مقاله پژوهشی

اثرات ضد سرطانی نانوامولسیون کافئین بر لوسمی میلوئیدی مزمن

ایوب امیری‌زاده[1]، ساناز شیخ‌زاده [2*]، نوروز دلیرژ [3]

تاریخ دریافت ۱۴۰۲/۰۵/۱۱ تاریخ پذیرش ۱۴۰۲/۰۹/۱۸

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: کافئین به‌عنوان یک ماده‌ی طبیعی موجود در قهوه و چای می‌تواند از طریق کاهش تکثیر سلولی و القا آپوپتوز، اثرات ضد سرطانی داشته باشد. از طرف دیگر، از نانوحامل‌ها می‌توان به‌عنوان یک روش مناسب برای تحویل مناسب داروها در محل تومور، محافظت از داروها و هدف قرار دادن اندام‌های خاص و ماندگاری بالا استفاده نمود. هدف از این مطالعه تولید نانوامولسیون کافئین و ارزیابی اثرات ضد سرطانی آن بر روی سلول‌های سرطان خون بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه تجربی، بعد از تولید نانوامولسیون کافئین و ارزیابی خصوصیات فیزیک و شیمیایی آن، سلول‌های سرطانی رده K562 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوامولسیون کافئین و کافئین آزاد قرار گرفته و قدرت زنده‌مانی سلول‌های سرطانی با استفاده از روش‌های نوترال رد و تریپان به لو اندازه‌گیری شد. هم‌چنین میزان آپوپتوز و نکروز با استفاده از تست AO/PI مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها به کمک آزمون ANOVA یک‌طرفه ونیز آزمون توکی و توسط نرم‌افزار SPSS ۱۶ آنالیز شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کاهش زنده‌مانی سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوامولسیون کافئین و کافئین آزاد به‌صورت وابسته به غلظت و زمان بوده و نانوامولسیون کافئین نسبت به کافئین آزاد دارای اثرات سمیت سلولی بیشتری بر روی سلول‌های سرطانی بود. همچنین نتایج نشان داد که نانوامولسیون کافئین بیشتر باعث مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در سلول‌های سرطانی تحت تیمار شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر، حاکی از کاهش زنده‌مانی و القای آپوپتوز در سلول‌های K562 به‌عنوان رده سلولی سرطان لوسمی میلوئید مزمن بعد از قرار گرفتن در معرض نانوامولسیون کافئین بوده و می‌توان استفاده از نانوامولسیون کافئین را به‌عنوان روشی کمکی، در کنار سایر روش‌های درمانی در درمان سرطان لوسمی میلوئید مزمن پیشنهاد داد.

کلیدواژه‌ها: ضد تکثیر، آپوپتوز، کافئین، لوسمی میلوئیدی مزمن، نانوامولسیون

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و چهارم، شماره نهم، ص ٥٦٤-٥٥٢، آذر ۱۴۰۲

آدرس مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران تلفن: ۰۴۴۳۱۹۴۲۵۶۲

Email: s.sheikhzadeh@urmia.ac.ir

مقدمه

سرطان یک بیماری پیچیده است که الگوها و روند مرگ‌ومیر در آن بین کشورها و در انواع خاص سرطان به‌طور قابل‌توجهی متفاوت است و می‌تواند به‌صورت گسترده در هر زمان و مکانی رخ دهد. این تغییرات به دلیل تفاوت در سبک زندگی و قرار گرفتن در معرض عوامل تعیین‌کننده شناخته‌شده یا فرضی، در حال تغییر است. سرطان اولین یا دومین علت مرگ زودرس (در سنین ۳۰ تا ۶۹ سال) در ۱۳۴ کشور از ۱۸۳ کشور است و در ۴۵ کشور دیگر رتبه سوم یا چهارم را دارد. از ۱۵،۲ میلیون مرگ زودرس ناشی از بیماری‌های غیرواگیر در سراسر جهان در سال ۲۰۱۶، ۴،۵ میلیون (۲۹،۸ درصد) به دلیل سرطان بوده است. که این نشان‌دهنده رو به رشد بودن آن را دارد. بر اساس آخرین بررسی‌ها، سرطان بعد از بیماری‌های قلبی و حوادث غیر عمد سومین عامل مرگ‌ومیر در ایران هست که تقریباً ۳۰ هزار مورد مرگ و ۷۰ هزار مورد ابتلا جدید به سرطان در کشور را شامل می‌شود. در سال ۲۰۱۸، ۴۳۷۰۰۰ مورد جدید سرطان خون در سراسر جهان تخمین زده شد، که در این میان لوسمی پانزدهمین نوع سرطان شایع بود که ۲،۴ درصد از کل موارد سرطان جدید را تشکیل می‌داد (۱). با توجه

[1] دانشجوی ایمنی شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

[2] استادیار ایمونولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه (نویسنده مسئول)

[3] استاد ایمونولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

به میزان بروز و شیوع قابل‌توجه سرطان خون در دنیا و ایران و هم‌چنین درگیر کردن گروه‌های سنی مختلف، که می‌تواند باعث خسارات زیاد ازجمله مرگ‌ومیر قابل‌توجه و هزینه‌های تشخیصی و درمانی زیادی شود (۳،۲). لوسمی، یکی از شایع‌ترین سرطان‌های کشنده است. لوسمی، گروهی از بدخیمی‌های ناهمگن سلول‌های بنیادی خون‌ساز[1] (HSC) است و مشخصه آن تجمع نابجای بلاست‌های تمایز نیافته است که قادر به تکثیر به مقدار زیاد در مغز استخوان هستند و در زایش و ایجاد سلول‌های خونی طبیعی اختلال ایجاد می‌کنند. لوسمی‌ها به چهار زیرگروه مهم ازجمله لوسمی میلوئید حاد[2] (AML)، لوسمی لنفوبلاستیک حاد[3] (ALL)، لوسمی میلوئید مزمن[4] (CML) و لوسمی لنفوبلاستیک مزمن[5](CLL) طبقه‌بندی می‌شوند (۴).

CML یک نئوپلاسم میلوپرولیفراتیو است که توسط کروموزوم فیلادلفیا[6] (Ph) (q34; q11.2) t (9; 22) (22)) ایجاد می‌شود. این جابجایی، ژن فیوژن BCR: ABL1 را تولید می‌کند که به‌طور نابهنجار ABL1 کیناز را فعال می‌کند و باعث تولید بیش‌ازحد سلول‌های سرطانی می‌شود (۵).

CML یک اختلال کلونال بدخیم سلول‌های بنیادی خون‌ساز است که منجر به افزایش نه‌تنها سلول‌های میلوئیدی بلکه سلول‌های اریتروئید و پلاکت‌ها در خون محیطی و هیپرپلازی مشخص میلوئید در مغز استخوان می‌شود. میانگین سنی در هنگام مراجعه ۵۳ سال است، اما همه گروه‌های سنی، ازجمله کودکان، تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۶).

لوسمی‌ها در چارچوب عوامل مختلف میزبان و محیطی ایجاد می‌شوند. عوامل میزبان، شامل ناهنجاری‌های ژنتیکی (اغلب جابه‌جایی‌های کروموزومی)، اختلالات ارثی نادر و سرکوب‌های ایمنی نادر یا مرتبط با بیماری هستند. عوامل محیطی کلیدی مرتبط با سرطان خون، شامل پرتوهای یونیزه، شیمی‌درمانی و مواد شیمیایی سرطان‌زا است (۷).

برای جلوگیری از بدخیمی و سرطانی نشدن سلول‌ها می‌توان از مواد طبیعی که امروزه به‌عنوان یک استراتژی امیدوارکننده محسوب می‌شوند و در مدل‌های تجربی نیز باعث مهار سرطان شده است استفاده کرد (۹،۸). اخیراً ترکیبات مشتق شده طبیعی به دلیل در دسترس بودن آسان، غیرسمی بودن و زیست سازگاری، توجه فزاینده‌ای را به خود جلب کرده‌اند. با توجه به پیامدهای جانبی زیاد داروهای شیمی‌درمانی، بهره‌گیری از ترکیبات طبیعی در درمان سرطان، بسیار حائز اهمیت است (۱۰). ازجمله این مواد می‌توان به کافئین اشاره کرد که می‌تواند باعث مهار تکثیر در سلول‌های سرطانی کشت داده‌شده یا مدل‌های حیوانی القاشده، شود. کافئین (trimethylxanthine-۱،۳،۷) یک آلکالوئید پورین است که متعلق به گروه متیل گزانتین است. و به‌عنوان یکی از اجزای اصلی موجود در قهوه هست، و هم‌چنین در برگ‌های چای، نوشیدنی‌های حاوی کاکائو، نوشابه‌ها و محصولات شکلاتی و برخی از داروها، ازجمله مسکن‌ها وجود دارد (۸). کافئین در تمام مراحل رشد سرطان می‌تواند اختلال ایجاد کند، ازجمله جلوگیری از شروع سرطان‌زایی، القای آپوپتوز، مهار رگزایی، داشتن فعالیت ضد توموری در داخل بدن و افزایش اثرات شیمی‌درمانی داروهای ضد سرطان را می‌توان نام برد. اثرات سیتوتوکسیک برخی از داروهای ضد سرطان نیز با ترکیب با کافئین بهبود می‌یابد (۱۱).

علاوه بر این، استفاده از ترکیبات طبیعی در سنتز نانوذرات یا محصور کردن ترکیبات طبیعی در نانوذرات در استراتژی‌های درمانی در برابر سرطان و مراحل پیشرفته عفونت مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا نانوذرات ویژگی‌های اختصاصی بودن هدف، رهش کنترل‌شده و غیرسمی بودن را نشان می‌دهند (۱۲). تحویل دارو به تومورهای جامد یکی از مهمترین چالش‌ها در درمان سرطان است. زیرا اکثر ترکیبات مورد استفاده در درمان سرطان به علت سینتیک‌های دارویی، تحویل کم و تجمع محدود در سلول هدف، تخریب می‌شوند. بنابراین نیاز به سیستم‌هایی است تا با کپسول‌دار کردن داروها، از آن‌ها علیه شکسته شدن متابولیکی، PH یا از لحاظ دمایی محافظت گردد که از این سیستم‌ها لیپوزوم یا وزیکول‌هایی مانند نانوامولسیون را می‌توان نام برد (۱۳).

استفاده از سیستم‌های نانوحامل، جهت تحویل داروها به‌عنوان یک استراتژی مؤثر برای افزایش تجمع دارو در محل تومور (۱۴)، بهبود پایداری دارو، نفوذپذیری بالا و محافظت از داروها در برابر عواملی مانند (اکسیداسیون، PH، هیدولیز) نشان داده شده است (۱۵).

کافئین به احتمال زیاد پر مصرف‌ترین داروی عصبی فعال در جهان می‌باشد. گزارش شده است که کافئین می‌تواند با اثر بر روی عملکرد چرخه سلولی بر روی سلول‌ها تأثیر بگذارد، و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا آپوپتوز را تحریک و نیز پروتئین‌های کلیدی تنظیم کننده چرخه سلولی را مختل کند (۱۶). کافئین به‌صورت تجربی در انواع سلول‌ها، تحت شرایط مختلف در غلظت‌های مختلف از میکرومولار تا میلی مولار استفاده شده و اثرات آن مورد بررسی قرار گرفته است (۱۷). به نظر می‌رسد که کافئین

[1] Hematopoietic stem cell
[2] Acute myeloid leukemia
[3] Acute lymphoblastic leukemia
[4] Chronic myelogenous leukemia
[5] Chronic lymphocytic leukemia
[6] Philadelphia

در غلظت‌های مختلف، عموماً سمیت عوامل شیمیایی آسیب رسان به DNA را افزایش می‌دهد. اما متاسفانه کافئین در غلظت‌های پایین‌تر از یک میلی مولار، نیز اثرات مخربی بر سیستم عصبی دارد (۱۸) و سطوح بالای کافئین مورد نیاز برای القای آپوپتوز ممکن است برای انسان بسیار سمی باشد. از این رو تولید نانوذرات حاوی کافئین با توجه به مزایای ذکر شده برای این سیستم ازجمله نیاز به استفاده از غلظت پایین کافئین و تحویل هدفمند کافئین به سلول‌های توموری می‌تواند گام مفیدی در استفاده از اثرات ضد سرطانی این ماده بر روی سلول‌های سرطانی باشد. بر این اساس، در این مطالعه، ابتدا به تولید نانوامولسیون کافئین با خصوصیات فیزیکوشیمیایی مطلوب پرداخته شد و سپس اثرات ضدسرطانی نانوامولسیون کافئین و کافئین آزاد بر روی رده سلولی سرطانی K562 مورد ارزیابی قرار گرفت، تا در صورتی که نانوامولسیون کافئین، اثرات ضدسرطانی قوی داشته باشد بتوان به‌عنوان یک درمان کمکی در کنار شیمی‌درمانی برای درمان لوسمی مورد استفاده قرار داد.

مواد و روش کار

این مطالعه از نوع مداخله‌ای تجربی بود که به‌صورت موردی/شاهدی انجام شد.

تهیه نانوامولسیون حاوی کافئین:

امولسیون، یک سیستم ذرات کلوئیدی است که از دو مایع ناهمگن مانند مخلوط آب و روغن تشکیل می‌شود. ساختمان امولسیون از قطرات پراکنده یک مایع (فاز داخلی) در یک مایع دیگر (فاز خارجی) تشکیل می‌شود. برای تهیه نانوامولسیون کافئین، از روش امولسیون خود به خودی توضیح داده شده توسط اوسترتاگ و همکاران با کمی تغییرات استفاده شد (۱۹). بدین منظور ابتدا کافئین در پنج میلی لیتر اتانول و یک میلی لیتر آب به مدت ۱۵ دقیقه هم زده شد. سپس محلول کافئین به محلول دو درصد لسیتین به آرامی و به‌صورت قطرات با حجم کم اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در سرعت ۸۰۰rpm با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس محلول ۳۰ درصد توئین ۸۰ به‌عنوان سورفاکتانت اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰rpm هم زده شد. در مرحله آخر نیز آب دیونیزه اضافه گردید و محلول مورد نظر به مدت ۶۰ دقیقه و با سرعت ۸۰۰rpm با استفاده از همزن مگنت‌دار هم زده شد.

بررسی میکروسکوپی نانوامولسیون تولیدی:

مورفولوژی نانوامولسیون‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین کارایی انکپسولاسیون:

مقدار کافئین محصور شده در نانوذرات با استفاده از اندازه‌گیری جذب، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. یک میلی لیتر نمونه از قسمت میانی نمونه در دی کلرومتان (نسبت ۱:۱۰) حل شده، سپس با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مقدار کمی از مایع رویی برای تجزیه و تحلیل، نمونه‌برداری شده و غلظت کافئین، با جذب در طول موج ۳۶۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV/مرئی اندازه‌گیری و تعیین شد.

بازده کپسوله‌سازی[1] ((EE)) کافئین در فاز پراکنده با استفاده از معادله زیر محاسبه شد.

$$EE = (Ct/C0) \times 100$$

که در آن Ct نشان‌دهنده غلظت کافئین است که در یک زمان خاص در امولسیون باقی مانده است و C0 مربوط به غلظت اولیه کافئین است.

ارزیابی میزان رهایش:

اندازه‌گیری میزان رهایش، با استفاده از روش دیالیز غشایی مورد بررسی قرار گرفت. ۳ میلی لیتر نانوامولسیون کافئین در کیسه‌های دیالیز با وزن مولکولی ۱۲-۱۴ کیلو دالتون قرار داده شد. کیسه‌های دیالیز در ۲۰۰ میلی لیتر بافر PBS با ۷/۴pH غوطه ور شده و در ۲۰۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷ درجه هم زده شدند. در زمان‌های از پیش تعیین شده، نمونه‌های ۵ میلی لیتری از محیط رهاسازی خارج و با حجم مساوی از بافر تازه جایگزین شد تا حجم ثابتی حفظ شود. میزان رهایش کافئین از کیسه دیالیز با UV-VIS اسپکتروفتومتری در طول موج ۳۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

کشت سلول‌های سرطانی رده K562:

رده‌ی سلولی K562 از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران تهیه شده، و در محیط کشت ۹۰ درصد RPMI، 10 درصد سرم جنین گاوی، یک درصد آنتی‌بیوتیک پن استرپ (پنی سیلین + استرپتومایسین)، دو درصد L-گلوتامین کشت داده شده و در انکوباتور حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن و با رطوبت ۹۵ درصد انکوبه شد.

[1] Encapsulation Efficiency

تعیین تعداد سلول‌های زنده به‌وسیله روش دفع رنگ تریپان به لو:

تریپان به لو یک روش رنگ سنجی است که برای تشخیص زنده‌مانی سلولی انجام می‌گیرید. در واقع در این تست، سلول‌های مرده به علت آسیب غشای سلولی، به رنگ آبی در می‌آیند اما سلول‌های زنده که غشای سالمی دارند رنگ نمی‌تواند به داخل آن‌ها نفوذ کند.

برای انجام تست مورد نظر، به نسبت برابر (۲۰ میکرولیتر) از سوسپانسیون سلولی و رنگ تریپان به لو به خوبی با هم مخلوط گردید، سپس لام نئوبار به همراه یک لامل سنگی آماده و مقدار ۲۰ میکرولیتر از مخلوط سوسپانسیون و تریپان به لو را برداشته و در فضای بین لام و لامل ریخته شد. سپس تعداد سلول‌های زنده و مرده توسط میکروسکوپ نوری و با عدسی ۴۰ شمارش گردید. تعداد کل سلول‌ها در هر میلی لیتر به شرح ذیل محاسبه شد:

$C= N\times2\times5\times10^4$

N: تعداد متوسط سلول‌ها در هر خانه.

2: ضریب رقیق شدن بارنگ تریپان به لو.

5: تعداد خانه‌هایی که سلول در آن شمارش شده است.

10^4: ضریب بزرگی یک میلی لیتر در مقایسه با حجم ۰/۱ میلی لیتری تمام خانه‌ها.

بررسی سمیت سلولی نانوامولسیون تهیه شده به روش نوترال رد:

سنجش جذب قرمز خنثی (NRU)[1] یک روش سنجش زنده‌مانی است که بر اساس توانایی سلول‌های زنده در ترکیب و اتصال به رنگ قرمز خنثی (NR)[2] صورت می‌گیرد. این رنگ کاتیونی ضعیف می‌تواند با نفوذ غیر یونی در PH فیزیولوژیک به داخل سلول‌ها نفوذ کند. هنگامی که NR در سلول قرار می‌گیرد، به‌صورت درون سلولی در لیزوزوم‌ها تجمع می‌یابد، جایی که شیب پروتون، pH اسیدی بیشتری را تضمین می‌کند و رنگ باردار می‌شود. به این ترتیب، سنجش NRU امکان ارزیابی نفوذپذیری غشاء و فعالیت لیزوزومی را فراهم می‌کند و تمایز سلول‌های زنده، آسیب‌دیده یا مرده را ممکن می‌سازد. در این تست بعد از نفوذ رنگ به درون سلول، شست‌وشوی محیط اطراف سلول‌ها که داری رنگ آزاد می‌باشند صورت گرفت، سپس رنگ ترکیب شده با سلول‌ها به کمک یک محلول اسیدی اتانول، از سلول‌های زنده آزاد شد تا بتوان قیاسی از عملکرد و سلامتی سلول‌های زنده به دست آورد.

در این تست به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول از سلول‌های K562 با غلظت‌های مختلف نانوامولسیون کافئین (۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ ug/ml) و کافئین آزاد (۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ ug/ml) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. پس از انکوباسیون، محلول چاهک‌ها آسپیره شده و ۱۰ میکرولیتر از محلول نوترال رد به هر چاهک اضافه گردید. پلیت به مدت ۳ ساعت در انکوباتور قرار گرفت، و سپس پس از شستشوی چاهک‌ها با PBS، محلول بافر لیزکننده (۵۰ درصد الکل ۹۶ درصد،۴ درصد اسید استیک و ۴۶ درصد آب مقطر) اضافه و پیپتاژ گردید. رنگ ایجاد شده با استفاده از دستگاه الایزاریدر در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد (۲۰).

بررسی مورفولوژی سلولی:

تغییرات ریخت‌شناسی و رشد سلول‌های سرطانی با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های سرطانی با غلظت IC50 به دست آمده برای نانوامولسیون کافئین و کافئین آزاد، به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شده و تصاویر سلول‌ها با بزرگنمایی 40X به دست آمد.

بررسی مورفولوژی هسته (رنگ آمیزی آکریدین اورنج[3] (AO) و پروپیدیوم یداید[4] (PI)):

برای بررسی مورفولوژی هسته سلول‌ها، از رنگ‌های فلورسنت PI و AO استفاده گردید. بعد از تیمار سلول‌های سرطانی به مدت ۴۸ ساعت با غلظت IC50 به دست آمده برای نانوامولسیون کافئین و کافئین آزاد، سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به آرامی خالی و دور ریخته شد و با استفاده از محیط کشت، حجم به یک میلی لیتر رسانده شد. نمونه مورد نظر با µl۱۰ اکریدین اورنج رنگ آمیزی و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، سلول‌ها با استفاده از محیط کشت دو بار شستشو شده، حجم آن مجدداً به ۱ میلی لیتر رسانده شد و ۱۰ میکرولیتر پروپیدیوم یداید به آن اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه انکوبه شدند. در آخرین مرحله، سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شده و سپس مایع رویی حذف شد. تعیین آپوپتوز سلول‌های K562 پس از رنگ آمیزی به‌وسیله میکروسکوپ فلوروسنت انجام گرفت. بدین منظور ۵۰ میکرولیتر از توده سلولی برداشته شده و روی لام شیشه‌ای ریخته شد. سپس یک لامل روی آن گذاشته و در زیر میکروسکوپ

[1] Neutral red uptake
[2] Neutral red
[3] Acridine orange
[4] Propidium Iodide

فلوروسنت با عدسی ۴۰ تعداد ۵ میدان میکروسکوپی بررسی شد.

در روش رنگ آمیزی دو گانه آکریدین اورنج و پروپیدیوم یداید، آکریدین اورنج به داخل همه سلول‌ها نفوذ کرده و موجب سبز رنگ شدن سلول‌ها می‌شود. پروپیدیوم یداید فقط وارد سلول‌هایی می‌شود که غشاء آن‌ها سالم نباشد و باعث ایجاد رنگ قرمز در آن‌ها می‌شود. سلول‌هایی که به رنگ سبز می‌باشند سالم، سلول‌هایی که به رنگ سبز روشن همراه با کروماتین متراکم و قطعه قطعه می‌باشند آپوپتوز اولیه، آن‌هایی که دارای رنگ قرمز با کروماتین متراکم و قطعه قطعه می‌باشند آپوپتوز ثانویه و نهایتاً آن‌هایی که دارای هسته متورم و قرمز رنگ می‌باشند دچار نکروز هستند.

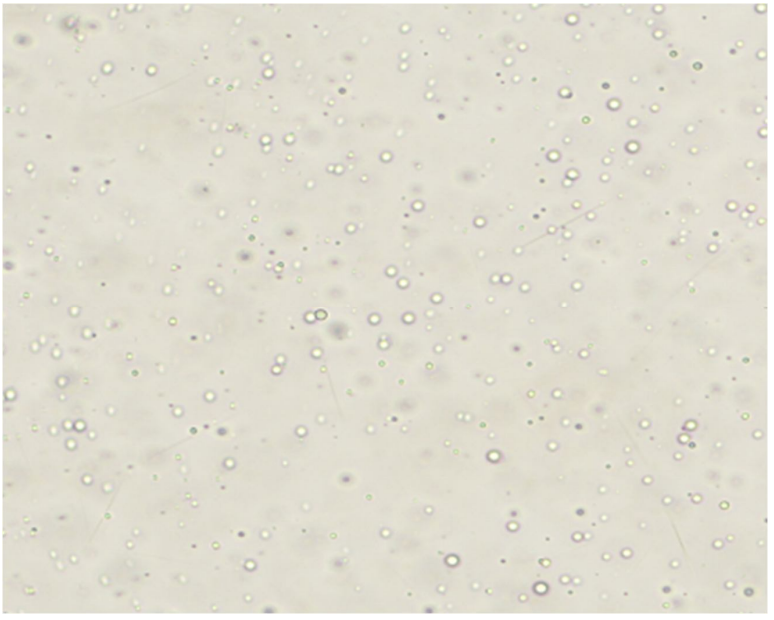
آنالیز آماری:

تمامی تست‌ها حداقل سه بار تکرار شد و اطلاعات به دست آمده توسط آزمون ANOVA یک‌طرفه و آزمون توکی ارزیابی شد. جهت یافتن IC50 نیز از مدل رگرسیون خطی استفاده شد و $p\leq ۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنا دار داده‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی مورفولوژی نانوذرات:

تصاویر به دست آمده، آماده سازی و پراکندگی خوب نانوامولسیون تولیدی را نشان داد. به‌طوری که می‌توان ذرات را به‌صورت کروی، با سطح صاف و اندازه یکنواخت مشاهده کرد (شکل ۱).



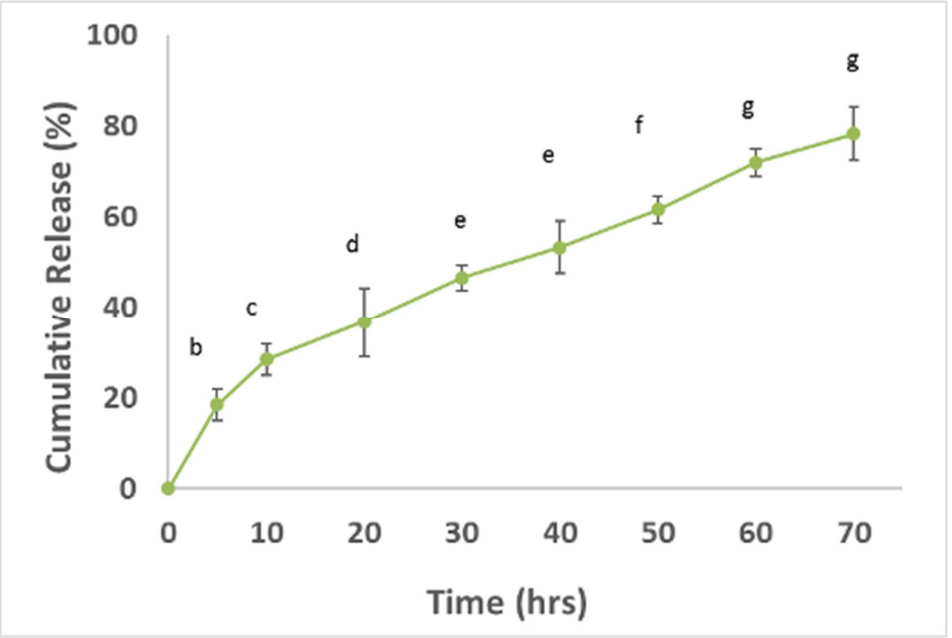
شکل (۱): تصویر میکروسکوپی نانوامولسیون کافئین

تعیین کارایی انکپسولاسیون:

مقدار کافئین محصور شده در نانوذرات با استفاده از اندازه‌گیری جذب، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و کارایی انکپسواسیون نانوامولسیون تولیدی ۰/۸ ± ۷۶/۱ درصد به دست آمد.

رهایش:

رهایش پایدار دارو برای تحویل سیستمیک آن بسیار مفید است. رهایش دارو از نانوامولسیون با برهمکنش دارو با سورفکتانت‌ها و توزیع آن بین فازهای آبی و روغنی کنترل می‌شود. رهاسازی آزمایشگاهی از نانوامولسیون بارگذاری شده با کافئین با استفاده از کیسه دیالیز انجام شد و الگوی رهاسازی دو فازی را نشان داد. کافئین در ابتدای آزمایش به‌صورت انفجاری آزاد شد و به دنبال آن، رهش پایدار بود. رهاسازی سریع کافئین به میزان ۱۸/۴۱ درصد از نانوامولسیون در ۵ ساعت اول آزمایش مشاهده شد. پس از ۵ ساعت، انتشار سرکوب شده کافئین مشاهده شد که نشان‌دهنده رهایش طولانی مدت کافئین از نانوامولسیون می‌باشد و پس از ۷۲ ساعت ۷۸/۳۳ درصد از کافئین رهاسازی شد که نشان‌دهنده حضور کافئین در داخل قطرات نانوامولسیون می‌باشد (نمودار ۱).



نمودار (۱): بررسی رهایش کافئین از نانوامولسیون در طول زمان

بررسی زنده‌مانی سلول‌های سرطانی بر اساس تست تریپان به لو:

زنده‌مانی سلول‌های سرطانی تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوامولسیون کافئین (NCAF) و کافئین آزاد (CAF) بعد از گذشت ۴۸ ساعت ارزیابی شد. نانوامولسیون کافئین در غلظت ۵±۳۶۳/۶۳ میکروگرم بر میلی لیتر توانست حدود ۵۰ درصد سلول‌های K562 را بکشد (IC50). هم‌چنین کافئین آزاد نیز در غلظت ۱/۲±۷۵۰/۰۲ میکروگرم بر میلی لیتر حدود ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی را کشته بود. نانوامولسیون کافئین و کافئین آزاد به‌صورت وابسته به غلظت باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی شدند اما این سمیت در گروه تحت تیمار با نانوامولسیون بیشتر بود (جدول ۱).

جدول (۱): بررسی زنده‌مانی سلول‌های سرطانی K562 بعد از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف کافئین آزاد و نانوامولسیون کافئین در مقایسه با گروه کنترل، حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده معناداری در سطح $p<0/05$ می‌باشد.

غلظت (ug/ml)	کافئین آزاد (درصد زنده‌مانی)	نانوامولسیون کافئین (درصد زنده‌مانی)
۰	^{A}۹۹/۵۱±۰/۵	^{A}۹۹/۰۹±۰/۴
۱۰۰	^{A}۹۱/۱۱±۳/۶	^{B}۷۰/۳۸±۵/۱
۲۰۰	^{B}۸۲/۰۷±۱/۵۴	^{C}۶۱/۰۹±۲/۵
۴۰۰	^{C}۷۳/۳۲±۱/۰۲	^{D}۴۴/۹۱±۵/۲
۶۰۰	^{D}۶۰/۸۴±۱/۳۶	^{E}۳۵/۰۱±۲/۵
۸۰۰	^{E}۴۴/۳۷±۴/۰۳	^{F}۲۵/۴±۵/۰۹
۱۰۰۰	^{F}۲۶/۰۳±۳/۰۹	^{G}۱۴/۱±۱/۳۴

بررسی توانایی زیستی سلول‌های سرطانی به روش نوترال رد:

نتایج حاصل از بررسی زنده‌مانی سلول‌های سرطانی تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوامولسیون کافئین و کافئین آزاد بعد از گذشت ۴۸ و ۲۴ ساعت به روش نوترال رد نیز نتایج مشابه تست تریپان به لو را نشان داد. نانوامولسیون کافئین در غلظت ۲± ۴۷۶/۱۹ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ۲۴ ساعت، در غلظت

۳۳۲/۴±۴/۱ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ۴۸ ساعت و همچنین کافئین آزاد در غلظت ۸۶۹/۵۶±۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ۲۴ ساعت، و در غلظت ۵۴۰/۵۴±۱ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ۴۸ ساعت، ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی را کشته بود (IC50) (جدول ۲). لذا می‌توان نتیجه گرفت که نانوامولسیون کافئین و کافئین آزاد وابسته به غلظت و زمان، دارای اثرات سمیت سلولی بوده و تکثیر سلول‌ها را کاهش می‌دهند اما این کاهش در گروه تحت تیمار با نانوامولسیون کافئین بیشتر از کافئین آزاد بود ($p<۰/۰۵$).

جدول (۲): ارزیابی سمیت سلولی غلظت‌های مختلف نانوامولسیون کافئین و کافئین آزاد به روش نوترال رد بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت، حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده معناداری در سطح ۰/۰۵ >**p**می‌باشد.

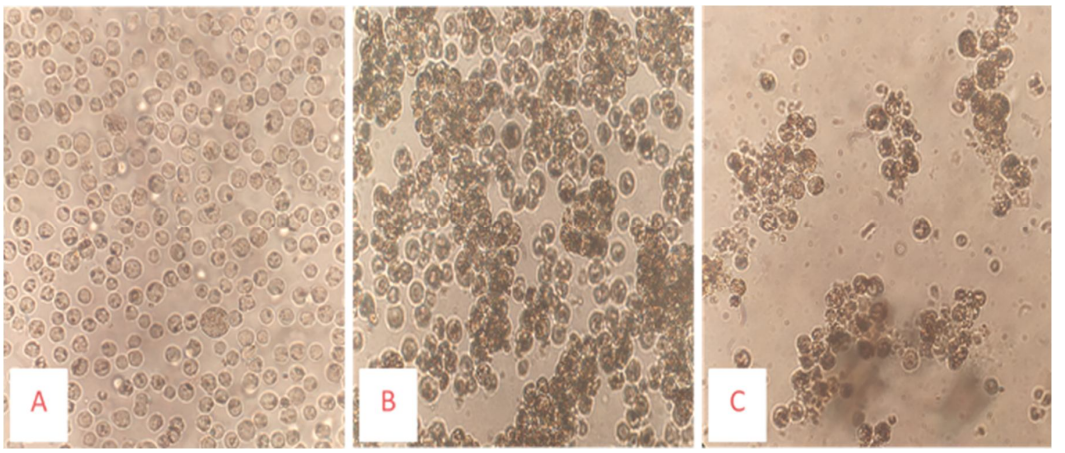
زمان	۲۴ ساعت (درصد زنده‌مانی)		۴۸ ساعت (درصد زنده‌مانی)	
غلظت (ug/ml)	کافئین آزاد	نانوامولسیون کافئین	کافئین آزاد	نانوامولسیون کافئین
۰	^{A}۹۹/۰۱±۰/۹	^{A}۹۹±۱/۰۲	^{A}۹۸/۳۱±۱/۱۵	^{A}۹۸±۱/۰۸
۱۰۰	^{A}۹۵/۲۱±۴/۳	^{B}۸۶/۱۶±۲/۸	^{A}۹۱/۳±۴/۱	^{B}۸۴/۲۱±۳/۸
۲۰۰	^{B}۸۹/۲۷±۰/۵۷	^{C}۷۵/۰۲±۳	^{B}۷۷/۲۱±۳/۶	^{C}۶۱/۲۳±۴/۳
۴۰۰	^{C}۷۹/۰۵±۲/۴	^{D}۵۸/۱۱±۲/۱	^{C}۶۳/۲۵±۲/۸	^{D}۴۰/۹۱±۲/۸
۶۰۰	^{D}۶۸/۹±۲/۳	^{E}۴۲/۳±۲/۵	^{D}۴۶/۱۶±۳/۴	^{E}۳۲/۲۷±۳/۰۵
۸۰۰	^{E}۵۴/۱۴±۰/۴۵	^{E}۳۴/۲±۳/۰۴	^{E}۳۵/۹±۳/۱	^{E}۲۴/۱±۴/۲
۱۰۰۰	^{F}۴۳/۲۳±۳/۵	^{F}۲۳/۹±۲/۲۱	^{F}۲۳/۳±۳/۵	^{E}۱۵/۱±۲/۹

جدول (۳): مقایسه مقادیر **IC50** (نیمه حداکثر غلظت بازدارندگی) به دست آمده در تست‌های مختلف

مقادیر IC50	24h نوترال رد	48h نوترال رد	48h تریپان به لو
کافئین آزاد ug/ml	۸۶۹/۵۶±۰/۵	۵۴۰/۵۴±۱	۷۵۰/۰۲±۱/۲
نانوامولسیون کافئین ug/ml	۴۷۶/۱۹ ±۲	۳۳۲/۴±۴/۱	۳۶۳/۶۳±۵

بررسی سلول‌های سرطانی از لحاظ ویژگی‌های رشد و ریخت شناسی:

همان طور که در تصاویر زیر مشاهده می‌شود، سلول‌های سرطانی گروه کنترل از سرعت رشد و تکثیر بسیار بالایی برخوردار بودند و تمامی سلول‌ها سالم و زنده بوده و هیچ‌گونه چروکیدگی یا تکه تکه شدن هسته و یا حباب‌های سیتوپلاسمی و سایر نشانه‌های آپوپتوز در آن‌ها مشاهده نشد. در گروه تحت تیمار با نانوامولسیون کافئین نسبت به گروه کنترل و گروه تحت تیمار با کافئین آزاد، رشد سلول‌ها به‌طور چشمگیری کاهش یافت. در هر دو گروه درمانی، اثراتی از مرگ سلولی آپوپتوتیک ازجمله چروکیدگی هسته و حباب‌های سیتوپلاسمی دیده شد که در گروه تحت تیمار با نانوامولسیون کافئین تغییرات ریخت شناسی سلولی به وضوح از گروه تحت تیمار با کافئین آزاد بیشتر بود و تعداد سلول‌های زنده به شدت کاهش یافته بود (شکل ۲).

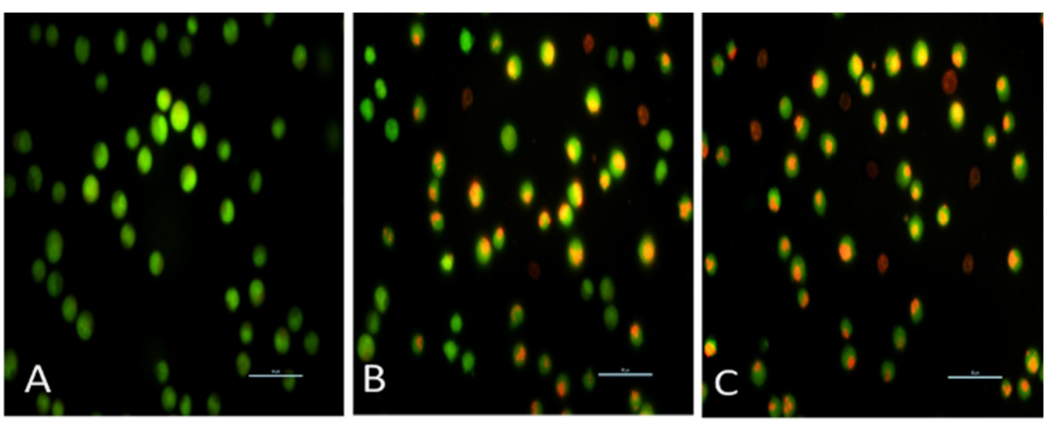


شکل (۲): تصاویر میکروسکوپی A. سلول K562 طبیعی بدون تیمار B. سلول‌های تیمار شده با غلظت IC50 کافئین آزاد C. سلول‌های تیمار شده با غلظت IC50 نانوامولسیون کافئین

نتایج تست آپوپتوز/نکروز:

با استفاده از تست رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ پروپیدیوم یداید به بررسی اینکه مرگ سلولی ناشی از کافئین، نشان‌دهنده آپوپتوز یا نکروز است و همچنین تفاوت در تعداد سلول‌های مرده به روش آپوپتوز یا نکروز در دو گروه نانوامولسیون کافئین و کافئین آزاد پرداخته شد. سلول‌ها با غلظت IC50 به دست آمده برای نانوامولسیون کافئین و کافئین آزاد به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و سپس با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که درصد سلول‌های آپوپتوز در کشت‌هایی که در معرض نانوامولسیون کافئین بودند به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت. و همچنین جمعیت سلول‌های نکروزه به‌طور هم‌زمان در کشت‌های در معرض نانوامولسیون کافئین افزایش یافت. نتایج نشان داد که درمان با نانوامولسیون کافئین باعث ایجاد هر دو حالت مرگ سلولی می‌شود، در درجه اول آپوپتوز، و تا حدی کمتر، نکروز. (شکل ۳).

سلول‌هایی که در مراحل اولیه‌ی آپوپتوز هستند، رنگ سبز به خود می‌گیرند و دارای نقاط سبز روشن در هسته می‌باشند که نشان‌دهنده‌ی متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته می‌باشد. سلول‌هایی که در مرحله‌ی آخر آپوپتوز هستند رنگ پروپیدیوم یداید را از خود عبور داده و رنگ نارنجی به خود می‌گیرند. سلول‌های نکروزی نیز رنگ پروپیدیوم یداید را از خود عبور می‌دهند و به رنگ نارنجی در می‌آیند با این تفاوت که کروماتین آن‌ها فشرده و تکه تکه نمی‌شوند.



شکل (۳): A. سلول K562 طبیعی بدون تیمار B. سلول‌های تیمار شده با غلظت IC50 کافئین آزاد C. سلول‌های تیمار شده با غلظت IC50 نانوامولسیون کافئین

بحث و نتیجه‌گیری

افزایش بروز و مرگ‌ومیر ناشی از سرطان‌ها، نشانه‌ای برای ادامه پیگیری و تحقیقات در زمینه پیشگیری، درمان و کشف ترکیبات ضد سرطانی جدید است. کافئین (۱، ۳، ۷ تری متیل گزانتین)، یک آلکالوئید پورین است که به‌طور طبیعی از گیاهان به دست می‌آید، در بسیاری از منابع غذایی به‌ویژه در نوشیدنی‌هایی مانند قهوه، چای و نوشابه‌ها وجود دارد و به‌عنوان ماده‌ای بی‌خطر و بدون عوارض نامطلوب برای سلامتی در صورت مصرف در حد اعتدال اثبات شده است (۲۱). مصرف کافئین برای کاهش خطر سرطان برای انواع خاصی از سرطان شناخته شده است (۲۲). کافئین دارای فعالیت ضد سرطانی قابل‌توجهی در برابر مدل‌های حیوانی و سلولی و کشت شده سرطان است. علاوه بر این، کافئین و مشتقات گزانتین مربوطه در شیمی‌درمانی تجربی نیز استفاده شده است. مطالعات مختلفی، اثرات ضد سرطانی مفید کافئین را در برابر مراحل مختلف توسعه سرطان نشان می‌دهند (۹).

هدف از این مطالعه، تولید نانوامولسیون کافئین و بررسی اثرات ضد سرطانی آن بر روی رده سلولی سرطان خون بود. نانوامولسیون کافئین با درصد انکپسولاسیون بالا و رهایش پایدار و کنترل شده، به روش امولسیون خود به خودی با موفقیت تولید شد. همان طور که اشاره شد، رهایش پایدار دارو برای تحویل سیستمیک و کارآمد آن بسیار مفید است. سپس به بررسی اثرات مهاری غلظت‌های مختلف نانوامولسیون کافئین بر روی رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی رده K562 پرداخته شد. به‌منظور مقایسه میزان تأثیر فرم انکپسوله در اثربخشی کافئین، غلظت‌های مختلف کافئین آزاد (فرم غیر انکپسوله شده) نیز بر روی سلول‌های سرطانی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج حاصل از تست‌های نوترال رد و تریپان به لو نشان‌دهنده کاهش زنده‌مانی سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوامولسیون کافئین و کافئین آزاد به‌صورت وابسته به غلظت و زمان بود به‌طوری که در تست نوترال رد، نانوامولسیون کافئین در غلظت ۲± ۴۷۶/۱۹ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ۲۴ ساعت و در غلظت ۴/۱±۳۳۲/۴ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ۴۸ ساعت ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی را کشته بود اما کافئین آزاد در غلظت ۵۶/۵±۸۶۹/۰ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ۲۴ ساعت، و در غلظت ۵۴±۵۴۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ۴۸ ساعت، توانست ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی را بکشد (IC50). هم‌چنین نتایج حاصل از تست تریپان به لو نیز نشان داد که نانوامولسیون کافئین نسبت به کافئین آزاد، دارای سمیت سلولی بیشتری بر روی سلول‌های سرطانی رده K562 می‌باشد.

Machado و همکاران در سال ۲۰۲۰ نتایج مشابهی را به دست آوردند این محققین با استفاده از تست نوترال رد به بررسی اثرات سایتوتوکسیک کافئین بر روی رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 به‌عنوان مدل‌هایی از سرطان پستان پرداختند. کاهش در زنده‌مانی سلول‌های سرطانی هر دو رده سلولی تحت تیمار با تمام غلظت‌های مورد آزمایش کافئین مشاهده شد و کافئین به‌صورت وابسته به غلظت باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی شد (۲۳). در مطالعه دیگری که توسط Liu و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام گرفت، نتایج نشان داد که کافئین، زنده‌مانی سلول‌های گلیوبلاستوما C6 و U87MG را به روشی وابسته به دوز کاهش می‌دهد و تکثیر سلول‌های گلیوبلاستوما با درمان کافئین سرکوب شد. همچنین نتایج نشان داد که کافئین، باعث القای آپوپتوز در سلول‌های گلیوبلاستوما شد و پس از درمان با کافئین، درصد سلول‌های آپوپتوز در سلول‌های C6 به‌طور قابل‌توجهی در مقایسه با سلول‌های سالم طبیعی افزایش یافت (۲۴).

در مطالعه‌ای که توسط تنکابنی و همکاران انجام شد ارتباط بین مقادیر مختلف کافئین با سرعت تکثیر رده سلولی سلول سنگفرشی سرطان مری انسان و همچنین رده‌ی سلولی HN5 سرطان سر و گردن انسان مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها نشان داد که کافئین در غلظت‌های ۲۰،۵۰،۷۰ میلی مولار اثرات مهاری قابل‌توجهی بر روی هر دو رده‌ی سلولی دارد. در نتیجه کافئین می‌تواند از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری کند و کاندید مناسبی برای کاربردهای درمانی باشد (۲۵).

Karita و همکاران از لیپوزوم‌های حاوی سیس پلاتین محصور شده با پلی اتیلن گلیکول به‌عنوان سیستم دارورسانی استفاده کردند و مشاهده کردند که در موش‌های مبتلا به استئوسارکوم که با نانوذرات درمان شدند، اثر ضد توموری لیپوزوم‌های حاوی سیس پلاتین، نه‌تنها با تجویز هم‌زمان کافئین، بلکه با افزایش دوز کافئین نیز بهبود یافت (۲۶). در مطالعه‌ای که توسط ضرابی و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام شد، تأثیر ضدسرطانی نانوذرات نیوزومی حاوی کافئین بر روی رده سلولی سرطانی سینه انسانی MCF-7 مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که تیمار سلول‌های سرطانی با غلظت‌های مختلف از کافئین نانو شده و کافئین آزاد نشان داد که نانوکافئین، توانایی مهار تکثیر سلول‌های سرطانی را بیشتر از کافئین آزاد دارد. و غلظت ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوذرات حاوی کافئین تأثیر بیشتری بر روی کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی داشته است (۲۷) که این نتایج در راستای نتایج مطالعه ما بود.

در تحقیق حاضر، نتایج حاصل از مطالعه مورفولوژی و ویژگی‌های ریخت شناسی سلول‌های سرطانی و مورفولوژی هسته

سلول‌های سرطانی تحت تیمار، با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس نشان داد که درصد سلول‌های آپوپتوتیک و نکروزه در کشت‌هایی که در معرض کافئین آزاد و نانوامولسیون کافئین بودند نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. منتهی این افزایش در گروه تحت تیمار با نانوامولسیون کافئین نسبت به کافئین آزاد به‌طور قابل‌توجهی بیشتر بود. همچنین مطالعات نشان می‌دهند که کافئین از طریق کاهش تکثیر سلولی و القا آپوپتوز می‌تواند اثرات ضد سرطانی به‌خصوص در لوسمی داشته باشد. کافئین و اسیدکافئیک موجود در دانه‌های قهوه با تأثیر بر سلول‌های سرطانی، کاهش تقسیم سلولی و افزایش مرگ سلولی در ناحیه‌ی تومور به کمک داروهای شیمی‌درمانی مانند تاموکسیفن آمده و در روند بهبودی بیماران، مؤثر واقع می‌شود (۲۸). کافئین با خواص آنتی اکسیدانی قوی خود می‌تواند مانع از ایجاد ضررهای اکسیداتیو وارده بر DNA شود. اکسید کننده‌ها به اشکال گوناگون وجود دارند که معروف‌ترین و خطرناک‌ترین آن‌ها رادیکال‌های آزاد هستند. کافئین با تخریب رادیکال‌های آزاد باعث پیشگیری از سرطان می‌شود. همچنین می‌تواند باعث تعدیل آپوپتوز سلولی شده و عمل نقاط وارسی را نیز در سلول نظم بخشد (۲۹).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درمان با نانوامولسیون کافئین باعث ایجاد دو حالت مرگ سلولی، در درجه اول آپوپتوز، و تا حدی کمتر، نکروز در سلول‌های سرطانی می‌شود. در مطالعه‌ای که توسط Chen و همکاران انجام شد، اثرات کافئین آزاد شده از نانوذرات ژلاتین زیست تخریب‌پذیر بر روی سلول‌های ملانوما B16F10 و سلول‌های فیبروبلاست L929 مورد بررسی قرار گرفت، داده‌های حاصل از سنجش سلولی نشان داد که کافئین از تکثیر سلولی، زنده ماندن و مهاجرت سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند و باعث مرگ آپوپتوتیک سلول‌های ملانوم B16 می‌شود. اما بر روی سلول‌های فیبروبلاست L929، سمیت سلولی بسیار کمتری را نسبت به سلول‌های ملانوم B16 نشان داد. این نتایج ثابت می‌کند که نانوذرات ژلاتین حاوی کافئین به‌طور مؤثر و انتخابی آپوپتوز سلول‌های سرطانی ملانوم B16F10 را بدون ایجاد اثرات مضر بر سلول‌های طبیعی فیبروبلاست L929 القا می‌کند (۳۰).

در دهه گذشته، توسعه نوظهور نانوپزشکی، کاربرد سریع آن را در راهبردهای متعدد برای درمان بیماری‌های مخرب که هنوز غیرقابل درمان هستند، تشویق کرده است (۳۱). در حال حاضر، پیشرفت‌های فن‌آوری فوق‌العاده‌ای که در طراحی و تولید سیستم‌های نانوذرات برای درمان سرطان به‌دست آمده است، نانوحامل‌های کارایی را به‌وجود آورده است که عوارض جانبی مرتبط با درمان‌های کلاسیک ضد سرطان را کاهش داده و نرخ بقای بیماران را نیز افزایش می‌دهند (۳۲). تولید واکسن‌های سرطانی بر پایه نانوذرات، باعث توسعه بسیار عالی در کارایی واکسن‌های سرطانی شده است (۳۳). نانوامولسیون یکی از بزرگ‌ترین و سودمندترین اشکال دارویی با کاربرد نانوتکنولوژی در فرمولاسیون‌های دارویی است. قطرات بسیار کوچک نانوامولسیون، به جذب بهتر دارو و هدف‌گیری کمک می‌کند و باعث می‌شود بتوان داروها را با فراهمی زیستی بهتر و دوز دقیق‌تر که حداقل عوارض جانبی را به همراه داشته باشند، طراحی نمود (۳۴).

نتایج تحقیق حاضر، حاکی از کاهش زنده‌مانی و القای آپوپتوز در سلول‌های K562 به‌عنوان رده سلولی سرطان لوسمی میلوئید مزمن، بعد از قرار گرفتن در معرض نانوامولسیون کافئین بود. نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان نانوامولسیون کافئین را به‌عنوان روشی کمکی، در کنار سایر روش‌های درمانی، در درمان سرطان خون و حتی سایر سرطان‌ها پیشنهاد داد. یکی از معضلات حال حاضر در درمان سرطان، تحویل هدفمند دارو یا مواد طبیعی توکسیک به سلولهای سرطانی است تا با کمترین آسیب به سلولهای سالم، فقط سلولهای سرطانی در معرض مواد توکسیک قرار بگیرند که با استفاده از فناوری نانو، می‌توان به این هدف دست یافت. البته استفاده از نانوامولسیون کافئین نیاز به مطالعات بیشتر در مدل‌های حیوانی و کارآزمایی‌های بالینی به‌منظور تأیید اثربخشی آن در درمان لوسمی میلوئید مزمن دارد و همچنین می‌توان از نانوامولسیون کافئین به‌منظور ارزیابی اثرات ضدسرطانی آن بر روی سایر رده‌های سلولی سرطانی نیز استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد پژوهشگر است. نویسندگان از مسئول آزمایشگاه ایمنی‌شناسی دانشکده دامپزشکی جناب آقای مهندس علیاری کمال تشکر را دارند.

حمایت مالی

این مطالعه تحت حمایت مالی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام گرفته است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

ملاحظات اخلاقی

این طرح در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه ارومیه مطرح و تصویب گردیده است (IR-UU-AEC-3/10).

References:

1. Weiderpass E, Stewart BW. World cancer report. Int Agency Res Cancer 2020.
2. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 2003;348(6):518-27. https://doi.org/10.1056/NEJMoa021641
3. Wild C. World cancer report 2014. Wild CP, Stewart BW, editors. Geneva, Switzerland: WHO; 2014.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA Cancer J Clin 2019;69(1):7-34. https://doi.org/10.3322/caac.21332
5. Ochi Y. Genetic landscape of chronic myeloid leukemia. Int J Hematol 2023;117(1):30-6. https://doi.org/10.1007/s12185-022-03510-w
6. Hehlmann R. Chronic Myeloid Leukemia in 2020. Hemasphere 2020;4(5):e468. https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000468
7. Bispo JAB, Pinheiro PS, Kobetz EK. Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. Csh Perspect Med 2020;10(6). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034819
8. Cui WQ, Wang ST, Pan D, Chang B, Sang LX. Caffeine and its main targets of colorectal cancer. World J Gastrointest Oncol 2020;12(2):149. https://doi.org/10.4251/wjgo.v12.i2.149
9. Osarieme ED, Modupe DT, Oluchukwu OP. The Anticancer Activity of Caffeine-A Review. Arch. Med. Res. 2019;3(5):326-42.
10. Khan F, Pham DTN, Oloketuyi SF, Manivasagan P, Oh J, Kim YM. Chitosan and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria. Colloids Surf B 2020;185:110627. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110627
11. Osarieme ED, Modupe DT, Oluchukwu OP. The Anticancer Activity of Caffeine-A Review. Arch Clin Biomed Res 2019;3(5):326-42.
12. Khan F, Khan MM, Kim YM. Recent progress and future perspectives of antibiofilm drugs immobilized on nanomaterials. Curr Pharm Biotechnol 2018;19(8):631-43. https://doi.org/10.2174/1389201019666180828090052
13. Guglielmini G. Nanostructured novel carrier for topical application. Clin Dermatol 2008;26(4):341-6. https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.05.004
14. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. Nat Biotechnol 2015;33(9):941-51. https://doi.org/10.1038/nbt.3330
15. Zhang Y, Shang Z, Gao C, Du M, Xu S, Song H, et al. Nanoemulsion for solubilization, stabilization, and in vitro release of pterostilbene for oral delivery. AAPS Pharm Sci Tech 2014;15(4):1000-8. https://doi.org/10.1208/s12249-014-0129-4
16. He Z, Ma WY, Hashimoto T, Bode AM, Yang CS, Dong Z. Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. Cancer Res 2003;63(15):4396-401.
17. Marret S, Gressens P, Van-Maele-Fabry G, Picard J, Evrard P. Caffeine-induced disturbances of early neurogenesis in whole mouse embryo cultures. Brain Res 1997;773(1-2):213-6. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00938-4
18. Bode AM, Dong Z. The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. Cancer Lett 2007;247(1):26-39. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.03.032
19. Ostertag F, Weiss J, and McClements D.J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. J. Colloid Interface Sci 2012; 388(1): 95-102. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.07.089

20. Al-Khedhairy, A.A.;Wahab, R. Size-Dependent Cytotoxic and Molecular Study of the Use of Gold Nanoparticles against Liver Cancer Cells. Appl Sci 2022;12:901. https://doi.org/10.3390/app12020901
21. Heckman MA, Weil J, Gonzalez de Mejia E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. J Food Sci 2010;75(3):R77-87. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01561.x
22. Wang G, Bhoopalan V, Wang D, Wang L, Xu X. The effect of caffeine on cisplatin-induced apoptosis of lung cancer cells. Exp Hematol Oncol 2015;4:5. https://doi.org/10.1186/2162-3619-4-5
23. Machado KL, Marinello PC, Silva TNX, Silva CFN, Luiz RC, Cecchini R, et al. Oxidative Stress in Caffeine Action on the Proliferation and Death of Human Breast Cancer Cells MCF-7 and MDA-MB-231. Nutr Cancer 2021;73(8):1378-88. https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1795693
24. Liu JD, Song LJ, Yan DJ, Feng YY, Zang YG, Yang Y. Caffeine inhibits the growth of glioblastomas through activating the caspase-3 signaling pathway in vitro. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2015;19(16):3080-8.
25. Tonkaboni A, Lotfibakhshaiesh N, Danesh P, Tajerian R, Ziaei H. Evaluation of Inhibitory Effects of Caffeine on Human Carcinoma Cells. Nutr Cancer 2021;73(10):1998-2002. https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1819344
26. Karita M, Tsuchiya H, Kawahara M, Kasaoka S, Tomita K. The antitumor effect of liposome-encapsulated cisplatin on rat osteosarcoma and its enhancement by caffeine. Anticancer Res 2008;28(3A):1449-57.
27. Zahrabi NZ, Tabaie SM, Jahanshiri M. Study of Cytotoxic Effects of Caffeine- Loaded Niosomes on Human Breast Cancer Cells MCF-7. JSUMS. 2021;28(5):663-74.
28. Oh JK, Sandin S, Ström P, Löf M, Adami HO, Weiderpass E. Prospective study of breast cancer in relation to coffee, tea and caffeine in Sweden. Int J Cancer 2015;137(8):1979-89. https://doi.org/10.1002/ijc.29569
29. Rosendahl AH, Perks CM, Zeng L, Markkula A, Simonsson M, Rose C, Ingvar C, Holly JM, Jernström H. Caffeine and caffeic acid inhibit growth and modify estrogen receptor and insulin-like growth factor I receptor levels in human breast cancer. Clin Cancer Res. 2015 Apr 15;21(8):1877-87. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1748
30. Chen P-R, Chuang Y-J. Study of Caffeine-Loaded Gelatin Nanoparticles for Treatment of Melanoma and Fibroblast Cells. Lett Appl NanoBioSci 2020:4243-4254. https://doi.org/10.33263/LIANBS114.42434254
31. Pelaz B, Alexiou C, Alvarez-Puebla RA, Alves F, Andrews AM, Ashraf S, Balogh LP, Ballerini L, Bestetti A, Brendel C, Bosi S. Diverse applications of nanomedicine. ACS Nano 2017;11(3):2313-81. https://doi.org/10.1021/acsnano.6b06040
32. Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. Nat Rev Cancer 2002;2(10):750-63. https://doi.org/10.1038/nrc903
33. Sheikhzadeh S, Delirezh N, Hobbenaghi R. Mannosylated polylactic-co-glycolic acid (MN-PLGA) nanoparticles induce potent anti-tumor immunity in murine model of breast cancer. Biomed Pharmacother 2021;142:111962. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111962
34. Sutradhar K, Amin M. Nanoemulsions: Increasing possibilities in drug delivery. Eur J Nanomed 2013;5:97-110. https://doi.org/10.1515/ejnm-2013-0001

Original Article

ANTICANCER EFFECTS OF CAFFEINE NANOEMULSIONS ON CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Ayoob Amirizadeh[1], Sanaz Sheikhzadeh[2], Nowruz Delirezh[3]*

Received: 02 Auguest, 2023; Accepted: 09 December, 2023

Abstract

Background & Aims: Caffeine, a natural substance found in coffee and tea, can have anticancer effects by reducing cell proliferation and inducing apoptosis. On the other hand, nanocarriers can be used as a suitable method for properly delivering drugs at the tumor site, protecting drugs, targeting specific organs, and high durability. This study aimed to produce caffeine nanoemulsions and evaluate its anticancer effects on leukemia cells.

Materials & Methods: In this experimental study after producing caffeine nanoemulsion and evaluating its physicochemical properties, K562 cancer cells were treated with different concentrations of these caffeine nanoemulsions and free caffeine, and then, the viability of cancer cells was determined using Neutral Red and Trypan Blue methods. The AO/PI test was also used to evaluate the rate of apoptosis and necrosis. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's test using SPSS v.16 software.

Results: The results showed that the decrease in the viability of cells treated with different concentrations of caffeine nanoemulsion and free caffeine was both concentration- and time-dependent, and caffeine nanoemulsion has more cytotoxic effects on cancer cells than free caffeine. The results also showed that caffeine nanoemulsion caused more apoptosis-type cell death in treated cancer cells.

***Conclusion*:** The present study indicated a decrease in the viability and induction of apoptosis in K562 cells as a chronic myeloid leukemia cancer cell line after exposure to caffeine nanoemulsion, and caffeine nanoemulsion can be suggested as an adjuvant therapy along with other treatments for the treatment of chronic myeloid leukemia cancer.

Keywords: Anti-Proliferation, Apoptosis, Caffeine, Chronic Myeloid Leukemia, Nanoemulsion

Address: Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
Tel: +984431942562
Email: s.sheikhzadeh@urmia.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2023: 34(9): 564 ISSN: 2717-008X

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

[1] *M.sc in Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*
[2] *Assistant Professor of Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)*
[3] *Professor of Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*