

سنتز نانوحامل‌های لیپوزومی حاوی اسانس اسطوخودوس و مشخصه‌یابی آنها با هدف اثرگذاری بر رده- های سلولی سرطان سینه

منیره محمدپناه^۱ , الهام موجودی^۱ , فاطمه حقیرالسادات^{۲*} , راحله احسانی^۳ 

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه یزد، یزد، ایران

۲- استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۳- کارشناس ارشد، مرکز نانو تکنولوژی و مهندسی بافت، پژوهشکده علوم تولید مثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

یافته / دوره بیست و دوم / شماره ۱ / بهار ۹۹ / مسلسل ۸۳

چکیده

دریافت مقاله: ۹۸/۱۵/۳ پذیرش مقاله: ۹۹/۱/۱۲

مقدمه: با توجه به پیشرفت روند استفاده از گیاهان دارویی در علم پزشکی، خواص متعددی برای اسانس گیاه اسطوخودوس از جمله خواص آنتی‌اکسیدان، ضدباکتری، ضدسرطان و ضدالتهابی به اثبات رسیده است. نانولیپوزوم‌ها قادرند تا عملکرد عوامل زیستی را از طریق بهبود حلالیت، پایدار نمودن دارو در شرایط آزمایشگاهی و محیط فیزیولوژیک، افزایش دهند. هدف از این مطالعه، سنتز نانوسامانه‌های لیپوزومی حامل اسانس گیاه اسطوخودوس، افزایش کارایی نانوحامل‌ها در دارورسانی و بهبود عملکرد درمانی سرطان بود.

مواد و روش‌ها: اسانس گیاه اسطوخودوس با استفاده از تکنیک تقطیر آبی و توسط دستگاه کلونجر استخراج و سپس توسط کروماتوگرافی گازی آنالیز گردید. لیپوزوم‌ها نیز با تکنیک فیلم لایه‌ی نازک سنتز شدند. بعد از بارگذاری اسانس در نانوحامل‌ها تکنیک‌های متعددی از جمله کارایی جذب دارو، اندازه، پتانسیل زتا، پروفایل ره‌ایش دارو و مورفولوژی سطحی، بر روی نانولیپوزوم‌ها انجام گرفت.

یافته‌ها: نانولیپوزوم‌ها تحت شرایط تعیین شده بازده بالایی از انکپسولاسیون و بارگذاری اسانس ($60 \pm 3/4$)٪، اندازه‌ی کم ($7/28 \pm 68/3$) نانومتر و بار سطحی تقریباً خنثی (2 - تا $4/5$ میلی‌ولت) را نشان دادند. میزان ره‌ایش اسانس از نانوذرات در مدت زمان 72 ساعت در شرایط فیزیولوژیک و شرایط سلول سرطانی، به ترتیب برابر با $63/98$ ٪ و $87/63$ ٪ بود. نانولیپوزوم‌ها دارای مورفولوژی کروی بوده و اسانس هیچ گونه میانکنش نابه‌جایی با سامانه ایجاد نکرد.

بحث و نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به دست آمده، نانوحامل‌های لیپوزومی می‌توانند حامل‌هایی مناسب برای اسانس روغنی گیاه اسطوخودوس در شرایط سلول سرطانی باشند. با این وجود مطالعات بیشتر جهت تشخیص سمیت سلولی بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی و نرمال انسانی باید انجام گیرد.

واژه‌های کلیدی: گیاهان دارویی، اسانس روغنی گیاه اسطوخودوس، لیپوزوم، نانوحامل.

*آدرس مکاتبه: یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی.

پست الکترونیک: Fhaghirosadat@gmail.com

مقدمه

سرطان یکی از عمده مشکلات نظام سلامت ایران می‌باشد. پس از ظهور سرطان، جامعه‌ی پزشکی به منظور درمان به دو گروه مختلف تقسیم شده است. در یک گروه، ضرورت استفاده‌ی مطلق از ترکیبات شیمیایی جدا شده یا سنتز شده برای درمان بیماران، کارآمد دانسته می‌شود، در حالی که گروهی دیگر، منابع طبیعی از جمله عصاره‌های گیاهی را نسبت به ترکیبات شیمیایی سنتتیک مناسب‌تر می‌دانند، هرچند که این دو گروه می‌توانند قابل تلفیق باشند (۱). روش‌های متداول درمان سرطان از جمله شیمی درمانی، پرتو درمانی و جراحی، اثرات جانبی جدی به دنبال دارند، به طوری که دسترسی به دارویی با اثر بخشی بالا، سمیت کم، که به صورت اختصاصی بر سلول‌ها تأثیر گذاشته و ارزان باشد، یکی از دغدغه‌های مهم جوامع دارویی در دنیا و حوزه‌ی درمان می‌باشد (۲). در این زمینه، درمان با استفاده از گیاهان دارویی می‌تواند یکی از پایه‌های اصلی کنترل و درمان سرطان باشد (۳). در صنعت داروسازی مدرن، ساخت داروهای گیاهی به طور عمده بر اساس دانش و شیوه‌های سنتی به دست می‌آید (۴،۵). گیاه اسطوخودوس با نام علمی *Lavandula angustifolia* که از خانواده نعنائیان *Labiatae* است و در نواحی مختلف مانند مدیترانه، جنوب غربی آسیا، شمال آفریقا و اروپا رویش دارد. اسانس اسطوخودوس حاوی بیش از ۴۲ ترکیب شامل استات لینالیل، سینئول، لینالول، نرول، برنتول، فلاونوئیدها، تانن‌ها و کومارین‌ها می‌باشد. تاکنون بیشتر تحقیقات روی فعالیت‌های ضد باکتریایی و ضد قارچی اسانس اسطوخودوس متمرکز بوده است و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی آن علیه سلول‌های سرطانی کمتر مورد توجه قرار گرفته است (۶). به طور کلی، اسانس گیاهان با وجود ترکیبات ارزشمندی که دارا هستند، در محیط‌های مختلف پایداری بسیار کمی را از خود نشان داده و از این رو استفاده‌ی

طولانی مدت از آنها با هدر رفت بخش اعظمی از این اسانس‌ها همراه می‌باشد (۷). بدین منظور استفاده از تکنولوژی مدرن انکپسولاسیون، گامی در جهت افزایش پایداری و ماندگاری این ترکیبات می‌باشد. وزیکول‌های فسفولیپیدی، ذرات کلوئیدی دارای غشای دو یا چند لایه فسفولیپیدی هستند که به علت اهمیت بالای آنها، به عنوان حامل‌های دارویی در سیستم‌های دارورسانی نوین شناخته می‌شوند (۸،۹).

لیپوزوم‌ها که به طور معمول حداقل اندازه‌ای بین ۳-۶ نانومتر را دارا بوده و با پیوستن به یکدیگر می‌توانند ذرات با قطر بیشتر را ایجاد کنند. این ذرات قادر به حمل ترکیبات آبدوست، آب‌گریز و آمفوتریک می‌باشند. علاوه بر این، ویژگی‌هایی از قبیل سمیت ذاتی پایین، زیست تجزیه‌پذیری و فقدان ایمونوژنیسیته، سبب شده است که لیپوزوم‌ها به عنوان یک حامل بسیار مناسب در سیستم‌های دارورسانی نوین مورد توجه واقع شوند. لیپوزوم‌ها با افزایش نیمه عمر داروها، در برابر فاگوسیتوز و کلیواژ آنزیمی نقش مهمی ایفا می‌کنند (۱۰).

در این پژوهش، با توجه به کاربرد مهم درمانی گیاه اسطوخودوس و اهمیت ترکیبات موجود در اسانس این گیاه، از انکپسوله کردن این اسانس در نانوذرات لیپوزومی استفاده شده است. هدف از انجام این پژوهش نیز، ایجاد شرایط بهینه جهت حفاظت از این ترکیبات، رهایش آهسته‌ی آنها در محیط داخل سلولی و کنترل آزادسازی این اجزاء به منظور کاربرد دارویی در زمینه‌ی درمان سرطان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد نیاز در این مطالعه شامل فسفاتیدیل کولین سوپای ۸۰٪ (Ludwigshafen, Germany)، کلسترول، پلی اتیلن گلیکول (PEG) و کیسه‌ی دیالیز (با cut off وزن مولکولی ۱۲۰۰۰ تا ۱۴۰۰۰ دالتون) (Sigma Aldrich, USA)، حلال‌های کلروفرم و ۲-پروپانول

۱/۳۶۵ گرم پلی‌اتیلن گلیکول و ۷ میلی‌لیتر اسانس با غلظت ۱/۵ مولار در حداکثر ۱۵ میلی‌لیتر حلال آلی فرار کلروفورم و در یک اوپراتور دوار (روتاری) (Heidolph, Germany)، در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۴۰ دقیقه به صورت محلول در آمدند و سپس مواد تحت شرایط نیم خلاً به مدت ۶۰-۵۰ دقیقه، به صورت لایه‌ی نازک جامد در ته بالن ته‌نشین شدند. جهت هیدراته کردن لایه‌ی خشک شده از محلول نمکی PBS (Phosphate buffered saline) استفاده شد. برای بهتر هیدراته شدن، بالن حاوی مواد به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به اوپراتور دوار متصل شد. بدین صورت محلول شیری رنگ حاصل از لیپوزوم حاوی اسانس تهیه گردید. ذرات سنتر شده‌ی چند لایه‌ای، با استفاده از دستگاه سونیکاتور پروبی (Misonix, USA) به سایزهای کوچک‌تر شکسته شدند و محلول به ترتیب از فیلترهای ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. به منظور جداسازی اسانس آزاد، محلول حاصل در کیسه‌ی دیالیز، در محیط آبی PBS، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲ ساعت بر روی استیرر قرار داده شد (۱۲،۱۳).

تعیین مقدار اسانس بارگذاری شده

به منظور تخمین مقدار اسانس بارگذاری شده در نانوحامل‌های لیپوزومی، پس از جداسازی اسانس آزاد در سوسپانسیون، آن را به نسبت‌های ۱:۵، ۱:۱۰، ۱:۲۰ و ۱:۴۰ با ایزوپروپانول رقت بندی شد. پس از هضم دیواره‌ی لیپیدی میزان جذب هر کدام از رقت‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (T80+ Model, PG Instruments UK) خوانده و سپس با منحنی استاندارد اسانس مقایسه شد. همچنین با استفاده از رابطه‌ی (۱) میزان مقدار اسانس بارگذاری شده محاسبه گردید (۱۳).

رابطه ۱

$$100 \times \frac{\text{مقدار میلی گرم اسانس محصور شده}}{\text{مقدار میلی گرم اسانس اولیه}} = \text{درصد اسانس بارگذاری شده}$$

(Merck, Germany)، فیلتر ۰/۲۲ و ۰/۴۵ میکرومتر (Gibco, USA) و آب استریل تزریقی (ایران فارما، ایران) بود.

جمع‌آوری گیاه و تهیه‌ی اسانس

گیاه اسطوخودوس پس از جمع‌آوری در شرایط بهینه خشک گردید و توسط گروه زیست‌شناسی دانشگاه یزد به تأیید رسید. ابتدا مقدار ۶۰ گرم از گیاه، وزن و با آسیاب خرد شد، سپس به درون بالنی به حجم ۱ لیتر ریخته و ۶۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. بالن به دستگاه کلونجر (میهن‌آزما، ایران) متصل و توسط گیره و پایه ثابت گردید. به دلیل پایین‌تر بودن میزان چگالی اسانس از آب، اسانس بر سطح آب قرار گرفت و حالت دوفازی را ایجاد نمود. به منظور عدم کاهش کیفیت و کمیت، پس از سانتریفیوژ، در میکروتیوب حاوی پارافیلیم و فویل قرار گرفت و تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و به دور از نور نگهداری شد.

مطالعه‌ی ترکیبات موجود در اسانس

آنالیز اسانس تهیه شده با دستگاه GC، مدل (Agilent 7890B) مجهز به یک شناساگر جرمی، مدل (Agilent 5977B MSD) و یک ستون موئین مدل (HP- 5MS) انجام شد. دمای انژکتور، ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود و برنامه دمایی-زمانی برای نمونه، ۳ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی-گراد تعیین شد. سپس دما تا ۲۵۰ درجه سانتیگراد با شدت ۸ درجه سانتیگراد در دقیقه، افزایش یافت. به دنبال آن، دما به ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد با شدت ۲۰ درجه سانتیگراد در دقیقه تنظیم گردید. در نهایت به مدت ۳ دقیقه در دمای ۲۳۰ درجه سانتیگراد باقی ماند.

ساخت نانوسامانه لیپوزومی حاوی اسانس

جهت ساخت سامانه‌ی لیپوزومی و بارگذاری اسانس در آن، با توجه به شرایط آزمایشگاهی، روش آب‌پوشانی لایه‌ی نازک انتخاب گردید (۱۱). مقدار ۷۷/۱۲۶ میلی‌گرم فسفاتیدیل کولین سویا، ۱۶/۲۵۴ میلی‌گرم کلسترول،

بررسی میزان رهائش نانولیپوزوم

برای بررسی میزان رهائش اسانس از لیپوزوم، از روش انتشار به وسیله‌ی کیسه‌ی دیالیز استفاده شد. در این مرحله، ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون لیپوزوم، داخل کیسه دیالیز ریخته شد. کیسه دیالیز را درون بشر حاوی ۱۰ میلی‌لیتر بافر PBS در دو pH مختلف ۷/۴ و ۵/۴ گذاشته و بشر نیز بر روی استیرر و در دو دمای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس در فواصل زمانی مشخص ۱ میلی‌لیتر از بافر را برداشته و دوباره ۱ میلی‌لیتر بافر PBS جایگزین شد. نمونه‌گیری به مدت ۷۲ ساعت انجام گرفت. جذب نوری تمامی نمونه‌ها به طور جداگانه در طول موج ۲۳۱ نانومتر به وسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. انتخاب طول موج ۲۳۱ نانومتر به این دلیل بود که اسانس در این طول موج حداکثر جذب نور را از خود نشان داد.

تعیین اندازه و بار ذرات

به منظور سنجش سایز و بار سطحی نانوذرات فسفولیپیدی حامل اسانس از دستگاه Zeta-Sizer instrument, DLS, Malvern Zetasizer Nano-ZS, استفاده شد (۱۴).

بررسی ریخت‌شناسی نانولیپوزوم‌ها

بررسی دقیق سایز و مورفولوژی نانو ذرات به دست آمده با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) (Nanowizard II; JPK instruments; Germany) و میکروسکوپ نیروی روبشی (SEM) (TESCAN SEM) (VEGA3, Czech Republic) انجام پذیرفت. نمونه‌ها قبل از عکسبرداری توسط SEM، ابتدا توسط اتانول تثبیت و سپس خشک شدند.

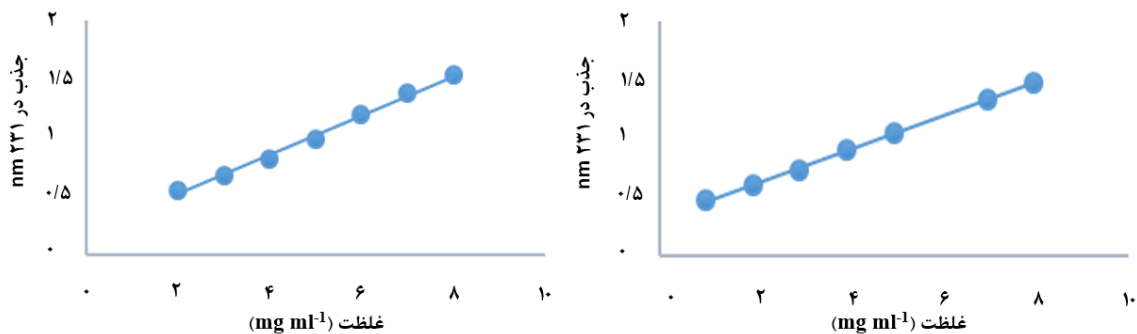
مطالعه‌ی برهم‌کنش بین اسانس و نانو لیپوزوم‌ها

به منظور بررسی وجود و یا عدم وجود برهم‌کنش بین اسانس گیاه اسطوخودوس و نانو حامل‌های لیپوزومی، اسانس، سوسپانسیون‌های لیپوزوم بدون اسانس و لیپوزوم حامل اسانس، ترکیبات اصلی سامانه‌ی لیپوزومی اعم از کلسترول و فسفاتیدیل کولین سویا را جهت طیف سنجی مادون قرمز با استفاده از دستگاه اسپکترومتر FTIR (Brucker, Germany) خوانش شدند.

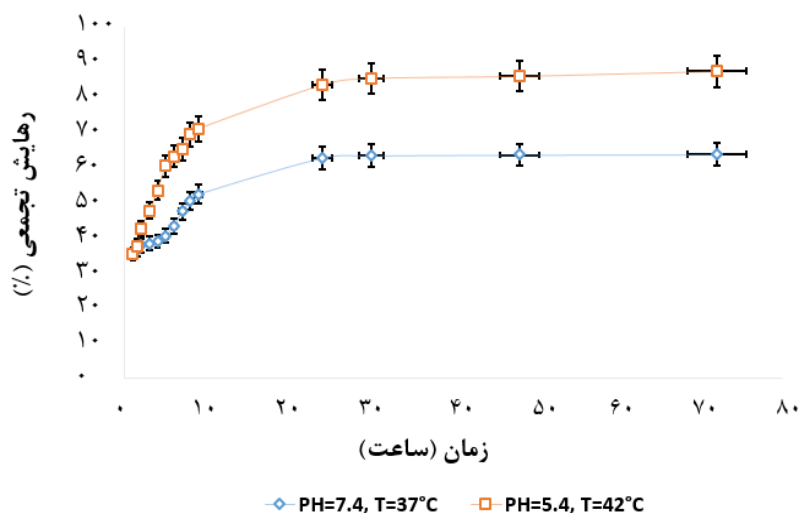
یافته‌ها

راندمان انکیپولاسیون و پروفایل رهائش

منحنی استاندارد اسانس گیاه اسطوخودوس در حلال ۲- ایزوپروپانول و بافر PBS رسم گردید (شکل ۱) و معادلات مربوط به این منحنی‌ها محاسبه شد. سپس از روی منحنی استاندارد میزان بارگذاری اسانس در نانوحامل‌های لیپوزومی تخمین زده شد (۱۲). میزان راندمان بارگذاری و انکیپولاسیون در این پژوهش ۳/۴ ± ۶۰ درصد بوده است. همچنین نمودار رهائش اسانس اسطوخودوس از نانوسامانه‌های لیپوزومی (شکل ۲) در محلول آبی PBS و طی دو شرایط pH=۷/۴ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH=۵/۴ و دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، نشان داد که رهائش از نوع آهسته و کنترل‌شده می‌باشد. میزان رهائش اسانس از نانوسامانه‌های لیپوزومی در دو شرایط ذکر شده و مدت زمان ۷۲ ساعت به ترتیب ۶۳/۹۸٪ و ۸۷/۶۳٪ می‌باشد.



شکل ۱. منحنی استاندارد اسانس اسطوخودوس در حلال ۲-ایزوپروپانول (چپ) و حلال آبی PBS (راست).



شکل ۲. منحنی رهائش اسانس اسطوخودوس از نانولیپوزوم‌ها در محلول آبی PBS در pH=7.4 و T=37°C و pH=5.4 و T=42°C

دارای سطحی متراکم و یکنواخت هستند که می‌توانند به عنوان حامل‌های دارویی به کار گرفته شوند.

جدول ۱. فهرست ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاه اسطوخودوس بر اساس آنالیز کروماتوگرافی گازی.

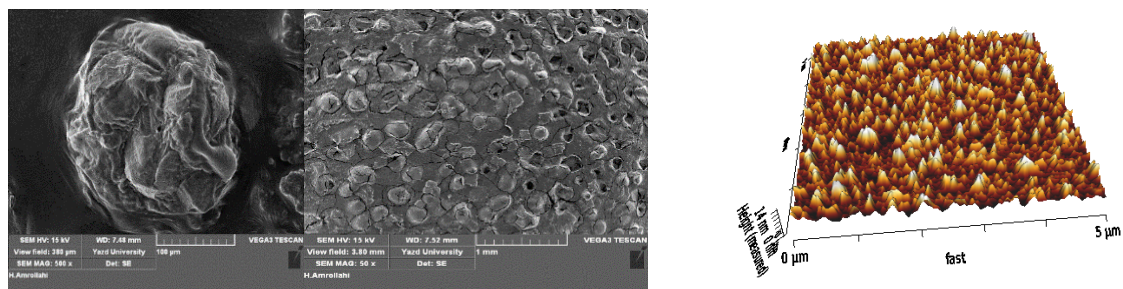
درصد	نام ترکیب	درصد	نام ترکیب
۳۰/۵	Terpinen-4-ol	۱/۴۱	α -Pinene
۳۰/۷۴	Cyclohexene, 1-methyl	۰/۶۵	Camphene
۲۹/۲۰	Linalool	۰/۴۳	β -Pinene
۱/۴۳	2, cis-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl	۱/۴۷	o-Cymene
۱/۷۴	Acetic acid, 1,7,7 -yl ester	۳۰/۵	Eucalyptol
۰/۴۴	Carvone	۳۰/۷۴	(+)-2-Bornanone
۰/۲۵	p-Cymen-7-ol	۲۹/۲۰	Borneol

نتایج GC-mass spectroscopy

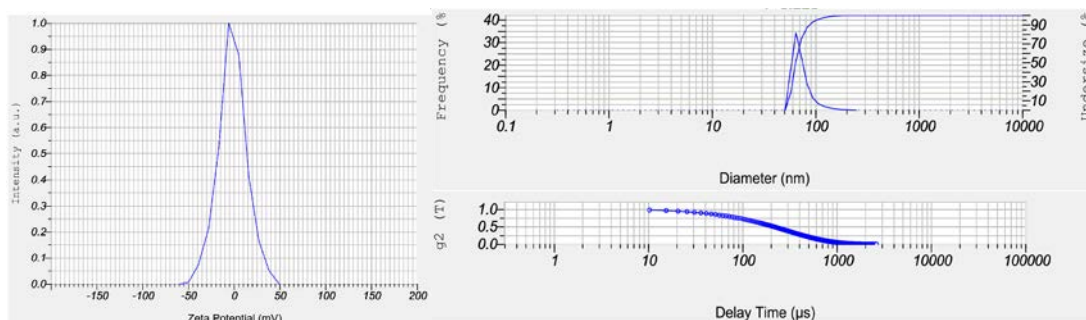
اسانس گیاه اسطوخودوس بر اساس آنالیز کروماتوگرافی گازی، شامل ۱۴ ترکیب شیمیایی مختلف بوده که عمده ترین آنها، چهار ترکیب Terpinen-4-ol، 1-Cyclohexene، Eucalyptol methyl و (+)-2-Bornanone می‌باشند. درصد هر یک از ترکیبات و فرمول ساختاری آنها، به ترتیب در جدول ۱ نمایش داده شده است.

نتایج عکس برداری با AFM و FE-SEM

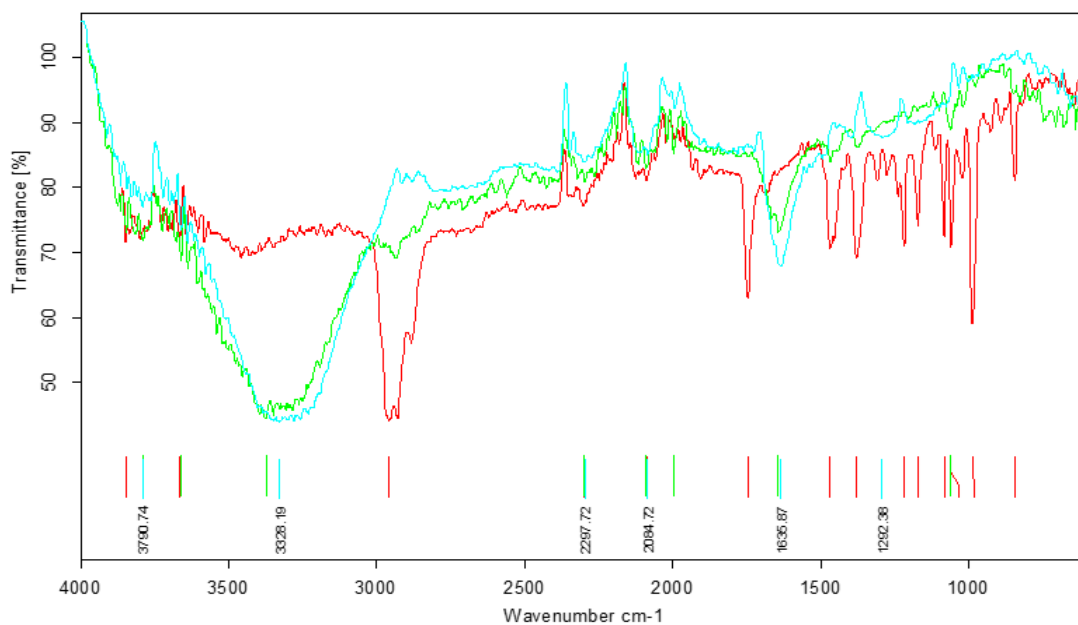
مورفولوژی نانولیپوزوم‌ها به وسیله‌ی میکروسکوپ نیروی اتمی و الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر به دست آمده از AFM و FE-SEM (شکل ۳) نشانگر این است که ذرات حاصله کروی یا شبه کروی بوده و



شکل ۳. مورفولوژی نانولیپوزوم‌ها با استفاده از عکسبرداری توسط AFM (سمت راست) و FE-SEM (سمت چپ)



شکل ۴. نمایش میانگین اندازه (راست) و نمودار شدت پتانسیل زتای (چپ) نانو ذرات لیپوزومی حامل اسانس اسطوخودوس.



شکل ۵. گراف‌های مادون قرمز (FTIR)، جهت شناسایی برهم‌کنش بین اسانس و سامانه. اسانس گیاه اسطوخودوس (قرمز)، سامانه‌ی نانولیپوزوم حاوی اسانس (آبی)، سامانه لیپوزومی فاقد اسانس (سبز)

عمده ذرات، سایزی با میانگین $68/3 \pm 7/28$ نانومتر برآورد شده و توزیع اندازه نانو ذرات ساخته شده، یکنواخت گزارش شده است (شکل ۴). نتایج به دست آمده از دستگاه زتا سایزر، میزان بار ذرات را -50 تا $+50$ گزارش نموده که میانگین پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌ها بین

اندازه نانوذرات و پتانسیل زتای بار سطحی نانوسامانه‌های لیپوزومی حامل اسانس اسطوخودوس از نظر اندازه، با استفاده از دستگاه نانسایزر اندازه‌گیری شدند. حدود نمودار اندازه ذرات نشان دهنده سایز نانوذرات از 10 تا بالای 1000 نانومتر است، اما برای

میزان درون‌پوشانی و انکپسولاسیون نانوذرات برابر با $3/4 \pm 60\%$ درصد و میزان رهایش نانوحامل‌ها برای دمای 37°C درجه و $\text{pH}=7/4$ (شرایط فیزیولوژیک سلول نرمال) در مدت زمان ۷۲ ساعت برابر با $63/98\%$ و دمای 42°C درجه و $\text{pH}=5/4$ (شرایط فیزیولوژیک سلول سرطانی) برابر با $87/63\%$ می‌باشد. نانولیپوزوم‌ها با مورفولوژی کروی و اندازه‌ی $7/28 \pm 68/3$ نانومتر که از نظر بار الکتریکی تقریباً خنثی بودند، هیچ گونه تداخل و میانکنش نابه‌جا با اسانس ایجاد نکردند و از این رو خواص اسانس به طور کامل محفوظ ماند.

مطابق با مطالعات پیشین، در سال ۲۰۱۲، امینی و همکاران مطالعه‌ای بر روی میزان سایتوتوکسیته‌ی عصاره گیاه هیدرو الکلی اسطوخودوس و اثر بخشی آن روی رده سلولی *Hela* و سلول‌های لنفوسیت خون محیطی داشتند. رشد سلول‌های بدخیم در اثر این عصاره مهار شد. این عمل مهارتی در رشد سلول‌ها به وسیله‌ی تجمع DNA در فاز sub-G1 چرخه سلولی و القای آپوپتوز با افزایش بیان ژن *Bax* و شکست در آنزیم PARP صورت گرفت (۱۵).

در سال ۲۰۱۳، پژوهشی با هدف بررسی اثر عصاره‌ی گیاه اسطوخودوس بر روی تکثیر سلول‌های لنفوسیت در بیماران مبتلا به لنفومای هاجکین توسط دلیلان و همکاران انجام شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تیمار سلول‌های لنفوسیت در افراد مبتلا با این عصاره منجر به افزایش آپوپتوز و کاهش قدرت بقا در این سلول‌ها می‌شود (۱۶).

در سال ۲۰۱۵، پژوهش دیگری توسط Cerchiara و همکاران صورت گرفت که در آن اثر لینالول بر رده سلولی RPMI 7932 ملانومای انسانی مورد بررسی قرار گرفت. لینالول یکی از اجزای اولیه‌ی گیاه اسطوخودوس می‌باشد. با بررسی سطح پروتئین آنزیمی Caspase-3، نتایج حاصل شد که نشان داد تیمار سلول‌های ملانوما با

۲- تا ۴/۵ میلی‌ولت نشان داده شده است (شکل ۴). همچنین میزان تحرک و جابه‌جایی الکتروفورتیک نیز برابر با $0/000035 \text{ cm/Vs}$ می‌باشد.

نتایج آنالیز طیف‌های مادون قرمز

بررسی طیف مادون قرمز برای اسانس روغنی گیاه اسطوخودوس (شکل ۵) نشانگر پیک‌های شاخصی از جمله $3660/41 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه عاملی O-H، $1743/1 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی C-H، $1743/1 \text{ cm}^{-1}$ مشخصه استرالیفاتیک (ارتعاش کششی گروه عاملی C=O)، $1463/04 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش خمشی CH_2 ، $1374/89 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به CH_2CH_3 در گروه عاملی RCH_2CH_3 می‌باشد. ارتعاشات کششی گروه‌های عاملی P-O-C و P=O موجود در ساختار اسانس، پیک‌هایی در فرکانس $1214/88 \text{ cm}^{-1}$ و $982/51 \text{ cm}^{-1}$ را نشان می‌دهند. با مقایسه طیف FTIR نانولیپوزوم حاوی اسانس اسطوخودوس و نانولیپوزوم فاقد اسانس، پیک‌های شاخص $3372/41 \text{ cm}^{-1}$ ، $2295/87 \text{ cm}^{-1}$ ، $1641/68 \text{ cm}^{-1}$ ، $1058/15 \text{ cm}^{-1}$ که به ترتیب نشان دهنده گروه‌های عاملی O-H، P-H، فسفورین، ارتعاش کششی C=O و C-O می‌باشد که به فرکانس‌های $3328/19 \text{ cm}^{-1}$ ، $2297/72 \text{ cm}^{-1}$ و $635/87 \text{ cm}^{-1}$ در طیف FTIR نانوحامل حاوی اسانس انتقال یافته است که این تغییرات و جایجایی‌های جزئی دلالت بر انکپسوله شدن اسانس در نانولیپوزوم دارد و از آنجا که در طیف FTIR سامانه لیپوزومی حاوی اسانس هیچ پیک جدیدی ایجاد نشده و پیکی هم ناپدید نشده، بنابراین میان سامانه و اسانس فعل و انفعال شیمیایی رخ نداده و هردو، ماهیت خود را حفظ نموده و دستخوش تغییر نشده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده حاصل از این طرح پژوهشی نشان می‌دهد که نانولیپوزوم‌های با فرمولاسیون مشخص، حامل اسانس اسطوخودوس با غلظت $0/5 \text{ mg ml}^{-1}$ می‌باشد.

مجدی‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۸، نانولیپوزوم‌های حامل اسانس نعنا فلفلی را سنتز نمودند که اندازه‌ی لیپوزوم‌ها برابر ۲۴۷ نانومتر، راندمان کپسولاسیون ۶۱/۳۸ درصد، پتانسیل زتا ۰/۷۴ میلی‌ولت و شاخص پراکندگی برابر با ۰/۳۲ بود (۲۲). در پژوهش حاضر، برای اولین بار اسانس گیاه اسطوخودوس در حامل‌های نانولیپوزومی بارگذاری شد، که این امر به منظور افزایش پایداری و ماندگاری اسانس، بهبود عملکرد اسانس به عنوان دارو انجام گرفت. با توجه به آنالیز حاصل از طیف سنجی جرمی، اسانس اسطوخودوس شامل ترکیبات اصلی Eucalyptol، Cyclohexene-1-methyl، Terpinen-4-ol و 2-Bornanone (+) می‌باشند، که این ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی بوده که می‌تواند رشد سلول‌های سرطانی را سرکوب نموده و یا تا حد قابل قبولی کاهش دهد. بررسی‌های پیشین نیز، نشان از اهمیت این گیاه، به لحاظ خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی آن می‌باشد. علاوه بر این، فرمولاسیون لیپوزوم‌ها به گونه‌ای است که فیلم ساخته شده به خوبی هیدراته شده و وزیکول‌های بهتری تولید می‌شود. این امر می‌تواند مربوط به طول زنجیره‌ی هیدروکربنی کلسترول باشد، زیرا هرچه طول زنجیره هیدروکربنی بیشتر باشد، حلالیت در چربی بیشتر می‌شود و در نتیجه نفوذپذیری بین لایه‌ها افزایش یافته و داروی بیشتری به دام می‌اندازد. با این وجود اگر درصد کلسترول در فرمولاسیون افزایش یابد ساختار بیش از اندازه محکم شده و موجب کاهش میزان رهایش دارو از نانوذرات می‌شود. از این رو، نانوحامل‌های لیپوزومی حاوی اسانس روغنی گیاه اسطوخودوس، دارای راندمان انکپسولاسیون بالا و دارای پروفایل رهایش آهسته و کنترل شده در شرایط دمایی و pH سلول‌های نرمال و سرطانی می‌باشند. این امر نیز نشان دهنده‌ی پایداری نانولیپوزوم‌های بعد از ۷۲ ساعت بود. هر چند که میزان رهایش در شرایط اسیدی و دمایی بالاتر (شرایط سلول‌های

لینالول، منجر به افزایش بیان این آنزیم و به دنبال آن افزایش میزان آپوپتوز می‌گردد (۱۷).

علاوه بر پژوهش‌های فوق، که اهمیت اسانس گیاه اسطوخودوس را عنوان می‌دارد، مطالعات دیگری نیز انجام گرفته است که اهمیت نانو حامل‌های زیستی در دارورسانی با کاهش غلظت داروی مصرفی و افزایش عملکرد آن دارو مشخص می‌کند. از جمله این موارد پژوهش Cheng J و همکاران بود که دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم را در ترکیب با فسفامید در درمان سرطان سینه به کار برد که داروی محصور اثر سمیت بالاتری را نسبت به داروی آزاد نشان داد (۱۸).

Haiying Cui و همکاران در سال ۲۰۱۵، اسانس گیاه میخک را در حامل‌های لیپوزومی انکپسوله کردند که اندازه‌ی ذرات بین ۷۸/۳ تا ۱۵۶/۱ نانومتر بود. همچنین شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و میزان انکپسولاسیون برای ذرات به ترتیب برابر با ۰/۱۹۶، ۰/۲۴/۵ میلی‌ولت و ۲۰/۴۱ درصد گزارش شد (۱۹).

صحرا بشیری و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵، اسانس گیاه گزنه را با غلظت‌های مختلف فسفاتیدیل کولین و کلسترول لیپوزومال نمودند و ذراتی با اندازه‌ی ۸۱ تا ۹۴ نانومتر سنتز کرده که درصد بارگذاری اسانس در نانو ذره برابر با ۶۸/۸۳ درصد و شاخص پراکندگی آن ۰/۳ بود (۲۰).

حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۶، نانوذرات لیپیدی حامل اسانس زنیان تهیه نمودند، که میزان درون پوشانی، اندازه و بار الکتریکی ذرات به ترتیب برابر با ۳۵/۶ درصد، ۱۸۶/۱ نانومتر و ۱- تا ۶/۷ میلی‌ولت بود (۱۳).

قره‌نقده و همکاران در سال ۲۰۱۶، با انکپسوله کردن اسانس گیاه مریم گلی در نانولیپوزوم، ابتدا نانوذرات را از نظر فرمولاسیون بهینه نموده که اندازه، پراکندگی ذرات و درون پوشانی آنها به ترتیب برابر با ۸۲ تا ۸۸ نانومتر، ۰/۳۹ تا ۰/۴۲ و ۷۰ درصد گزارش شد (۲۱).

سرطانی) بیشتر است و این ویژگی مربوط به ناپایداری غشاء و نفوذپذیری بیشتر آن باشد. علاوه بر این، اندازه‌ی نانولیپوزوم‌ها کوچک بوده که این امر نیز می‌تواند مرتبط با درصد کلسترول مورد استفاده در این فرمول باشد. هرچه میزان کلسترول بیشتر باشد میزان بارگذاری اسانس کمتر و سایز نانو ذرات کوچک‌تر است و هرچه میزان کلسترول کمتر باشد، میزان بارگذاری اسانس بیشتر و سایز نانو ذره بزرگ‌تر است. با این وجود این ویژگی نیز خیلی مناسب نیست، چون می‌تواند موجب نشت دارو شود. وجود PEG در این فرمولاسیون، می‌تواند داروی بیشتری را درون سامانه وارد کند قرار گرفتن کلسترول در دولایه، باعث افزایش تراکم مولکول‌های فسفولیپیدی شده و همچنین منجر به سفتی ساختار می‌شود. با این تفاسیر فرمول استفاده شده در این پژوهش، بسیار بهینه می‌باشد. بار الکتریکی بین ۲- تا ۴/۵- میلی‌ولت می‌باشد، که با این مقدار از بارالکتریکی، میتوان نانو ذرات را تقریباً خنثی در نظر گرفت. عدم برهمکنش بین اسانس روغنی اسطوخودوس و سامانه و پراکنش هم‌گن نانوذرات حامل از دیگر ویژگی‌های مناسب این نانولیپوزوم‌ها است.

نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس روغنی اسطوخودوس با فرمولاسیون تهیه شده دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد درد می‌باشند. از این رو می‌توانند به عنوان یک داروی ضد سرطان تحت توسعه قرار بگیرد. با این وجود مطالعات بیشتر جهت بررسی سمیت سلولی و تاثیر این اسانس کپسوله شده بر روی بیان ژن‌های دخیل در نئوپلازی و آپوپتوز باید انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل یک طرح پژوهشی بوده که هزینه آن بر عهده شخص نویسندگان می‌باشد. از دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، دانشگاه یزد و شرکت ریز زیست فناوران فردانگر واقع در پارک علم و فناوری یزد، به جهت همکاری‌های علمی، قدردانی می‌شود.

References

1. Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012;2(2):303-36.
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. *Pathobiology Research*. 2016;19(1):13-27.
3. Amin A, Gali-Muhtasib H, Ocker M, Schneider-Stock R. Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs. *International journal of biomedical science: IJBS*. 2009;5(1).
4. Swamy MK, Sinniah UR. Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.): botany, agrotechnology and biotechnological aspects. *Industrial Crops and Products*. 2016;87:161-76.
5. Mohanty SK, Swamy MK, Sinniah UR, Anuradha M. *Leptadenia reticulata* (Retz.) Wight & Arn. (Jivanti): botanical, agronomical, phytochemical, pharmacological, and biotechnological aspects. *Molecules*. 2017;22(6):1019.
6. Bhalla Y, Gupta VK, Jaitak V. Anticancer activity of essential oils: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013;93(15):3643-53.
7. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*. 2017;4(3):58.
8. Daraee H, Etemadi A, Kouhi M, Alimirzalu S, Akbarzadeh A. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2016;44(1):381-91.
9. Dahiya M, Dureja H. Recent developments in the formulation of nanoliposomal delivery systems. *Current nanomaterials*. 2018;3(2):62-74.
10. Lee Y, Thompson D. Stimuli responsive liposomes for drug delivery. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2017;9(5):e1450.
11. Coradini K, Lima F, Oliveira C, Chaves P, Athayde M, Carvalho L, et al. Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2014;88(1):178-85.
12. Majdizadeh M, Rezaei Zarchi S, Movahedpour AA, Shahi Malmir H, Sasani E, Haghirsadat BF. A new strategy in improving therapeutic indexes of medicinal herbs: preparation and characterization of nano-liposomes containing *Mentha piperita* essential oil. *SSU_Journals*. 2018;25(11):853-64.
13. Haghirsadat F, Azhdari M, Kalantar SM, Naderinezhad S, Teymourizadeh K, Yazdani M, et al. Strategy of Improvements in the therapeutic index of medicinal herbs of Iranian indigenous: Synthesis and characterization of phospholipid lipid-based vesicles incorporated *Trachyspermum copticum*. *SSU_Journals*. 2016;24(6):468-78.
14. Mäder K, Mehnert W. Solid lipid nanoparticles - concepts, procedures, and physicochemical aspects. *Liposomes in*

- drug targets and delivery: approaches, methods, and applications: CRC Press; 2004:1-22.
15. Amiri A, Tayarani-Najaran Z, Karimi G, Mousavi S. Evaluation of *Lavandula angustifolia* cytotoxic and apoptotic effects on human cervical cancer cell line (Hela) in compare with normal cells. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2012;7(5):141.
 16. Dalilan S, Rezaei-Tavirani M, Nabiuni M, Heidari-Keshel S, Azodi MZ, Zali H. Aqueous extract of Lavender *angustifolia* inhibits lymphocytes proliferation of Hodgkin's lymphoma patients. *Iranian journal of cancer prevention*. 2013;6(4):201.
 17. Cerchiara T, Straface S, Brunelli E, Tripepi S, Gallucci MC, Chidichimo G. Antiproliferative effect of linalool on RPMI 7932 human melanoma cell line: ultrastructural studies. *Natural product communications*. 2015;10(4):1934578X1501000401.
 18. Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu FX, et al. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*. 2007;28(5):869-76.
 19. 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.
 20. Angelova MI, Dimitrov DS. Liposome electroformation. *Faraday discussions of the Chemical Society*. 1986;81:303-11.
 21. Barakat F, Aboee-Mehrizi F, Haghirsadat BF, Sedighi-Khavidak S, Ashkezari MD. Designing and optimization of liposomal nano-carriers containing *Nepeta persica* extract and study of its cytotoxicity on the breast cancer cell line (MCF-7). *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 2019.
 22. Majdizadeh M, Rezaei Zarchi S, Movahedpour AA, Shahi Malmir H, Sasani E, Haghirsadat BF. A new strategy in improving therapeutic indexes of medicinal herbs: preparation and characterization of nanoliposomes containing *Mentha piperita* essential oil. *J Shahid Sadoughi Uni- Med Sci Yazd* 2018; 25(11): 853-64. (In Persian)

The Synthesis and Characterization of Liposomal Nano-Carriers Loading *Lavandula angustifolia* Essential Oil to Affect Breast Cancerous Cell-Lines

Mohammadpanah M¹, Mojodi E¹, Haghirsadat-F^{*2}, Ehsani R³

1. Biology Department, Science Faculty, Yazd University, Yazd, Iran

2. Department of Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran, Fhaghirsadat@gmail.com

3. Medical Nanotechnology & Tissue Engineering Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Received: Feb. 22, 2020

Accepted: Apr. 5, 2020

Abstract

Background: According to the progressive trend of herbal application in modern medicine, various studies have shown several properties for *Lavandula angustifolia* essential oil such as antioxidant, anti-bacterial, and anti-inflammatory effects. Nano liposomes are able to enhance the performance of bioactive agents by improving their solubility and stability. The aim of this study is the synthesis nanoliposomal systems containing *Lavandula angustifolia* essential oil to achieve a greater efficiency in drug delivery and improve the therapeutic functionality.

Material and Method: The essential oil of *Lavandula angustifolia* was obtained by a cleverger instrument using hydrodistillation method. The essential oil was analyzed by gas-mass chromatography. Liposomes were prepared using the thin-film hydration technique. Nano-vesicles were evaluated by several techniques such as entrapment efficiency, size, zeta potential, release kinetic profile and surface morphology.

Results: The nanoliposomes under the suitable conditions exhibited high entrapment efficiency of essential oil (60 ± 3.4 %), low average size (68.3 ± 7.28) nm, and an approximately neutral surface charge (-2 to -4.5 mV). The study of its releasing has also indicated controlled release by both 37°C in pH=7.4, and 42°C in pH=5.4 (63.98% and 87.63%). Moreover, the results of electron microscopy of nanoliposomes showed stability without a great increase in their particle sizes and spherical shape.

Conclusion: Based on the achieved results, it was indicated that the liposomal nanovesicles could be a suitable carrier for the delivery of *Lavandula angustifolia* essential oil in conditions of cancerous cells. However, further studies are required to identify toxicity on human cancerous and normal cells.

Keywords: herbal medicine, *Lavandula Angustifolia* essential oil, liposome, nano-carrier.

***Citation:** Mohammadpanah M, Mojodi E, Haghirsadat F, Ehsani R. The Synthesis and Characterization of Liposomal Nano-Carriers Loading *Lavandula angustifolia* Essential Oil to Affect Breast Cancerous Cell-Lines. *Yafte*. 2020; 22(1):84-95.