

ارزیابی اثر نانوحامل های نیوزومی حاوی اسانس رزماری (*Rosmarinus officinalis*) بر میزان بقای رده سلولی KG-1 سرطان لوسمی میلوئیدی حاد

نجمه سلطانی^۱، نرگس نیکو نهاد لطف‌آبادی^{۱*}

(۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علم و هنر، یزد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۴

چکیده

مقدمه: استفاده از فناوری نانو در انتقال دارو به سلول ها می تواند برخی از مشکلات پیشروی رسانش داروهای گیاهی از جمله غیر هدفمند بودن و اکسیدپذیری بالا را تا حدودی برطرف نماید. از این رو در این مطالعه نانوسامانه های نیوزومی حاوی اسانس رزماری به منظور بهبود شاخصه های فیزیکوشیمیایی و افزایش ویژگی های ضد توموری آن مورد بررسی قرار گرفته شده است.

مواد و روش ها: وزیکول های نیوزومی با استفاده از tween 60، کلسترول و PEG با روش فیلم نازک تهیه شده و اسانس رزماری درون نیوزوم ها بارگذاری شد. بررسی شاخصه های فیزیکوشیمیایی آن ها با استفاده از دستگاه های زتا سایزر، FTIR، SEM، انجام و الگوی رهائش اسانس در دمای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد محاسبه گردید. در پایان میزان سمیت این نانوسامانه حاوی اسانس بر رده سلولی KG-1 سرطان مغز استخوان مورد بررسی قرار گرفته است.

یافته های پژوهش: نتایج پژوهش نشان می دهد که نانوسامانه های حاوی اسانس با راندمان انکپسولاسیون ۸۶/۷۵ درصد، اندازه ۷۳/۶ nm و پتانسیل زتای ۴۵/۴۶ mV- دارای مورفولوژی کروی، موقعیت مناسب اسانس در نانوسامانه، رهائش کنترل شده در دمای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد است. هم چنین نتایج سمیت این نانوسامانه اسانس دار نشان می دهد که اسانس نیوزومه شده نسبت به اسانس آزاد دارای سمیت بالاتری بر رده سلولی KG-1 می باشد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این بررسی ضمن تأیید روش مورد استفاده جهت سنتز نیوزوم، کاربرد نیوزوم به عنوان یک حامل کارآمد در درونگیری اسانس و آهسته رهش بودن آن، نشان می دهد که این نانوسامانه بدون ایجاد تغییر در ماهیت شیمیایی اسانس، سبب افزایش پایداری آن شده است و می تواند حاملی مناسب جهت رسانش اسانس رزماری به سلول های KG-1 و اعمال اثرات آن بر سلول ها باشد.

واژه های کلیدی: رزماری، نیوزوم، نانوحامل، رده سلولی KG-1

* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علم و هنر، یزد، ایران

Email: nikounahad_1976@yahoo.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

سرطان خون یکی از سه بدخیمی شایع در میان کودکان است که معمولاً از مغز استخوان شروع شده و در اثر تکثیر ناقص گلبول های سفید و پیش سازهای آن، تعداد زیادی گلبول های سفید غیرطبیعی و تکامل نیافته در خون و مغز استخوان تولید می شود. سن، جنس، قرار گرفتن در معرض پرتوهای خطرناک، ژنتیک و غیره، از جمله فاکتورهای موثر برای ابتلا به این بدخیمی کشنده است. به منظور درمان سرطان خون معمولاً از سه روش شیمی درمانی، پرتو درمانی و پیوند مغز استخوان استفاده می شود که در بین آن ها، شیمی درمانی از جایگاه ویژه ای برخوردار است، ولی استفاده از آن عوارض جانبی زیادی به دنبال دارد که باعث کاهش کیفیت زندگی مبتلایان به سرطان می شود(۱). از این رو پژوهشگران سرطان به دنبال یافتن ترکیبات ضد توموری دیگری از جمله ترکیبات گیاهی هستند تا بتوانند عوارض ناشی از کاربرد شیمی درمانی را به حداقل برسانند(۲). امروزه گیاهان دارویی و مشتقات آن ها، تجویز داروهای گیاهی در کشورهای صنعتی پیشرفته ۲۰ درصد و در کشورهای در حال توسعه، ۸۰ درصد را به خود اختصاص می دهند. بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، ۸۰ درصد مردم جهان برای مراقبت های اولیه بهداشتی ترجیح می دهند از عصاره های گیاهی یا مواد موثره آن ها استفاده نمایند(۳). گیاه رزماری، گیاهی پایا، بسیار معطر و دارای ساقه های چوبی به ارتفاع ۵۰-۱۰۰ cm و برگ های سبز دائمی است که به صورت خودرو در مناطق مدیترانه ای مخصوصاً در نواحی ساحلی آن تا آسیای صغیر می روید(۴) و ترکیبات تشکیل دهنده اسانس آن، اثرات آنتی باکتریال، ضد قارچی و آنتی اکسیدانی ویژه ای به آن می دهند(۵). پژوهشگران دریافته اند که ترکیبات گیاهی علاوه بر این که دارای فعالیت ضد توموری می باشند، عوارض جانبی کمتری نسبت به روش های معمول درمان سرطان داشته و هزینه های درمانی آن نیز بسیار پایین می باشد(۶). در مطالعه ای در سال ۲۰۱۶ نشان داده شده است که عصاره رزماری در سلول های سرطان ریه سبب مهار تکثیر، سرکوب بقاء کلونوژنیکو افزایش مرگ سلولی برنامه ریزی

شده می گردد(۷). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۷ انجام شده است مشخص شده که عصاره رزماری می تواند از طریق افزایش گونه های اکسیژن فعال در سلول های سرطان کولون، سبب القای اثرات مهاری بر تکثیر سلول های سرطانی شود(۸). در سال ۲۰۱۷ محققین نشان دادند که عصاره رزماری از طریق ایجاد تعادل در استرس اکسیداتیو در سلول ها سبب حفاظت شیمیایی آن ها شده و می تواند در سلول های سرطان کبد سبب مهار تکثیر و کاهش بقا گردد(۹). با وجود تمامی این مزایا، کاربرد اسانس و ترکیبات گیاهی با چالش های جدی از جمله، اثرگذاری نامطلوب بر ارگان های غیر هدف و اکسید شدن برخی از مواد موثره اسانس ها، روبرو است. در این میان فناوری نانو با ساخت و تهیه نانو حامل های دارویی از جمله لیپوزوم و نیوزوم توانسته است بسیاری از مشکلات یاد شده را کاهش داده و یا برطرف نماید(۱۰،۱۱). نیوزوم ها ترکیبات کلوئیدی هستند که از خود تجمعی سورفاکتانت های غیریونی در محیط آبی تشکیل می شوند و ایجاد ساختاری لایه لایه می کنند. از آن جا که این ساختار دارای هر دو حالت آبدوست و آبگریز می باشد بنا بر این دارای ظرفیت به دام انداختن ترکیبات با حلالیت متفاوت می باشند. زیست تخریب پذیری، زیست سازگاری، غیرسمی بودن و محصور کردن مقدار زیادی از مواد در حجم نسبتاً کم از جمله مزایای استفاده از نیوزوم به عنوان حاملی مناسب جهت رسانش دارو به سلول ها است(۱۲-۱۵). با توجه به کاربردهای گسترده درمانی اسانس رزماری و اثرات آنتی اکسیدانی و ضد توموری آن، هدف پژوهش حاضر، طراحی، ساخت و بررسی نانونیوزوم های حاوی اسانس رزماری و ارزیابی سمیت این نانوسامانه بر رده سلولی KG-1 لوسمی میلوئیدی حاد است.

مواد و روش ها

اسانس گیری از گیاه رزماری: گیاه رزماری تهیه شده در شرایط مناسب دمایی و دور از نور خورشید خشک شده، و سپس با استفاده از دستگاه کلونجر عمل اسانس گیری از برگ های گیاه انجام شد. در پایان، اسانس تولید شده، از دستگاه کلونجر خارج و برای انجام مراحل بعدی جمع آوری گردید(۱۶).

رسم نمودار استاندارد اسانس رزماری در ایزوپروپیل و بافر *PBS (Phosphate Buffered Saline)* در این مرحله سری رقت های مختلف اسانس رزماری در حلال ایزوپروپیل و سری رقت های مختلف اسانس رزماری در *PBS* تهیه گردید. سپس به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر، میزان جذب هر یک از رقت ها اندازه گیری شد. آزمایش در این مرحله سه مرتبه تکرار گردید و در ادامه با استفاده از طول موج های جذبی به دست آمده، نمودار استاندارد اسانس رزماری در ایزوپروپیل و نمودار استاندارد اسانس رزماری در *PBS* رسم گردید (۱۶).

تهیه نیوزوم حاوی اسانس رزماری: نیوزوم های حاوی اسانس رزماری به روش آب پوشانی لایه نازک و با ترکیبی شامل Tween60، کلسترول، پلی اتیلن گلیکول به ترتیب با نسبت های مولی ۶۵، ۳۰ و ۵ درصد و اسانس رزماری با غلظت ۰/۵ mg/ml تهیه گردید. فیلم نازک لیپیدی به دست آمده، با افزودن بافر *PBS* طی مدت یک ساعت و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد هیدراته گردید. سپس نانوذرات تهیه شده، با استفاده از سونیکیت حمامی برای مدت ۶۰ دقیقه کاهش سایز داده شد (۱۰، ۱۶).

تعیین درصد بارگذاری اسانس در نیوزوم: پس از کاهش سایز، اسانس آزاد و انکپسوله نشده با استفاده از روش دیالیز حذف گردید. سپس نیوزوم های ساخته شده با ایزوپروپیل مخلوط گردید تا دیواره لیپیدی نیوزوم شکسته شده و اسانس رزماری آزاد گردد. در مرحله بعد میزان جذب اسانس انکپسوله شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ماکزیمم اسانس رزماری که در مراحل قبلی تعیین گردیده بود محاسبه شد. در پایان با استفاده از نمودار استاندارد اسانس رزماری در ایزوپروپیل، و رابطه زیر، درصد لود اسانس در نیوزوم محاسبه گردید (۱۶).

تعیین اندازه نانوذرات و پتانسیل زتا: محدوده توزیع اندازه ذرات و هم چنین پیک اندازه ذرات با استفاده از دستگاه تفرق دینامیکی نور (DLS) تعیین می شود که بدین منظور از دستگاه نانو سائزر Brookhaven Instruments Corp استفاده گردید. میزان بار سطحی و پتانسیل زتا نانونیوزوم های حامل دارو نیز با استفاده از دستگاه

زتا سائزر شرکت Brookhaven Instruments Corp در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. برای تعیین بار سطحی به ۱۵۰۰ μL با غلظت ۰/۱ mg/ml نیاز است. تصویر برداری از نانونیوزوم ها: از نانونیوزوم ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning electron microscope) به منظور بررسی شکل و ساختار نانونیوزوم های تولیدی حامل دارو تصویربرداری شد (از نمونه با غلظت ۰/۱ mg/ml یک قطره روی لام ریخته و می گذاریم خشک شود سپس اپراتور، روی نمونه، پوشش طلا داده و تصویر تهیه می گردد).

آنالیز نانونیوزوم سنتز شده توسط دستگاه طیف سنجی مادون قرمز: گروه های عاملی سطح نانونیوزوم های تولید شده توسط آنالیز طیف سنجی زیر (مادون) قرمز (IR) بررسی گردید. در طیف زیر قرمز عمدتاً دو ناحیه مورد توجه است. ناحیه گروه عاملی از 1550 تا 4000 cm^{-1} ناحیه ای است که بیشتر کشش های پیوندی اتفاق می افتد. این ناحیه معمولاً تعداد نسبتاً کمی پیک دارند. اما بسیاری از پیک های آن مشخص کننده گروه های عاملی هستند.

بررسی روند رهایش دارو: به منظور شبیه سازی رهایش دارو از حامل در محیط *in vivo*، از *PBS* و دمای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد استفاده شد، تا بتوان شرایط سینک درون تنی را برقرار ساخت. در ادامه مقدار ۱ mL از محلول نیوزومی حاوی اسانس رزماری درون کیسه دیالیز ریخته شد. سپس با قرار دادن کیسه دیالیز درون یک محیط ایزوله (فالكون استریل و بسته) با تنظیمات یاد شده استیرر شد. نمونه برداری از محیط اطراف کیسه دیالیز در زمان های مشخص صورت پذیرفت. در انتها با بهره گیری از معادله کالیبراسیون اسانس رزماری در بافر *PBS* نسبت به محاسبه غلظت های آزاد شده دارو در دماهای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد و نسبت به تغییرات pH های ۷/۴ و ۵/۴ در زمان های مختلف اقدام شده و نمودار آن نیز رسم گردید.

رده سلولی و محیط کشت: این مطالعه در محیط آزمایشگاه و با استفاده از رده سلولی متعلق به سرطان لوسمی میلوئیدی حاد (KG-1) انجام شد. رده سلولی KG-1 از بانک سلولی انستیتو پاستور (تهران،

ایران) تهیه شد. سلول های این رده سلولی در فلاسک های یک بار مصرف کشت سلول در محیط کشت RPMI-1640، ۱۰ درصد FBS، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با فشار ۵ درصد از CO₂ و ۹۵ درصد بخار آب کشت داده شد.

تعیین سمیت سلولی و زنده مانی سلول: سمیت سلولی با استفاده از روش MTT برای فرمولاسیون مطالعه شده ارزیابی گردید. به منظور اندازه گیری سمیت، سلول های KG-1 به طور جداگانه با غلظت ۱۰^۴ در هر چاهک در پلیت ۹۶ تایی به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس سلول ها با حجم یکسانی از محیط کشت تازه تیمار شدند و غلظت های متفاوتی از اسانس آزاد و نیوزوم حاوی اسانس (۷/۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به صورت چهار بار تکرار در چاهک ها تزریق شدند. پس از ۴۸ ساعت، سپس میزان ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر به هر چاهک اضافه و به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. بعد از آن مایع رویی خارج شد و ۱۵۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه گردید. در هر مرحله برای خارج کردن مایع رویی، سانتریفیوژ صورت گرفت. جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از میکروپلیت ریدر ثبت و در نهایت با توجه به رابطه زیر درصد زنده مانی سلول ها محاسبه شد.

۱۰۰٪ میانگین جذب نوری در محیط کشت-میانگین جذب نوری در گروه آزمون = درصد زنده مانی میانگین جذب نوری در محیط کشت-میانگین جذب نوری در گروه کنترل

آنالیز آماری: برای بررسی آماری نتایج از نرم افزار SPSS و روش t-test استفاده شد و معناداری نتایج بر حسب P<0.05 سنجیده شد.

یافته های پژوهش

راندمان انکپسولاسیون و بررسی پروفایل رهائش اسانس: میزان بارگذاری اسانس در سامانه های نیوزومی ۸۶/۷۵ درصد محاسبه شد. رهائش اسانس رزماری در دماهای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد و به ترتیب با pH های ۷/۴ و ۵/۴ مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی الگوی رهائش نشان می دهد که رهائش اسانس در طی ۴۸ ساعت در هر دو دما کنترل شده و آهسته رهش است و حداکثر رهائش در دمای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد به ترتیب، ۴۵/۷۳ و ۵۱/۸ درصد می باشد.

اندازه و بار سطحی نانوسامانه های نیوزومی: نتایج حاصل از دستگاه زتا سایزر نشان می دهد که اندازه و پتانسیل زتای نانوسامانه های حاوی اسانس رزماری به ترتیب، ۷۳/۶±۰/۲۴۶ nm و ۴۵/۴۶±۰/۲۲ میلی ولت می باشد. این در حالی است که شاخص های فوق برای نانوسامانه نیوزومی فاقد اسانس به ترتیب ۳۰/۷±۰/۰۴۶nm و ۴۶/۳±۰/۸۳ میلی ولت بوده است. این مقایسه نشان می دهد که در اثر بارگذاری اسانس، اندازه نانوحامل افزایش و پتانسیل زتای آن کاهش یافته است.

نتایج حاصل از بررسی طیف مادون قرمز: در طیف FTIR اسانس رزماری (تصویر ۱-A)، پیک های شاخص مربوط به ترکیبات موجود در اسانس از جمله پیک ۱۶۴۰/۷۴ cm⁻¹ (مربوط به پیوند کتونی (کششی C=O) در ساختار 3-Octanone یا الکنی (C=C کششی) در ساختار α-Pinene، Camphene، Thuja-2,4(10)-diene و β-Pinene)، ۲۰۱۳/۴cm⁻¹ (پیوند آروماتیک (C-H) در ساختار Thymol، p-cymen- α-ol و o-Cymene) مشاهده می شود. هم چنین در طیف FTIR سامانه نیوزومی دارای اسانس (تصویر ۱-B)، پیک های شاخص مربوط به گروه های عاملی متعلق به ترکیبات تشکیل دهنده نیوزوم از جمله پیک ۱۰۵۴/۰۹ cm⁻¹ (مربوط به یکی از دو پیوند الکی C-O کششی) در ساختار Cholestrol و Span 60 یا آمینی (C-N کششی) در ساختار Polyethylene Glycol دیده می شود. از طرفی در طیف FTIR سامانه نیوزومی حاوی اسانس پیک های ۲۰۲۳/۱۷cm⁻¹ و ۳۳۴۷/۸۶cm⁻¹ به ترتیب با پیک های ۲۰۱۳/۴۰cm⁻¹ و ۳۳۱۲/۲۰cm⁻¹ در طیف FTIR اسانس متناظر است. بنا بر این با مقایسه طیف FTIR اسانس و سامانه دارای اسانس، مشخص می شود که پیک جدیدی در طیف FTIR سامانه دارای اسانس ایجاد نشده است که این موضوع دلالت بر جایگیری مناسب اسانس درون نانوسامانه نیوزومی و عدم برهمکنش میان اسانس و نانوسامانه دارد.

نتایج میکروسکوپ الکترونی: با توجه به تصویر میکروسکوپ الکترونی مشخص می شود که نانوذرات

سنتز شده که به صورت توده‌ای و کروی شکل بوده و دارای اندازه ای حدود $۷۳/۶$ نانومتر می باشند که تقریباً موید مقدار اندازه حاصل از نتایج DLS است (تصویر شماره ۲).

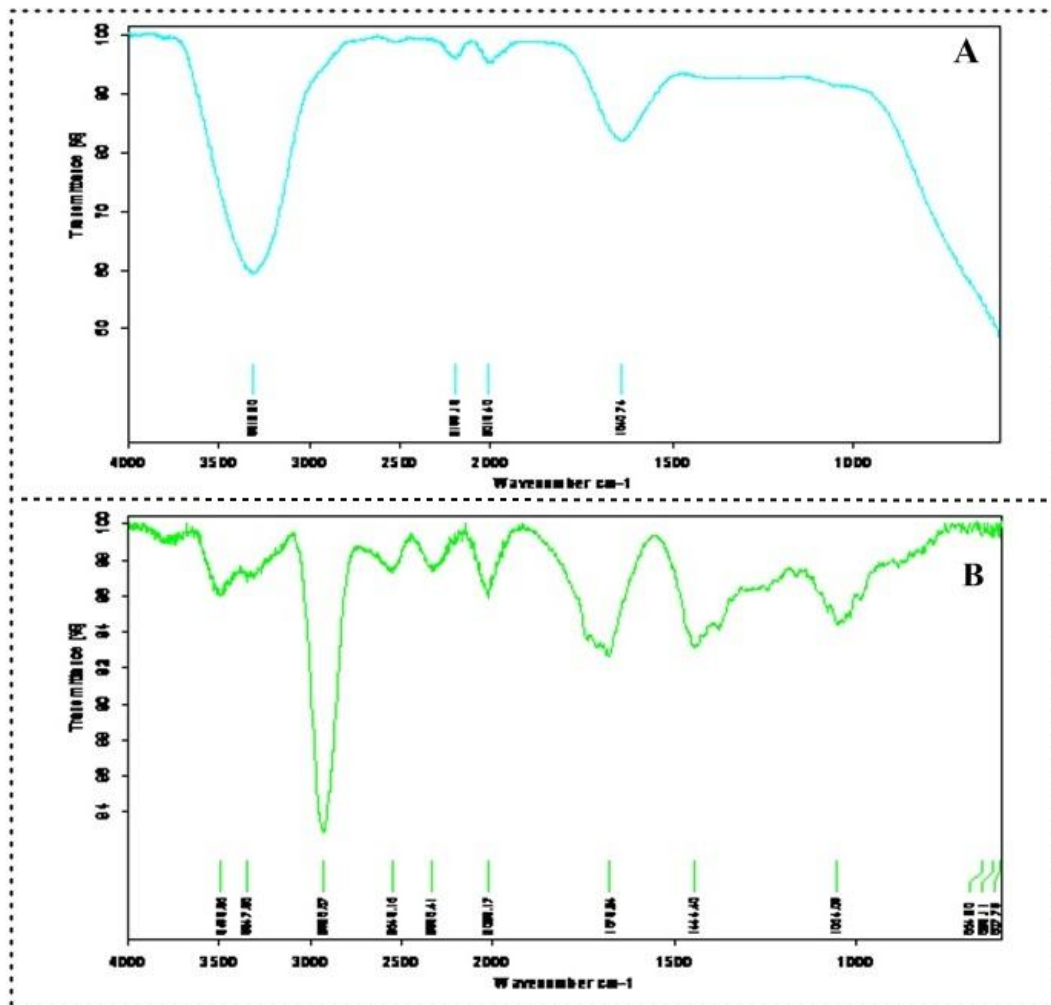
بررسی سمیت نانونیوزوم های دارای اسانس رزماری: جهت بررسی سمیت، در مرحله اول میزان سمیت سامانه نیوزومی طراحی و سنتز شده به تنهایی بر روی سلول های KG-1 پس از ۴۸ ساعت تیمار، بررسی گردید و نتایج حاصل از تست MTT عدم سمیت سامانه نیوزومی سنتز شده در این مطالعه را کاملاً تأیید نمود (نمودار شماره ۱-A).

در مرحله بعد و پس از اطمینان از عدم سمیت القایی توسط سامانه نیوزومی فاقد اسانس، درصد بقای سلول های KG-1 تیمار شده با غلظت های متفاوت

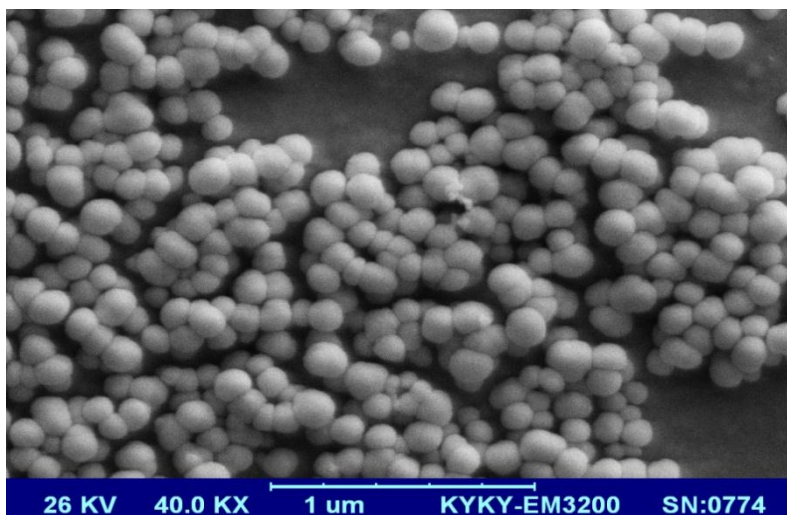
اسانس آزاد و فرم نیوزومی حاوی اسانس شامل غلظت های ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و ۷/۵ میکروگرم بر میلی لیتر پس از ۴۸ ساعت تیمار با استفاده از تست MTT، ارزیابی گردید. نتایج حاصله مشخص می کند که سلول های تیمار شده با نیوزوم حاوی اسانس رزماری در مقایسه با اسانس آزاد بقای کمتری از خود نشان دادند. این موضوع بیانگر این مهم است که می توان با استفاده از غلظت کمتری از اسانس رزماری به صورت نیوزومه در مقایسه با اسانس آزاد، مرگ سلولی بیشتری را در سلول های سرطانی مشاهده نمود (نمودار شماره ۱-B). تفاوت معنی داری بین نتایج حاصل از کاربرد اسانس تنها و سامانه حاوی اسانس وجود دارد ($P < 0.05$).

بررسی سمیت نانونیوزوم های دارای اسانس رزماری: جهت بررسی سمیت، در مرحله اول میزان سمیت سامانه نیوزومی طراحی و سنتز شده به تنهایی بر روی سلول های KG-1 پس از ۴۸ ساعت تیمار، بررسی گردید و نتایج حاصل از تست MTT عدم سمیت سامانه نیوزومی سنتز شده در این مطالعه را کاملاً تأیید نمود (نمودار شماره ۱-A).

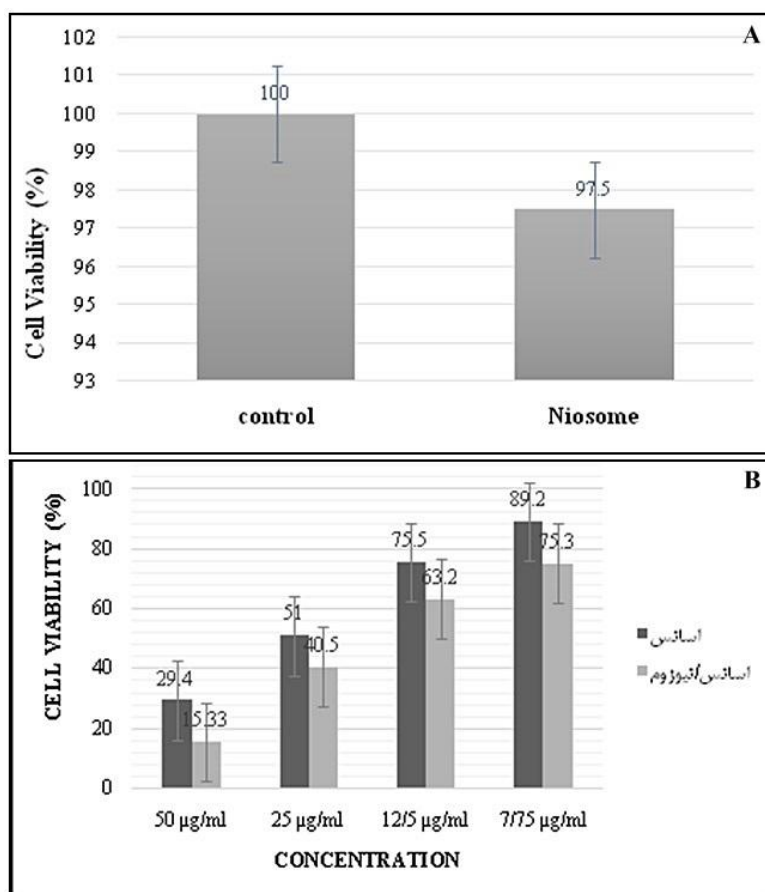
در مرحله بعد و پس از اطمینان از عدم سمیت القایی توسط سامانه نیوزومی فاقد اسانس، درصد بقای سلول های KG-1 تیمار شده با غلظت های متفاوت



تصویر شماره ۱. (A) طیف FTIR اسانس رزماری. (B) طیف FTIR نانوسامانه نیوزومی حاوی اسانس رزماری



تصویر شماره ۲. تصویر SEM از نانوسامانه نیوزومی حاوی اسانس رزماری



نمودار شماره ۱. (A) ارزیابی سمیت سامانه نیوزومی قبل از بارگذاری اسانس رزماری. (B) مقایسه سمیت اسانس آزاد رزماری و نانونیوزوم های دارای اسانس رزماری در غلظت های مختلف

بحث و نتیجه گیری

رزماری یکی از گیاهانی است که اثرات ضدسرطانی اسانس و عصاره آن در پژوهش ها مشخص گردیده

است (۱۷). Pérez-Sánchez و همکاران در سال ۲۰۱۹ طی مطالعه ای که انجام دادند عصاره رزماری می تواند به شدت تکثیر، متاستاز و تشکیل کلونی را در

اندازه نانوذرات بین ۳۲۰۰ تا ۵۸۰ نانومتر گزارش شده است (۲۱)، که نسبت به پژوهش حاضر از انکپسولاسیون بالاتر و اندازه ذرات بزرگ تری برخوردار می باشد.

حق جو و همکاران در سال ۲۰۱۵ نانو لیپوزوم های حاوی اسانس گزنه در غلظت های مختلفی از فسفاتیدیل کولین و کلسترول تهیه نمودند که حداکثر میزان درون پوشانی اسانس ۶۸/۸۳ محدوده اندازه ذرات بین ۸۱ تا ۹۴ نانومتر و شاخص پراکندگی ذرات مانند پژوهش حاضر، ۰/۳ گزارش شده است (۲۲)، که این نتایج تا حدودی مشابه نتایج پژوهش حاضر می باشد.

صحرا بشیری و همکاران در سال ۲۰۱۵، نانولیپوزوم های حاوی بتاکاروتن تهیه نمودند و به بررسی میزان پایداری این ذرات با گذشت زمان پرداختند. آن ها گزارش کرده اند که اندازه نانولیپوزوم های تهیه شده در حدود ۶۴ nm بوده و میزان درون پوشانی در بهترین فرمول حدود ۸۹/۷۷ درصد بوده است (۲۳).

ابراهیمی خوسفی و همکاران در سال ۲۰۱۵، لیپوزوم های حاوی اسانس آویشن شیرازی تهیه نمودند که درصد درون پوشانی را در نقطه بهینه ۵۴/۴ درصد گزارش نمودند. هم چنین پژوهش یاد شده نشان می دهد که مهم ترین پارامتر موثر بر ریز پوشانی، درصد محتوای فسفاتیدیل کولین به کار رفته در سنتز لیپوزوم است و با کپسوله کردن اسانس آویشن می توان خاصیت آنتی باکتریال اسانس را افزایش داد (۲۴). نتیجه این پژوهش همانند نتایج پژوهش حاضر تأییدی بر فعالیت های سیتوتوکسیک ترکیبات گیاهی می باشد.

Haiying Cui و همکاران در سال ۲۰۱۵ نانولیپوزوم های حاوی اسانس میخک تهیه نمودند که اندازه نانوذرات را بین ۷۸/۳ تا ۱۵۶/۱ نانومتر، شاخص پراکندگی ذرات را ۰/۱۹۶، پتانسیل زتا ذرات را ۲۴/۵- و میزان درون پوشانی را ۲۰/۴۱ درصد گزارش نمودند (۲۵).

حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۶ نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس زنیان تهیه نمودند که میزان انکپسولاسیون اسانس ۳۵/۶ درصد و اندازه نانوذرات

سلول های سرطان کولون مهار کرده و با افزایش قابل ملاحظه ای در ایجاد گونه های اکسیژن فعال (ROS) منجر به نکروز در این سلول ها شود (۱۸).

در مطالعه حاضر نانولیپوزوم های دارای اسانس رزماری با اندازه $73/6 \pm 0/246$ nm و پتانسیل زتای $45/46 \pm 0/22$ mV تهیه شده است، که راندمان انکپسولاسیون آن ۸۶/۷۵ درصد بوده است. بررسی FTIR و SEM آن حاکی از عدم برهمکنش میان دارو و سامانه و مورفولوژی یکنواخت و همگن نانسامانه است. این پژوهش ضمن تایید آهسته رهش بودن سامانه نیوزومی، نشان می دهد که حداکثر رهش دارو در طی ۴۸ ساعت، در شرایط سلول های نرمال و سرطانی به ترتیب ۴۵/۷۳ درصد و ۵۱/۸ درصد است. هم چنین در بررسی سلولی آن مشخص شد که میزان سمیت اسانس نیوزومه شده در غلظت های مختلف بر روی سلول های مغز استخوان سرطانی شده، نسبت به اسانس نیوزومه نشده در غلظت های مختلف، به طور معنی داری بیشتر است ($P < 0.05$).

Detoni و همکاران در سال ۲۰۰۹، نانولیپوزوم های چند لایه حاوی اسانس *Zanthoxylum tingoassuiba* با استفاده از روش فیلم نازک تهیه نمودند که اندازه آن ها ۹۳۷ nm و درصد درون پوشانی ۴۳/۷ درصد گزارش شد (۱۹). اندازه ذرات کوچک تر، نیوزمه بودن ذرات و درصد درون پوشانی بالاتر از جمله مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش Detoni است.

Celia و همکاران در سال ۲۰۱۳ نانو لیپوزوم های حاوی اسانس ترنج را تهیه نمودند که این نانوذرات ضمن افزایش میزان حلالیت اسانس و بهبود شاخصه های ضد سرطانی آن، دارای پتانسیل زتای ۶- و اندازه ذرات ۱۸۶ nm بودند (۲۰)، که این تحقیق همانند پژوهش حاضر ضمن تایید فعالیت ضد سرطانی ترکیبات گیاهی، نشان می دهد که نانوکپسول های محتوی ترکیبات گیاهی فعالیت ضد سرطانی این ترکیبات را افزایش می دهد.

Tao و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴، نانوذرات کیتوزان حاوی اسانس آویشن تهیه نمودند که در این پژوهش میزان درون گیر شدن اسانس ۸۰ درصد و

مجدی زاده و همکاران در سال ۲۰۱۸، نانولیپوزوم های آهسته رهش حاوی اسانس نعناع فلفلی را با درصد بارگذاری ۶۱/۳۸ درصد، اندازه ۲۴۵ nm، شاخص پراکندگی ۰/۳۲ و پتانسیل زتای ۳۴/۵۴ mV- تهیه نمودند (۱۶). اندازه ذرات کوچک تر، انکپسولاسیون بالاتر و نیوزومه بودن حامل از جمله مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش مجدی زاده و همکاران می باشد.

پژوهشگران حوزه سرطان همواره به دنبال استفاده از ترکیبات گیاهی به جای داروهای صنعتی معمول در شیمی درمانی هستند تا مقداری از مشکلات ناشی از شیمی درمانی را کاهش دهند، اما استفاده از ترکیبات استخراج شده از گیاهان با چالش های بنیادی رو به رو است، بنا بر این دستیابی به استراتژی های نوین به منظور بهبود سیستم دارورسانی به سلول های سرطانی که بتواند جایگزین مناسب برای سیستم های دارورسان معمول باشد، می تواند بسیاری از چالش های پیش روی علم پزشکی را برطرف نماید. در پژوهش حاضر نانوحامل های نیوزومی حاوی اسانس رزماری ساخته شد که ضمن تأیید ویژگی های فیزیکیوشیمیایی مناسب آن، دارای انکپسولاسیون بالا، رهایش کنترل شده ی دارو در شرایط سلول سرطانی و نرمال و افزایش سمیت اسانس در حالت انکپسوله شده در مقایسه با حالت آزاد است. بنا بر این با توجه به شواهد فوق می توان نانوسامانه نیوزومی حاضر را به عنوان حاملی مناسب جهت رسانش اسانس های گیاهی به سلول های توموری از جمله سرطان لوسمی میلوئیدی حاد پیشنهاد نمود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد می باشد. نویسندگان این مقاله از پرسنل و مدیریت شرکت دانش بنیان ریز زیست فناوران فردانگر برای مساعدت در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را ابرار می دارند.

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References

1.Hashemi A, Besharati A, Taghipour S, Bahrami A. [Frequency of various

حاوی اسانس nm ۱۸۶/۱ بوده است. هم چنین پتانسیل زتای نانوذرات در این پژوهش بین ۱- تا ۶/۷- گزارش شده است (۱۰). اندازه ذرات کوچک تر، نیوزومه بودن ذرات و درصد درون پوشانی بالاتر از جمله مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش حقیرالسادات و همکاران است.

قره نقده و همکاران در سال ۲۰۱۷، نانولیپوزوم های حاوی اسانس مریم گلی با فرمول های مختلف (۰-۹۰، ۸۰-۱۰ و ۲۰-۷۰ میلی گرم) تهیه نمودند که اندازه ذرات و شاخص پراکندگی ذرات به ترتیب در محدوده ۸۸-۸۲ نانومتر و ۰/۳۹-۰/۴۲ و میزان درون پوشانی اسانس در تمامی فرمول ها بالای ۷۰ درصد گزارش شده است (۲۶).

نادری نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۷، نیوزوم های حاوی کورکومین به منظور اثرگذاری بر سرطان استخوان تهیه کرده و گزارش نمودند که کورکومین نیوزومه نسبت به کورکومین آزاد، به نسبت بیشتری مانع رشد سلول های سرطان استخوان می شود (۲۷)، که همانند پژوهش حاضر تایید می کند که انکپسوله کردن ترکیبات گیاهی فعالیت ضد توموری آن ها را افزایش می دهد.

محمدی و حویزی در سال ۲۰۱۷، اثر عصاره هیدروالکلی رزماری را بر روی سلول های سرطانی سر و گردن رده HN5 بررسی و گزارش نمودند که عصاره رزماری دارای باعث کاهش بقای سلول سرطانی در تیمارهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته شده است (۲۸). نتیجه پژوهش طبیعی همانند پژوهش حاضر تأییدی بر فعالیت ضد توموری اسانس رزماری است.

عبدالملکی و همکاران در سال ۲۰۱۷، به بررسی اثر ضد سرطانی عصاره گیاه رزماری بر سلول های سرطانی پستان رده MCF-7 و SKBR-3 و سلول های فیبروبلاست HU02 پرداختند و گزارش نمودند که عصاره رزماری دارای اثر ضد سرطانی وابسته به غلظت و زمان بر روی رده سلولی MCF-7 و SKBR3 است، در حالی که سمیتی بر سلول های فیبروبلاست نداشته است (۲۹).

malignant diseases in children younger than 10 years old in Yazd]. SSUJ2007;14:9-14.

- (Persian)
2. Rahimzadeh M, Sadeghizadeh M, Najafi F, Arab SS, Mobasheri H. [Study of loading cytotoxicity uptake and release of curcumin from a novel gemini surfactant nanocarrier]. *Pathobiol Res* 2016;19:13-27. (Persian)
 3. Haghirsadat F, Azhdari M, Oroojalian F, Omid MA. [The chemical assessment of seed essence of three native medicinal plants of Yazd province *Bunium premium* *Cuminum cyminum* *Trachyspermum copticum* and the comparison of their antioxidant properties]. *J Shaeed Sdoughi Uni Med Sci* 2015;22:1592-603. (Persian)
 4. Wang W, Wu N, Zu YG, Fu YJ. Antioxidative activity of *rosmarinus officinalis* l. essential oil compared to its main components. *Food Chem* 2008;108:1019-22. doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.046
 5. Nejati HF, Neyriznaghadehi M. Experimental study of topical antifungal activity of rosemary essential oil on *Candida albicans* infected with cutaneous ulcer in Rat. *Cell Pathol Stud J Comp Pathobiol* 2014;11:1397-406.
 6. Bhalla Y, Gupta VK, Jaitak V. Anticancer activity of essential oils. *J Sci Food Agr* 2013;93:3643-53. doi.org/10.1002/jsfa.6267
 7. 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. doi: 10.1016/j.biopha.2016.07.043.
 8. Perez A, Sanchezmarzo N, Herranz M, Barrajon E, Micol V. Rosemary *Rosmarinus officinalis* L extract increases ROS and modulates Nrf2 pathway in human colon cancer cell lines. *Free Rad Biol Med* 2017;108: 79. doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.263
 9. Tong X, Ma Y, Quan D, Zhang L, Yan M, Fan X. Rosemary extracts upregulate nrf2 sestrin2 and mrp2 protein level in human hepatoma HepG2 cells. *Evidence Based Comple Alt Med* 2017;2017:1-7. doi.org/10.1155/2017/7359806
 10. Haghirsadat F, Azhdari M, Kalantar S, Naderinezhad S, Teymourzadeh K, Yazdani M. [Strategy of improvements in the rapetic index of medicinal herbs of Iranianin digenous synthesis and characterization of phospholipid lipid based vesicles in corporated *trachyspermum copticum*]. *SSUJ* 2016;24:468-78. (Persian)
 11. Sherry M, Charcosset C, Fessi H, Greigegeges H. Essential oils encapsulated in liposomes. *J Liposome Res* 2013;23:268-75.
 12. Asghari JM-A, Mzaheritehrani M. Study of steroidal saponins in rhizome of *Ruscus echolatosus* L. in northern Iran Soydokou city. *Q J Ecophythem Med Plant* 2012;3:28-38.
 13. Moghassemi S, Hadjizadeh A. Nano niosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review. *J Control Release* 2014;185:22-36. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.04.015
 14. Arora R. Advances in niosome as a drug carrier. *Asian J Pharm Free full* 2016;1:29-39. doi.org/10.22377/ajp.v1i1.737
 15. Sharma D, Ali AAE, Aate JR. Niosomes as novel drug delivery system. *Pharma Tutor* 2018;6:58. doi.org/10.29161/PT.v6.i3.2018.58
 16. Majdzadeh M, Rezaeizarchi S, Shahimalmir H, Sasani E, Haghirsadat BF. [A new strategy in improving therapeutic indexes of medicinal herbs preparation and characterization of nano liposomes containing *Mentha piperita* essential oil]. *SSUJ* 2018;25:853-64. (Persian)
 17. Singh R, Kaushik R, Jaglan V. Antibacterial and antioxidant activity of green cardamom and rosemary extract in food products a brief review. *Pharma Innov J* 2018;7:568-73.
 18. Sanchez A, Barrajon E, Torres V, Agullochazarra L, Herranz M, Valdes A, et al. Rosemary *officinalis* extract causes ROS induced necrotic cell death and inhibits tumor growth invivo. *Sci Rep* 2019;9:808. doi:10.1038/s41598-018-37173-7
 19. Detoni CB, Albuquerque ECM, Hohlemweger SVA, Sampaio C, Barros TF, Velozo ES. Essential oil from *Zanthoxylum tingoassuiba* loaded into multilamellar liposomes useful as antimicrobial agents. *J Microencapsul* 2009;26:1-8. doi:10.1080/02652040802661887
 20. Celia C, Trapasso E, Locatelli M, Navarra M, Ventura CA, Wolfram J, et al. Anticancer activity of liposomal bergamot

- essential oil on human neuroblastoma cells. *Coll Surf B Biointer* 2013;112:548-53. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.017
21. Tao F, Hill LE, Peng Y, Gomes CL. Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. *LWT Food Sci Technol* 2014;59:247-55. doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.037
22. Haghjoo SG, Hamishekar H, S Asnaashari, Dehghannia J. Evaluation of colloidal and antioxidant properties of nano liposomes containing nettle extract. *Innov Food Technol* 2015;2:11-23.
23. Bashiri S, Ghanbarzadeh B, Hamishekar H, Dehghannia J. [Beta carotene loaded nanoliposome: effects of gama oryzanol on particle size stability and encapsulation]. *Res Innov Food Sci Technol* 2015;4:365-82. (Persian)
24. Khouf MKE, Hoseini H, Arabi S, KamaliFonoud R, Kamali PK. Production of nanoliposomes containing essential oil of Boiss Zataria multiflora by response surface method. *Nanomeghyas* 2014;1:119-28.
25. Cui H, Zhao C, Lin L. The specific antibacterial activity of liposome-encapsulated Clove oil and its application in tofu. *Food Control* 2015;56:128-34. doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.026
26. Gharenaghadeh SS, Sowti M, Hamishekar H, Mokaram R. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant properties of Salvia essential oil nano liposome Salvia multicaulis. *J Food Sci Technol* 2014;14:271-82.
27. Naderinezhad S, Haghrosadat F, Amoabediny G, Naderinezhad A, Esmaili Z, Akbarzade A. Synthesis of biodegradable and self assembled anionic nano carrier novel approach for improvement of curcumin delivery to bone tumors cells & mathematical modeling of drug release kineti]. *New Cell Mol Biotechnol J* 2017;7:77-84.
28. Mohammadi T, Hoveizi E. Comparison of Rosemarinus officinalis L. hydroalcoholic extract on the viability of head and neck cancer cells line HN5 and neuronal progenitor cells of mouse. *J Deve Biol* 2017; 9: 13-22.
29. Abdolmaleki N, Javanijouni F, Abdolmaleki P, Abdolmaleki Z. [Assessment of anticancer properties of Rosmarinus officinalis L extract and gamma rays on cell viability of MCF-7 SKBR3 and HU02 cell lines]. *Pathobiol Res* 2017;20:23-36. (Persian)

Evaluation of the Effect of Niosomal Nano-Carriers Containing Rosemary (*Rosemary officinalis*) Essential oil on Survival of KG-1 Cell Line of Acute Myeloid Leukemia

Soltani N¹, Nikoonahadlotfabadi N^{1*}

(Received: September 26, 2018

Accepted: April 6, 2019)

Abstract

Introduction: The use of nanotechnology in drug delivery to the cells can somewhat address some of the problems involved in the delivery of herbal medicines, including non-targeting and high oxidizing features. Therefore, this study aimed to investigate the niosomal nano-carriers containing *Rosmarinus officinalis* essential oil to improve its physicochemical characteristics and increase its antitumor properties.

Materials & Methods: The vesicles of niosome were prepared by thin-film method using span 60, cholesterol and polyethylene glycol and the *Rosmarinus officinalis* essential oil were loaded into the niosomes. Thereafter, their physicochemical characteristics were evaluated using Zeta Sizer, FTIR, SEM, and the essential oil release amount was calculated at 37° C and 42° C. Finally, MTT assay was performed to assess the toxicity of the nano-carrier containing essential oil against the KG-1 cell line of Acute Myeloid Leukemia (AML).

Findings: The results of the present study indicated that prepared nano-carriers

containing essential oil have encapsulation efficiency, size and zeta potential include 86.75%, 73.6 nm and -45.46 mV, respectively. SEM images have indicated the spherical morphology of nano-niosomes. Furthermore, the results showed the appropriate position of the essential oil in the nano-carriers and controlled release at 37°C and 42°C. Additionally, MTT assay results demonstrate that the encapsulated essential oil has a higher toxicity against KG-1 cell line than the free essential oil.

Discussion & Conclusions: The results of this study, while confirming the method used for niosome synthesizing, the use of niosome as an effective carrier for essential oil encapsulation, and its slow-releasing feature, suggests that this nanosystem can increase its stability without altering the chemical nature of the essential oil. Accordingly, it can be suitable for the delivery of rosemary essential oils to KG-1 cells and the exertion of its effects on the cells.

Keywords: Rosemary, Niosome, Nanocarrier, KG-1 cell line

1. Dept of Biology Faculty of Sciences, Science and Arts University, Yazd, Iran

*Corresponding author Email: nikounahad_1976@yahoo.com