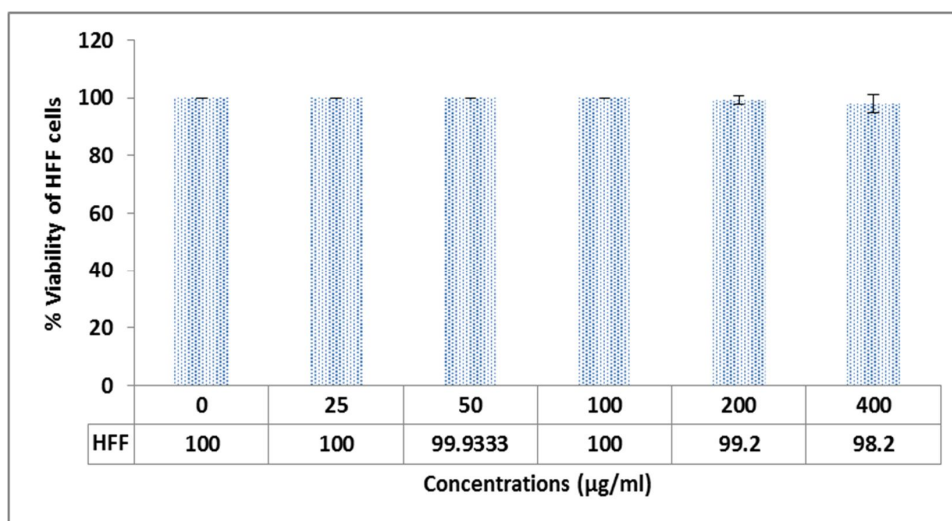
تصویر (۱): نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی

IC.50 در ۴۸ ساعت اول برای سلول‌های سرطانی ۱۷/۱۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. درحالی‌که سلول‌های نرمال نسبت به سلول‌های سرطانی درصد زنده‌مانی بالاتری نشان دادند. نتایج حاصل مشخص کرد که نانوکیتوسان قادر است سلول‌های سرطانی را در مقایسه با سلول‌های نرمال با قدرت بیشتری مهار کند (نمودار ۳ و ۴).

نتایج بررسی اثر سمیت نانوذرات کیتوسان بارگذاری شده با دود گیاه اسپند روی سلول‌های سرطان تخمدان A2780: نتایج حاصل از آزمون MTT بر رده‌ی سلولی A2780 و HFF نشان داد که زنده‌مانی سلول‌ها بسته به غلظت نانو کیتوسان است. به طوری که در ۴۸ ساعت ابتدایی پس از تیمار و در دوزهای بالای نانو کیتوسان، درصد بقاء سلول‌های سرطانی به شدت کاهش یافت.



نمودار (۳): اثر نانوکیتوسان بارگذاری شده توسط دود گیاه اسپند بر بقای سلول‌های A2780 (داده‌ها در سطح $P < 0/01$ و $P < 0/001$ *** معنی دارد).



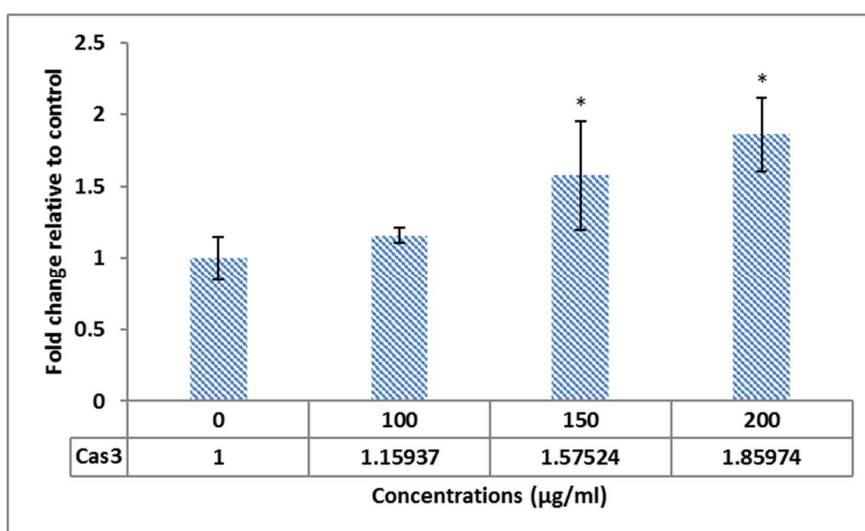
نمودار (۴): اثر نانوکیتوسان بارگذاری شده توسط دود گیاه اسپند بر بقای سلول‌های HFF

میکروگرم بر میلی‌لیتر، اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نداشت. درحالی‌که در غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری در سطح $P < 0.05$ مشاهده گردید. به‌نظر می‌رسد که نانوکیتوسان بارگذاری شده توسط دود گیاه اسپند اثر خود را برآل‌اف آپوتوز با افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ گذاشته است، به طوری که در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر این افزایش به میزان حدود دو برابر گروه کنترل مشاهده می‌گردد (نمودار ۵).

نتایج مطالعه آپوتوز به وسیله سنجش تغییرات در بیان

ژن کاسپاز-۳:

نتایج به‌دست‌آمده از ارزیابی تغییرات بیان ژن کاسپاز-۳ در سلول‌های تیمار شده با نانوکیتوسان بارگذاری شده توسط دود گیاه اسپند نشان داد که بیان این ژن در نمونه‌های تحت تیمار به‌صورت وابسته به غلظت افزایش‌یافته است. بیان این ژن در غلظت ۱۰۰



نمودار (۵): مطالعه آپوتوز به وسیله سنجش تغییرات بیان تغییرات کاسپاز ۳

نتایج بررسی فعالیت ضد میکروبی:

قابل به مشاهده است. همچنین نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC)، به ترتیب در جداول ۳ و ۴ عنوان شده است.

نتایج حاصل از هاله عدم رشد ایجاد شده با نانو ذرات کیتوسان بارگذاری شده توسط عصاره‌ی دود گیاه اسپند و هاله‌ی عدم رشد ایجاد شده توسط جنتامایسین (آنتی‌بیوتیک استاندارد) در جدول ۲

جدول (۲): مقایسه هاله عدم رشد ایجاد شده توسط نانوذرات کیتوسان اسپند و آنتی‌بیوتیک جنتامایسین

ترکیب مهار کننده	اشریشیا کلی ATCC 1330	سودوموناس آئروژینوزا ATCC 1074	استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 1112	Micrococcus luteus ATCC 14408
کیتوسان اسپند	۰	۰	mm۱۱	mm۱۴
جنتامایسین	mm۱۹	mm۱۲	mm۱۹	mm۲۹

جدول (۳): حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC)

ترکیب مهار کننده	اشریشیا کلی ATCC 1330	سودوموناس آئروژینوزا ATCC 1074	استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 1112	Micrococcus luteus ATCC 14408
کیتوسان اسپند	---	---	۰/۴ غلظت استوک	۰/۲ غلظت استوک
کلرامفنیکل (شاهد)	ug/ml۱۰۰	ug/ml۱۰۰	ug/ml۱۰۰	ug/ml۱۰۰

جدول (۴): حداقل غلظت کشنده (MBC) نانوذرات کیتوزان اسپند

ترکیب مهار کننده	استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 1112	Micrococcus luteus ATCC 14408
کیتوزان اسپند	۰/۶ غلظت استوک	۰/۴ غلظت استوک

بحث

در مطالعه‌ای مشابه نانوذرات کیتوسان حاوی عصاره هیدروالکلی گیاه عروسک پشت پرده تولید شده و اثر سمیت آن بر روی سرطان روده HT-29 مورد مطالعه قرار گرفت. نانوذرات کیتوسان حاوی عصاره با اندازه حدود ۱۶۰ نانومتر در طی زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار، اثر سمیت معنی‌داری نسبت به عصاره تنها دارد. ولی در طی زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار، اثر سمیت نانو ذرات کیتوسان حاوی عصاره به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد. مقدار IC50 عصاره و عصاره‌ی بارگذاری شده در نانو ذرات در طی ۲۴ ساعت شبیه هم و حدود ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. مقدار IC50 در ۴۸ ساعت پس از تیمار نیز، شبیه هم و حدود ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. به علاوه مقدار IC50 عصاره تنها و عصاره بارگذاری شده در نانوذرات طی ۷۲ ساعت تیمار، به ترتیب حدود ۵۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (۹). همچنین در بررسی سمیت نانوذرات نقره بر روی سلول‌های فیبروبلاست رده L929 نتایج زیر به دست آمد. در این پژوهش در تمامی گروه‌ها

در سال‌های اخیر و با پیشرفت تکنولوژی، استفاده از ظرفیت‌های زیستی، شرایط را برای انواع نانوذرات با کارایی بهتر و در حجم بیشتر مهیا کرده است. در تحقیقاتی که بر روی نانوذرات به خصوص نانوذرات کیتوسان صورت گرفته است، تاثیرات آنتی اکسیدانی خواص ضد میکروبی، ضد قارچ، ضد باکتری و سیتوتوکسیته آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه به منظور بررسی سمیت سلولی القاء شده توسط نانو کیتوسان بارگذاری شده با دود گیاه اسپند (*Peganum harmala*)، بر روی رده سلولی A2780 و نرمال HFF با استفاده از آزمون MTT انجام شد و IC50 در ۴۸ ساعت بعد از تیمار برای سلول سرطان تخمدان ۱۵۵/۱۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. درحالی‌که در غلظت مشابه برای رده سلولی نرمال فیبروبلاست میزان زنده‌مانی ۹۸ درصد بود که نشان دهنده مهار مؤثر سلول‌های سرطانی توسط نانو کیتوسان بارگذاری شده با دود گیاه اسپند است.

En / Gen به طور قابل توجهی رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی روده بزرگ انسان را مهار می‌کند (HT-29). درحالی‌که بر زنده ماندن فیبروبلاست پوستی انسان به‌عنوان سلول طبیعی تأثیر نمی‌گذارد. فلو سایتومتری و تجزیه و تحلیل بیان ژن کاسپاز ۳ مرگ سلول‌های آپوپتوز در سلول‌های HT-29 را نشان داد. علاوه بر این، ژنیستین محصور شده فعالیت ضد رگ زایی نشان داد.

CHI-En / Gen می‌تواند به‌عنوان یک حامل امیدوار کننده برای تحویل ژنیستین به روده بزرگ و استفاده از آن در رویکردهای بهداشتی مکمل برای پیشگیری از سرطان استفاده شود (۱۳).

از آنجایی‌که آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یکی از مهم‌ترین عوامل در حوزه مطالعات سرطان به‌شمار می‌رود، مسیر مرگ سلولی می‌تواند شامل فعال‌سازی فرایندهای پروآپوپتوزی اندامک میتوکندری در سلول باشد که با آزادسازی سیتوکروم C از آن آغاز می‌شود (۱۴). نانوکیتوسان سنتز شده توسط عصاره دود گیاه اسپند قادر به القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی A2780 بود. علاوه بر آن، بر این اساس نتایج حاصل از Real Time PCR، افزایش معنی‌داری نیز در بیان ژن کاسپاز ۳ مشاهده شد ($P < 0.05$).

در مطالعه‌ای نانوذرات کیتوسان بارگذاری شده با بیومولکول‌ها باعث آپوپتوز و تغییرات مولکولی در رده سلول سرطانی (SiHa) شد. نانوذرات بارگذاری شده با بیومولکول‌ها باعث آپوپتوز در یک رده سلول سرطانی دهانه رحم انسان (SiHa) شد و این بررسی برای روشن‌سازی مکانیسم‌های مولکولی زمینه‌ای انجام شده است. FT-IR و XRD به ترتیب گروه‌های عملکردی احتمالی بیومولکول‌ها و ماهیت بلوری CNP‌ها را نشان دادند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد که GSCNP و CZCNP سنتز شده به ترتیب دارای شکل کروی صاف با اندازه‌های متوسط حدود ۵۸-۸۰ و ۶۰-۱۲۰ نانومتر هستند (۱۵).

در تحقیقی به دنبال تیمار سلول‌های A2780 با نانوذرات نقره و بواسیزومب میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی Bcl-2 و کاسپاز ۳ توسط روش Real Time PCR بررسی شد. نتایج نشان داد بعد از تیمار سلول‌ها به‌طور چشم‌گیری بیان ژن آپوپتوزی کاسپاز ۳ افزایش داشته، در صورتی‌که بیان ژن آنتی آپوپتوزی Bcl-2 در این سلول‌ها کاهش یافت. در این مطالعه، پروفایل بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و Bcl-2 در سلول‌های A2780 تیمار شده با غلظت IC50 نانوذرات نقره و بواسیزومب در مدت زمان ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد. به‌منظور بررسی صحت تکثیر ژن‌های، از آنالیز منحنی ذوب استفاده شد. نتایج نشان داد که ژن‌های GAPDH، caspase 3 و Bcl2 به‌طور صحیح تکثیر یافته‌اند. بیان ژن کاسپاز ۳ نسبت به ژن مرجع GAPDH در رده سلولی A2780 تیمار شده با نانوذره نقره و

میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها بعد از ۲۴ ساعت حداقل بود اما در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها افزایش یافت و این افزایش در فعالیت حیاتی بعد از ۴۸ ساعت از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$). همچنین غلظت‌های بالاتر از ۲۰ PPM در زمان‌های ۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برای فیبروبلاست سمی گشت که این یافته می‌تواند ناشی از حساس‌تر بودن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی نسبت به فیبروبلاست‌ها به ذرات نانو نقره باشد که می‌تواند ناشی از فاگوسیت این ذرات توسط مونوسیت‌ها باشد (۱۰). در پژوهش دیگری نانوذرات کیتوسان (CS-NPs) با استفاده از روش ژلاسیون یونی با استفاده از کربوکسی متیل کیتوزان و هیدروکلراید کیتوزان به‌عنوان حامل‌های پلی فنول‌های چای تهیه شد. ویژگی‌های نانوذرات پلی فنول چای پوشیده شده با کیتوسان (CS-TP NP) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و طیف‌سنجی FT-IR تعیین شد. نتایج نشان داد که نانوذرات سنتز شده CS-TP از نوع غیر کروی با اندازه متوسط 407 ± 507 بودند. در همین حال، میزان دارو و میزان کپسوله شدن نانوذرات به ترتیب ۸-۱۶ درصد و ۴۴-۸۳ درصد بود. این نانوذرات همچنین ترشح پایدار پلی فنول‌های چای را در PBS نشان دادند. اثرات ضد تومور آن‌ها بر علیه سلول‌های سرطانی HepG2 بررسی شد و نتیجه نشان داد که NP‌های CS-TP فعالیت‌های ضد توموری قابل توجهی را نشان می‌دهند (۱۱).

در پژوهش دیگری نانوذرات کیتوسان (CS-NPs) برای فرمولاسیون داروی ضد سرطان Sunitinib (STB) مورد استفاده قرار گرفت و فرمول بندی از طریق روش اتصال عرضی یونی ساده انجام شد. فرمول تهیه شده توسط DLS، SEM، FT-IR و XRD مشخص شد. مطالعه DLS نشان می‌دهد که نانوذرات کیتوسان لود شده توسط Sunitinib (SNB-CS-NPs) در محدوده اندازه بیش از ۲۰۰ نانومتر بودند. کپسول‌سازی Sunitinib و اعتبار سنجی برای فرمولاسیون با استفاده از اسپکتروفتومتری UV انجام شد. ترشح دارو در شرایط آزمایشگاهی و مطالعات سیتوتوکسیک آن برای STB-CS-NP انجام شد. این مطالعه حاوی سیستم جدید تحویل دارو برای Sunitinib برای تحویل مؤثر و پایدار است (۱۲).

در تحقیق دیگری سنتز و خصوصیات ژنیستین محصور در کیتوزان، صورت پذیرفت و فعالیت‌های ضد تکثیری و ضد رگ زایی آن بررسی شد. فعالیت سمیت و ضد رگ زایی CHI-En / Gen با استفاده از MTT و روش غشای کوریوالانتوتیک انجام شد. نتایج مولکولی با استفاده از فلوسیتومتری و بیان ژن تعیین شد. نتایج حضور نانوذرات سنتز شده با اندازه زیر میکرون، کروی شکل و با بارده گیر انداختن و بارده بارگیری به ترتیب ۷۶،۸ درصد (وزنی/وزنی) و ۳۲،۶ درصد (وزنی/وزنی) تأیید نمود. نتایج نشان داد CHI-

استفاده شده است. سپس اثر ضدباکتریایی اسانس کپسوله شده و اسانس آزاد با روش دیسک دیفیوژن و میکروداپلوشن براث بررسی شد. نتایج نشان داد که اسانس کپسوله شده در مقایسه با اسانس آزاد، اثر ضد باکتریایی بیشتری بر علیه باکتری‌های مطالعه شده دارد (۱۸).

در مطالعه‌ای که خاصیت ضد باکتری نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصاره پوسته دانه اسپند بررسی شد این ترکیب سبب مهار رشد باکتری‌های سالمونلا تیفی و پروتئوس میرابیلیس گردیده است (۱۹).

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد نانوذرات کیتوسان بارگذاری شده توسط دود گیاه اسپند دارای فعالیت ضد سرطانی بر روی سلول سرطانی تخمدان A2780، القاء آپوپتوز از طریق افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ و خاصیت آنتی باکتریایی بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتئوس* است. این نتایج ترکیب مذکور را واجد پتانسیل بالا جهت مطالعات درون تنی حیوانی دانسته که در صورت تأیید خواص مذکور در تحقیقات تکمیلی می‌تواند جهت تولید داروهای ضد باکتری و ضد سرطانی مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم ملیحه منفرد می‌باشد. بدین وسیله مؤلفین از مسئولین و کارشناسان آزمایشگاه‌های گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی مشهد تشکر می‌نمایند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

بواسیزومب در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت افزایش معنی‌داری داشت. نسبت بیان ژن Bcl-2 به ژن مرجع GAPDH در رده سلولی A2780 تیمار شده با ترکیب نانوذرات نقره و بواسیزومب در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) (۱۶).

اسانس‌های گیاهی دارای اثرات ضد میکروبی و فارماکولوژیکی متعددی هستند، اما بسیار فرار می‌باشند. کپسوله شدن مواد دارویی در نانو ذرات پلیمری می‌تواند اثرات درمانی ترکیباتی که عموماً فرار هستند را بهبود دهد. کیتوسان به‌عنوان بیوپلیمر زیست تخریب پذیر به دلیل کپسوله کردن بهتر، رهاسازی کنترل شده و سمیت پایین در انتقال دارو بسیار مورد توجه می‌باشد. در مطالعه حاضر، بررسی آزمون آنتی باکتریال به روش دیسک دیفیوژن نشان داد که نانوکیتوسان سنتز شده توسط گیاه دود اسپند اثر ضد میکروبی را با مهار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با هاله عدم رشد ۱۱ میلی متر و *میکروکوکوس لوتئوس* با هاله عدم رشد ۱۴ میلی متر گزارش شد و در سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی رشدی مشاهده نشد. در تحقیقی مشابه بررسی خاصیت ضد میکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان - اکسید روی انجام شد. نتایج نشان داد غلظت نانوذره اکسید روی، روی فعالیت ضد میکروبی نانو کامپوزیت اثر می‌گذارد. فیلم نانو کامپوزیت کیتوزان - اکسید روی حاوی ۱/۵ درصد اکسید روی دارای بیشترین اثر ضد میکروبی بود. همچنین فیلم نانو کامپوزیت حاوی ۱/۵ درصد اکسید روی بر روی گاز استریل اثر ضد میکروبی روی هر دو باکتری نشان داد (۱۷).

همچنین بررسی اثر ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی کپسوله شده در بیوپلیمر کیتوسان در مقایسه با اسانس آزاد انجام گرفت. بر این اساس، ابتدا نانوذله، به روش خود تجمعی از پلیمر کیتوزان و اسید کافیک سنتز شد و پس از بررسی شکل و اندازه آن‌ها با روش‌های اسپکترومتر (FTIR) و میکروسکوپی الکترونی نگاره (SEM)، از آن به‌منظور کپسوله کردن اسانس آویشن شیرازی

References:

1. Paul W, Sharma CP. Chitosan, a drug carrier for the 21st century: a review. STP Pharma Sci 2000;10(1):5-22.
2. Huang M, Fong CW, Khor E, Lim LY. Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. J Control Release 2005;2;106(3):391-406.
3. Malmo J, Sörgård H, Vårum KM, Strand SP. siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing. J Control Release 2012;10;158(2):261-8.
4. Sato T., Ishii T., Okahata Y. In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. Biomaterials 2001;22:2075-2080.
5. Bar H, Bhui DK, Sahoo GP, Sarkar P, De SP, Misra A. Green synthesis of silver nanoparticles using

- latex of jatrofa curcas. *Colloids Surf. Physicochem Eng Asp* 2009;339(1-3):134-9.
6. Braeckmans K., Buyens K., Bouquet W., Vervaeck C., Joye P., Vos F.D., Plawinski L., Doeuvre L., Angles-Cano E., Sanders N.N. Sizing nanomatter in biological fluids by fluorescence single particle tracking. *Nano Lett* 2010;10:4435-4442.
 7. Buyens K., Meyer M., Wagner E., Demeester J., De Smedt S.C., Sanders N.N. Monitoring the disassembly of siRNA polyplexes in serum is crucial for predicting their biological efficacy. *J Control Release* 2010;141:38-41.
 8. Sperling LH. Cross-linked polymers and rubber elasticity. *Int Phys Polymer Sc* 2001;3.
 9. Ho WY, Yeap SK, Ho CL, Rahim RA, Alitheen NB. Development of multicellular tumor spheroid (MCTS) culture from breast cancer cell and a high throughput screening method using the MTT assay. *PloS One* 2012;7(9):e44640.
 10. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;16;65(1-2):55-63.
 11. Hsu SH, Tsenq HJ, Lin YC. The Biocompatibility and Antibacterial Properties of Waterborne Polyurethane-Silver Nanocomposites. *J Biomaterials* 2010;31(26):6796-808.
 12. Liang J, Li F, Fang Y, Yang W, An X, Zhao L, et al. Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of chitosan-coated tea polyphenols nanoparticles. *Colloids Surf B* 2011;82(2):297-301.
 13. Joseph JJ, Sangeetha D, Gomathi T. Sunitinib loaded chitosan nanoparticles formulation and its evaluation. *Int. J. Biol. Macromol* 2016;82:952-8.
 14. Rahmani F, Karimi E, Oskoueian E. Synthesis and characterisation of chitosan-encapsulated genistein: its anti-proliferative and anti-angiogenic activities. *J Microencapsul* 2020;37(4):305-13.
 15. Anbu AS, Velmurugan P, Lee J-H, Oh B-T, Venkatachalam P. Biomolecule-loaded chitosan nanoparticles induce apoptosis and molecular changes in cancer cell line (SiHa). *Int J Biol Macromol* 2016 88:18-26.
 16. Devarajan E, Sahin AA, Chen JS, Krishnamurthy RR, Aggarwal N. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene* 2020;21:8843-51.
 17. Li LH, Deng JH, Deng HR, Liu ZL, Xin L. Synthesis and characterization of chitosan/ZnO nanoparticle composite membranes. *Carbohydr Res* 2010;345(8):994-8.
 18. Mahboubi M., Ghazian Bidgoli, F. Antistaphylococcal activity of Zataria multiflora essential oil and its synergy with vancomycin. *Phytomedicine* 2010;17:548-50.
 19. Neira-Vielma AA, Meléndez-Ortiz HI, García-López JI, Sanchez-Valdes S, Cruz-Hernández MA, Rodríguez-González JG, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using pecan nut (*Carya illinoensis*) shell extracts and evaluation of their antimicrobial activity. *Antibiotics* 2022;11:1150.

LOADING OF PECAN SMOKE EXTRACT BY CHITOSAN NANOPARTICLES AND EVALUATION OF ITS TOXICITY AND INDUCTION OF APOPTOSIS ON CANCER CELLS A2780

Maliheh Monfared¹, Ali Neamati^{2*}, Masoud Homayouni³

Received: 25 August, 2022; Accepted: 25 November, 2022

Abstract

Background & Aims: Nanoparticles are effective in cancer cells and in the treatment of diseases due to their ability to induce toxicity and induce apoptosis and antibacterial properties. Pecan seeds are rich in carbohydrates, lipids, proteins, mineral salts, alkaloids, and amino acids; among its important alkaloids are harmaline, harmine, harmalol and vasisine can be mentioned, which have many uses in industry and medicine. The aim of this research is to investigate the effects of pecan smoke loaded with nano-chitosan on cytotoxicity, apoptosis induction and its antibacterial effects.

Materials & Methods: In this experimental study which was conducted in vitro, MTT test was used to investigate the toxicity effect of chitosan nanoparticles loaded with pecan smoke on ovarian cancer cell line A2780 and HFF normal fibroblast cell. Also, to investigate the induction of apoptosis, the method of determining the expression of the caspase 3 gene was used, and to investigate the antibacterial properties, the disk diffusion method was used on the gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus* and the gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Statistical analysis was performed by SPSS software and one-way analysis of variance. $P < 0.05$ was considered as significant.

Results: The result of the MTT test showed the value of IC₅₀ for ovarian cancer cells in 48 hours after treatment as 17.155 µg/ml; while at the same concentration for the normal cell line, the survival rate was 98%. Also, the induction of apoptosis of A2780 cancer cells was observed based on a significant increase in the expression of caspase 3 gene. In addition, these nanoparticles had an inhibitory effect on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus* bacteria.

Conclusion: Chitosan nanoparticles synthesized by *Peganum harmalla* smoke had anti-cancer, apoptotic, and antibacterial activity.

Keywords: Apoptosis, Anti-cancer, Chitosan, Nanoparticles, Ovarian cancer, Pecan

Address: Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Tel: +985138435000

Email: neamati.ali@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2022; 33(5): 360 ISSN: 2717-008X

Copyright © 2022 Studies in Medical Sciences

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ MSc, in Genetic. Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

² Associate Professor, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran (Corresponding Author)

³ Associate Professor, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran