DOI: 10.22100/jkh.v18i4.2918

مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۸، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۲

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

مقاله پژوهشی

فرمولاسیون نانو سامانه‌ی لیپیدی حاوی اسانس زنجبیل جهت اثرگذاری بر سلول‌های سرطانی و ارزیابی میزان سمیت سلولی آن علیه سرطان تخمدان (رده سلولی A-2780)

نرگس نیکونهاد[۱]، میلاد اخلاقی[۲]، مریم انتظاری[۳]، شایسته شهریاری[۴]، بی‌بی فاطمه حقیرالسادات[۵*]

۱- دکتری زیست‌شناسی تکوینی، دانشگاه خوارزمی و عضو هیأت علمی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه علم و هنر، یزد.

۲- کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

۳- کارشناسی ارشد بیولوژی، دانشگاه پیام نور تفت، تفت، ایران.

۴- کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی، گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

۵- مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، پژوهشکده علوم تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۹، **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۱۱/۲۴

چکیده

مقدمه: *سرطان تخمدان در میان بانوان از مهمترین و البته کشنده‌ترین انواع سرطان است. شیمی درمانی به‌عنوان اصلی‌ترین روش درمان سرطان، علاوه عوارض جانبی بالا در بسیاری از موارد ناکارآمد است. استفاده از گیاهان دارویی و اسانس آنها به‌عنوان یک روش جایگزین نیز با چالش‌هایی روبه‌رو است، که با امروزه با استفاده از نانوذرات دارورسان مانند لیپوزوم، سعی بر غلبه بر این چالش‌ها داریم. لذا هدف از مطالعه‌ی حاضر، ساخت و مشخصه‌یابی نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس زنجبیل و بررسی اثر سمیت آن بر روی سلول‌های سرطانی رده‌ی A-2780 سرطان تخمدان و مقایسه آن با فرم آزاد اسانس است.*

مواد و روش‌ها: *پس از استخراج اسانس گیاه زنجبیل با دستگاه کلونجر، لیپوزوم‌های حاوی اسانس زنجبیل به روش فیلم نازک سنتز گردیدند و اسانس درون آنها با روش هیدراتاسیون بارگذاری گردید. سپس میزان درونگیری و بررسی رهایش اسانس از لیپوزوم با روش اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوسامانه‌ی سنتز شده مثل سایز، بار الکتریکی، مورفولوژی و عدم برهم‌کنش اسانس و لیپوزوم با استفاده از روش‌های DLS، SEM و FTIR مورد بررسی قرار گرفت و در آخر نیز سمیت نانو سامانه‌ی سنتز شده بر روی سلول‌های سرطانی تخمدان با استفاده از تکنیک MTT سنجش شد.*

نتایج: *در این پژوهش ما موفق به ساخت نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس زنجبیل با میزان انکپسولاسیون ۳/۲۱±۵۶/۴۱، اندازه ۴/۳۸ ± ۸۵/۷۲ نانومتر، شاخص پراکندگی ۰/۵۸ ± ۱/۴۸ و بار الکتریکی ۱/۱۹ ± ۱۹/۱۷- با مورفولوژی مناسب شدیم که دارای رهایش آهسته و نیمه هدفمند بودند. همچنین حداکثر میزان رهایش اسانس از نانوسامانه در طی ۴۸ ساعت برابر با ۲/۴۱ ± ۶۲/۵٪ بود. نانوسامانه و اسانس نیز فاقد بر هم‌کنش شیمیایی با یکدیگر بودند و همچنین لیپوزومه کردن اسانس سبب افزایش خاصیت ضدسرطانی آن در مقایسه با فرم آزاد آن بر روی سلول‌های سرطانی تخمدان گردید بود.*

نتیجه‌گیری: *نتایج مطالعه‌ی فوق نشان داد، می‌توان از نانولیپوزوم‌های سنتز شده با خواص فیزیکوشیمیایی مناسب به‌عنوان حاملی مناسب جهت رسانش اسانس زنجبیل به سلول‌های سرطانی استفاده گردد.*

واژه‌های کلیدی: سرطان تخمدان، اسانس زنجبیل، نانو لیپوزوم، میزان انکپسولاسیون.

***نویسنده مسئول:** یزد، بلوار صفاییه، مرکز پزشکی بازساختی دانشگاه علوم پزشکی یزد. ایران، **تلفن:** ۰۹۱۳۲۵۰۷۱۵۸، **نمابر:** ۰۹۱۳۲۵۰۷۱۵۸، **Email:** Fhaghirosadat@gmail.com

ارجاع: نیکونهاد نرگس، اخلاقی میلاد، انتظاری مریم، شهریاری شایسته، حقیرالسادات بی‌بی فاطمه. فرمولاسیون نانو سامانه‌ی لیپیدی حاوی اسانس زنجبیل جهت اثرگذاری بر سلول‌های سرطانی و ارزیابی میزان سمیت سلولی آن علیه سرطان تخمدان (رده سلولی A-2780). مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۲؛۱۸(۴):۱۱-۱.

CC BY NC

مقدمه

سرطان یک جنگ دایمی در سطح جهانی است و تاکنون، پیشرفت زیادی در درمان و پیشگیری داشته است. این بیماری توسط گروهی از سلول‌های بدن انسان که به‌واسطه ناتوانی در کنترل رشد یا توقف آن، به‌طور مداومی تکثیر می‌شوند، ایجاد می‌شود. در نتیجه، می‌توانند تومورهایی از سلول‌های بدخیم با پتانسیل متاستاز تشکیل دهند. سرطان تخمدان دارای بالاترین میزان مرگ و میر در میان سرطان‌های منحصر به زنان است. هرساله حدود ۲۲۵۰۰۰ مورد جدید سرطان تخمدان تشخیص داد می‌شود و در حدود ۱۴۰ هزار مرگ و میر در سراسر جهان برای آن برآورد می‌شود (۱). این میزان زیاد از مرگ و میر به‌واسطه‌ی وجود میزان قابل توجهی ناهمگونی سلولی و مولکولی که توسط تومورهای تخمدان (از جمله آنهایی که از لوله‌های فالوپ و صفاق تشکیل شده‌اند) ایجاد می‌گردد. امروزه سرطان تخمدان دیگر به‌عنوان یک بیماری منفرد با مورفولوژی متغیر در نظر گرفته نمی‌شود، بلکه به‌عنوان مجموعه‌ای از نئوپلاسم‌ها که هر کدام دارای ساختار بافتی و پاسخ به درمان متفاوت است، شناخته می‌شود (۲ و ۳). درمان‌های رایج سرطان تخمدان شامل شیمی درمانی، پرتودرمانی، داروهای شیمیایی مشتق شده، جراحی و یا ترکیبی از این درمان‌ها است (۴). درمان‌هایی مانند شیمی درمانی می‌تواند بیماران را تحت فشار زیادی قرار دهد و به‌واسطه وجود عوارض جانبی، سبب بروز آسیب‌های بیشتری در آنها گردد. بنابراین امروزه، تمرکز زیادی روی استفاده از درمان‌های جایگزین وجود دارد. در حال حاضر، از بسیاری از گونه‌های گیاهی برای جلوگیری از رشد سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود و محققان گونه‌هایی از این گیاهان را شناسایی کرده‌اند که خواص ضدسرطانی قابل توجهی را از خود نشان می‌دهند (۵ و ۶).

داروهای گیاهی از زمان‌های قدیم به‌طور گسترده‌ای در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گرفتند. پیشرفت علوم فیتوشیمیایی و فیتوفارموکولوژیک، سبب آشکار شدن ترکیب و فعالیت‌های بیولوژیکی محصولات گیاهی دارویی شده است. اثربخشی بسیاری از گونه‌های گیاهان دارویی بستگی به وجود ترکیبات فعال دارد. اکثر عناصر فعال بیولوژیکی گیاه، مانند فلاونوئیدها، تانن‌ها و terpenoids، در آب بسیار محلول‌اند، اما دارای جذب کم می‌باشند، چرا که آنها قادر به عبور از غشاهای لیپیدی سلول‌ها نبوده و به علاوه دارای اندازه مولکولی بیش از حد بزرگ و یا جذب ضعیف می‌باشند که منجر به از دست رفتن دسترسی زیستی و کاهش اثربخشی آنها می‌گردد (۷ و ۸).

در چند دهه گذشته، تمرکز قابل توجهی بر توسعه سیستم‌های دارورسانی نوین به خصوص برای داروهای گیاهی و مشتقات آنها صورت گرفته است. حامل‌های جدید باید بتوانند به‌طور ایده آلی دو شرط لازم را برآورده کنند. در ابتدا باید رسانش دارو با دوز موردنیاز، در طی دوره درمانی را انجام دهند. سپس، باید مقدار فعالی از دارو را به محل عملکردش هدایت کنند (۹). به‌طور گسترده‌ای پیشنهاد شده است که داروهای گیاهی با فناوری نانو و نانوحامل‌ها ترکیب شوند، زیرا سیستم‌های نانوساختار ممکن است، باعث بهبود عملکرد اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی، کاهش دوز مصرفی و عوارض جانبی و در مجموع تقویت فعالیت آنها گردد (۱۰). نانو فناوری یک علم میان رشته‌ای است و کاربردهای وسیعی در بیولوژی سرطان مانند شناسایی تومور، کشف نشانگرهای زیستی سرطان و گسترش درمان‌های جدید دارد. استفاده از فناوری نانو این امید را فراهم می‌کند که در جوامع در حال توسعه، راهکارهای جدیدی برای درمان سرطان پیدا شود. نانوذرات به‌صورت کلی، دارای ابعاد در حد چند صد نانومتر هستند و دارای تعامل با مولکول‌های زیستی می‌باشند (۸).

لیپوزوم‌ها به‌عنوان یکی از نانوحامل‌ها، حین شکل‌گیری قادر هستند هر ماده‌ای اعم از DNA، RNA، پروتئین و حتی مولکول‌های کوچکی همچون نوکلئوتیدها و یون‌های چند ظرفیتی را به دام بیندازد. این مزیت بزرگ لیپوزوم‌ها این امکان را فراهم می‌کند که انتقال دارو به سلول هدف به دقت انجام گیرد. یکی از ترکیباتی که می‌توان با استفاده از لیپوزوم و برای درمان هدفمند به سلول‌ها منتقل کرد، ترکیبات گیاهی است که می‌تواند درون سلول‌ها تنظیماتی را در سطوح مختلف انجام دهد (۱۱).

زنجبیل، ریشه Zingiber officinalis، یکی از گونه‌های خانواده زنجبیل است که به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. تاریخچه مصرف دارویی زنجبیل به ۲۵۰۰ سال پیش برمی‌گردد. ماده مؤثره این گیاه، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی است که از بدن در برابر آسیب‌های سلولی ایجاد شده ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند (۱۲ و ۱۳). مواد اصلی زنجبیل عبارتند از والینوئیدهایی شامل ۶-gingerol، 6-paradol، shogaols و zinerone. زنجبیل شامل ترکیبات فنلی فعالی مانند gingerol، paradol و shogoal بوده که دارای خواص آنتی‌اکسیدان، ضدسرطان، ضدالتهاب، ضد آنژیوژنز و anti-arterosclerotic می‌باشند (۱۴). ۶-gingerol می‌تواند پایداری سلول‌های سرطانی معده را کاهش داده و گسترش سرطان را محدود کند (۱۵ و ۱۶). ماده مؤثره این گیاه رشد سلول‌های سرطانی را کاهش می‌دهد و اثر بخشی داروهای مربوط به شیمی درمانی را نیز افزایش می‌دهد. فلاونوئیدها گروه دیگری از ترکیبات موجود در زنجبیل هستند که علاوه بر خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی (به علت وجود ترکیب بوتانول)، موجب تثبیت غشای سلولی و افزایش گلوتاتیون سلولی می‌شوند و احتمالاً در کاهش قند خون و بهبود متابولیسم کبدی نیز تأثیرگذار می‌باشند (۱۲ و ۱۷).

با توجه به خواص ضدسرطانی زنجبیل و همچنین مزایای گسترده استفاده از لیپوزوم‌ها به‌عنوان حامل‌های دارویی، هدف از انجام این مطالعه، سنتز و مشخصه‌یابی فرمولاسیون نانو سامانه‌ی لیپیدی حاوی اسانس زنجبیل جهت اثرگذاری بر سلول‌های سرطانی و ارزیابی میزان سمیت سلولی آن علیه

سرطان تخمدان (رده سلولی A2780) و مقایسه آن با حالت آزاد اسانس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ای از گیاه موردنظر پس از تهیه، توسط سازمان جهاد کشاورزی استان یزد مورد تأیید قرار گرفت. نمونه موردنظر با نام علمی Zingiber Officinale جهت استخراج اسانس مورد استفاده قرار گرفت. مواد مورد استفاده در این تحقیق، فسفاتیدیل کولین سویا (۸۰٪) از شرکت Lipoid GmbH (آلمان)، پلی اتیلین گلیکول ۲۰۰۰ (DSPE-mPEG2000) (Nanocs Inc., USA)، کلسترول (Sigma-Aldrich Co., USA)، قند مالتوز (Sigma-Aldrich Co., USA)، اتانول و کلروفرم از شرکت Merck (آلمان) و کیسه دیالیز (MV=12 kDa) بودند.

برای تهیه اسانس زنجبیل، از روش تقطیر با آب و دستگاه کلونجر استفاده شد. پس از توزین، گیاه پودر شده به درون ظروف بالن ریخته و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. پس از ۳ ساعت اسانس‌گیری اسانس حاصل جمع‌آوری گردید. اسانس خالص تهیه شده برای استفاده‌های بیشتر در شرایط تاریک و دور از جریان هوا نگهداری شد.

برای تهیه نمودار کالیبراسیون ابتدا ۰/۰۰۵ گرم اسانس زنجبیل در ۵cc حلال متانول حل شد. سپس غلظت‌های مشخصی از آن با ایزوپروپانول و PBS تهیه شده و میزان جذب غلظت‌ها با استفاده از دستگاه اسپکترو فوتومتر توسط طیف‌سنج ماورای بنفش مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به غلظت‌ها و جذب‌دهی متناظر حاصل با استفاده از نرم‌افزار Excel منحنی استاندارد رسم شد.

فرآیند تهیه لیپوزوم حاوی اسانس زنجبیل به روش آبدهی فیلم نازک لیپیدی انجام شد که در آن فیلم نازک لیپیدی با تبخیر حلال آلی تشکیل گردید و بعد از تماس فیلم نازک با آب، نمونه حل شده و فاز وزیکولی ایجاد گردید. این بخش شامل مراحل زیر می‌باشد:

فاز لیپیدی شامل (SPC 80: CHOL: mPEG2000-DSPE) بوده و با نسبت (۷۰:۳۰:۳) مورد استفاده قرار گرفت. PEG، پلیمری مؤثر در جلوگیری از فرآیند جذب توسط پروتئین‌ها می‌باشد. تأثیر تثبیت میکرومولکول‌های PEG بر سطح حمل‌کننده‌های دارو در افزایش زمان گردش و بهبود دسترسی زیستی لیپوزوم‌ها به خوبی شناخته شده است. در نمونه اصلی، فاز لیپیدی با نسبت مولی مشخص به همراه اسانس زنجبیل در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول خالص اضافه و حل گردید. سپس فاز آلی محلول حاصل با استفاده از دستگاه تبخیرکننده دوار در دمای حدود ۴۵ درجه و با دور تقریبی ۱۵۰ rpm، حذف گردید و فیلم نازک لیپیدی تشکیل شد. همچنین جهت اطمینان از حذف کامل حلال، فیلم نازک لیپیدی چندین دقیقه با گاز نیتروژن هوادهی گردید (۱۸).

۰/۳ گرم قند مالتوز در بافر HEPES (10mM) حل گردید. مالتوز به‌عنوان ماده محافظ در برابر دمای پایین از ساختار لیپوزوم‌ها به ۳ صورت محافظت می‌کند. ۱) مانع بهم آمیختگی لیپوزومی می‌گردد. ۲) مانع از هم‌گسیختگی دو لایه توسط کریستال‌های یخ می‌شود. ۳) یکپارچگی لایه‌های لیپوزومی را در غیاب آب حفظ می‌نماید.

سپس بافر HEPES دارای ترکیب قندی برای هر نمونه به بالن ته گرد حاوی فیلم نازک لیپیدی اضافه و کاملاً تکان داده شد. برای تهیه و تثبیت لیپوزوم حاوی فسفولیپید، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه قبل از ذخیره‌سازی در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد نگه داشته شد. بدین منظور بالن حاوی محلول فاز آبی روی دستگاه تبخیرکننده دوار با دمای ۴۵ درجه سانتیگراد و دور ۱۰۰ rpm قرار داده شد.

از روش سونیکاسیون برای کاهش اندازه لیپوزوم‌های MLV (multilamellar vesicles) و تشکیل SUV (small unilamellar vesicles) استفاده گردید. برای کاهش سایز لیپوزوم‌های MLV، پروب دستگاه سونیکه‌کننده در داخل محلول کلوئیدی لیپوزوم‌ها که داخل ظرف یخ بودند، قرار داده شد و سپس فرآیند سونیکاسیون با توان ۴۰٪ و ۶۰٪ (Amplitude) به مدت ۱۵ دقیقه (۷ ثانیه روشن و ۱۰ ثانیه خاموش) انجام گرفت (۱۰).

قبل از فیلترکردن، ناخالصی و مواد اضافی نمونه‌ها (همچون تیتانیوم حاصل از سونیکاسیون) با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه از محلول لیپوزومی جداسازی شد. (از آنجایی که جنس پروب‌های دستگاه سونیکه‌کننده از تیتانیوم است، در برخی موارد در هنگام سونیکاسیون پروبی ممکن است مقداری از تیتانیوم از پروب جدا و به‌عنوان ناخالصی به نمونه اضافه گردد.) به‌منظور جداسازی ذرات با اندازه بزرگ‌تر از ذرات کوچک‌تر و همگن شدن محلول به‌دست آمده در مرحله پیش فیلترکردن، از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر استفاده شد و در آخر جهت فیلترکردن استریل‌کننده، محلول از فیلتر با قطر حفرات ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد.

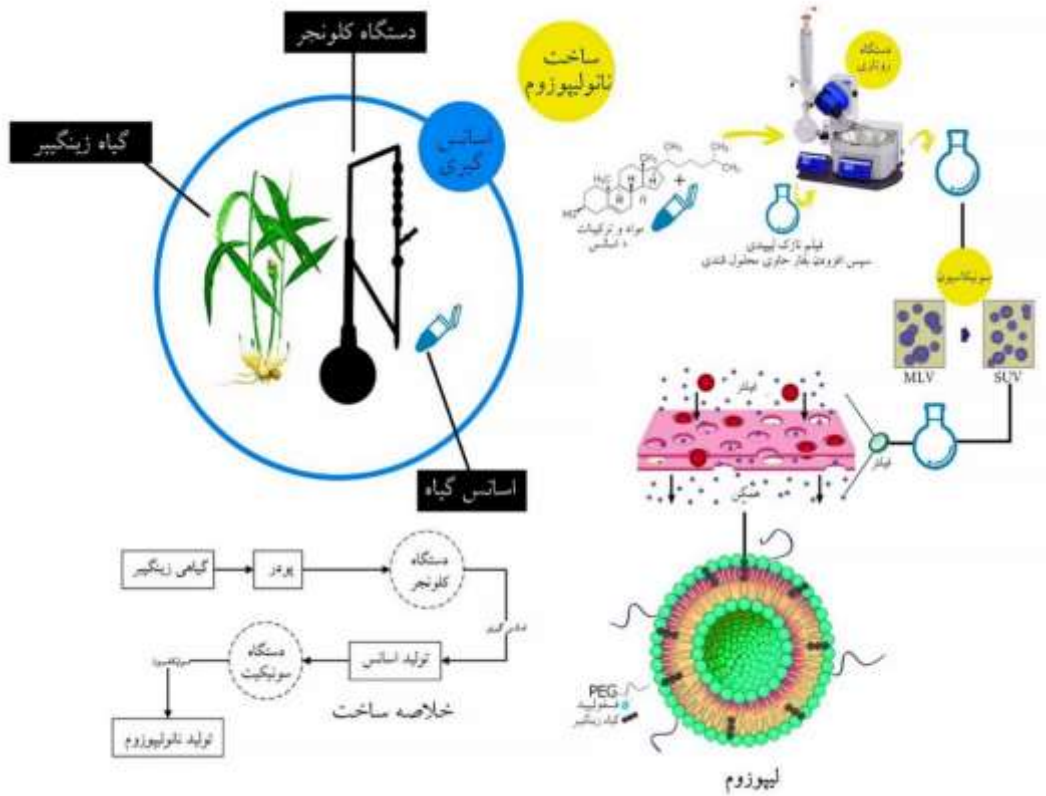
کلیه مراحل کار در شکل ۱ مشاهده می‌شود.

برای ساخت لیپوزوم‌های فاقد جهت ارزیابی سمیت سامانه بر روی سلول‌های بدن، مطابق مراحل بالا در فاز لیپیدی (SPC 80: CHOL: mPEG2000-DSPE) با نسبت (۷۰:۳۰:۳) در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول خالص به‌عنوان حلال و بدون اسانس با یکدیگر حل گشتند و سپس فاز آلی و سایر مراحل مطابق با آنچه در بالا ذکر شد، انجام شد.

پس از جداسازی داروی آزاد به روش کیسه دیالیز، سامانه‌های ساخته شده به نسبت ۱ به ۲۰ با دوپروپانول مخلوط شدند و سپس در مجاورت سونیکاتور حمامی قرار گرفته و به‌طور کامل شکسته شدند. مقدار اسانس محصور شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر فرابنفش و مقایسه آن با منحنی استاندارد اسانس و فرمول زیر ارزیابی گردید.

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

برای بررسی رهایش داروی گیاهی، حجم مشخصی از سامانه‌های حاوی دارو درون کیسه دیالیز سلولزی ریخته شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH= ۷/۴ (شرایط فیزیولوژیک بدن) در ۱۰میلی‌لیتر بافر قرار گرفت. نمونه‌گیری از بافر در زمان‌های ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد و نمونه توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر فرابنفش مورد ارزیابی قرار گرفت.



شکل ۱- تمامی مراحل از تهیه اسانس تا ساخت نانولیپوزوم

با استفاده از دستگاه نانو سایزر (Brookhaven Instruments Corporation, Germany) محدوده توزیع اندازه ذرات و همچنین پیک اندازه ذرات تعیین گردید. محدوده توزیع اندازه ذرات و همچنین قطر نانوذرات با استفاده از DLS (Dynamic Light Scattering) تعیین گردید که بدین منظور از دستگاه نانو سایزر Brookhaven Instruments Corporation (Germany) استفاده شد.

میزان بار سطحی و پتانسیل زتا نانو لیپوزوم‌ها با استفاده از دستگاه زتا سایزر شرکت Brookhaven Instruments Corporation (Germany) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری گردید. برای تعیین بار سطحی از ۲۰۰۰ میکرولیتر نمونه با غلظت ۰/۱ mg/ml استفاده گردید.

برای بررسی شکل و ساختار نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscope) استفاده شد.

گروه‌های عاملی سطح نالیپوزوم تولید شده توسط تجزیه و تحلیل طیف‌سنجی زیر (مادون) قرمز بررسی گردید. در طیف فروسرخ عمدتاً دو ناحیه مورد توجه است. ناحیه گروه عاملی از cm-1 ۱۵۵۰ تا ۴۰۰۰، ناحیه‌ای است که بیشتر کشش‌های پیوندی اتفاق می‌افتد. این ناحیه معمولاً تعداد نسبتاً کمی پیک دارد، اما بسیاری از پیک‌های آن مشخص‌کننده گروه‌های عاملی هستند. برای اطمینان از نبود داروی آزاد و مواد اضافی در نمونه نانولیپوزوم، از نمونه دیالیز شده نانولیپوزوم‌ها، استفاده گردید و به‌منظور کاهش رطوبت، حدود نیم ساعت نمونه در آون با دمای تقریبی ۶۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت.

سلول‌های A-2780 جزء رده‌های سلولی تخمدان انسان و از نوع سلول‌های چسبان می‌باشند. این رده سلولی به‌صورت فلاسک از بانک سلولی انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شد. سپس سلامت سلول‌ها و همچنین عدم آلودگی فلاسک مورد تأیید قرار گرفت. برای کشت سلول‌ها از محیط کشت DMEM غنی شده با ۱۰٪ FBS استفاده شد و سلول‌ها در انکوباتور (۳۷ درجه سانتیگراد با ۵٪ CO2 و رطوبت ۹۵٪) نگهداری شدند. پس از انجام ۳ پاساژ موفق، سلول‌ها به تعداد ۱۰۴ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ تایی کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت از کشت سلول‌های

A2780، این سلول در معرض غلظت‌های مختلفی از اسانس زنجبیل، لیپوزوم‌های فاقد اسانس و لیپوزوم‌های حاوی اسانس، طی مدت زمان ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت قرار داده شدند. سپس، جهت ارزیابی سمیت سلولی القا شده توسط ترکیبات فوق و میزان درصد بقای سلول‌ها، از آزمون Methyl Thiazol Tetrazolium (MTT) استفاده شد.

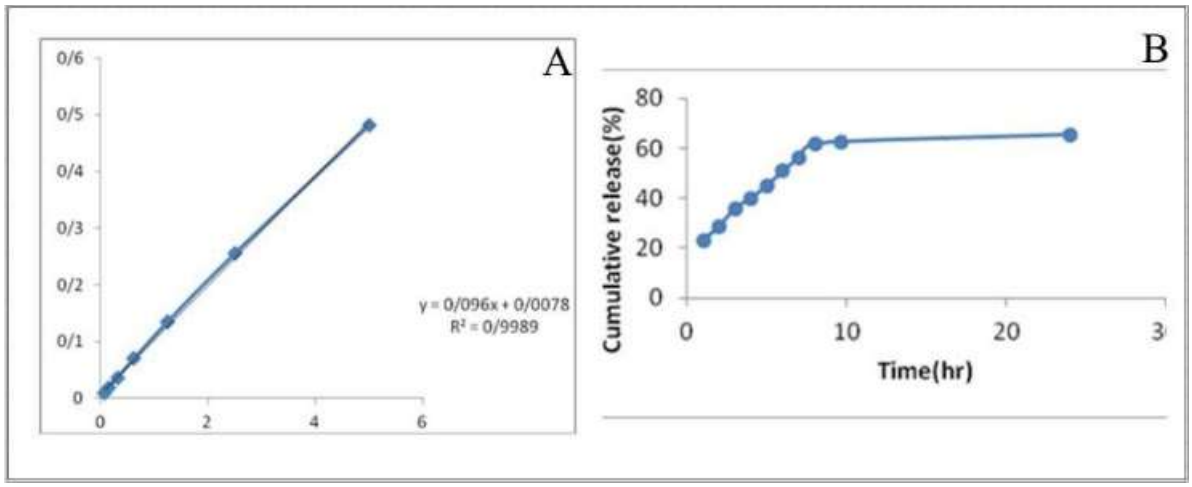
پس از گذشت زمان‌های موردنظر به هر چاهک مقدار کافی محلول ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند و پس از طی زمان لازم محیط کشت حاوی MTT به دقت خارج شده و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید تا بلورهای فورمازان حاصل شده، حل شوند. پس از گذشت مدت زمان ۱۵۰ دقیقه جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر (BioTek ساخت شرکت ویراژن) خوانده شد. سپس، درصد بقای سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\textbf{Cellular Viability}\ (\%) = \frac{\boldsymbol{Blank\ OD - Treatment\ OD}}{\boldsymbol{Blank\ OD - Negative\ Control\ OD}} \times \mathbf{100}$$

نتایج آزمون‌ها پس از ۴ بار تکرار و به‌صورت Mean ± SD ارایه شده است. محاسبه غلظت IC50 با استفاده از نرم‌افزار Origin انجام گردید. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS شده و از آزمون‌های آماری Duncan و Student's T-test برای تحلیل آماری داده‌ها استفاده گردید.

نتایج

با بررسی نمودار کالیبراسیون اسانس زنجبیل در ایزوپروپیل و نتایج حاصل از ارزیابی اسانس در لیپوزوم، راندمان انکپسولاسیون نانولیپوزوم‌های حاصل از این پژوهش ۳/۲۱ ± ۵۶/۴۱ درصد بوده است. همچنین با استناد به نمودار کالیبراسیون اسانس گیاه زنجبیل (شکل ۲A) در PBS، نمودار رهایش اسانس از نانوسامانه‌ی لیپوزومی رسم گردید (شکل ۲B)، که با توجه به نمودار رهایش مشخص می‌شود، نانو سامانه‌ی دارای اسانس، آهسته رهش بوده و رهایش کنترل شده‌ای داشته است، به گونه‌ای که ماکزیمم رهایش اسانس از این سامانه طی ۴۸ ساعت ۲/۴۱ ± ۶۲/۵ درصد بوده است. همچنین با بررسی روند رهایش اسانس از لیپوزوم‌ها می‌توان به این نتیجه رسید که رهایش دارو از یک الگوی ۲ فازی پیروی می‌کند. در فاز اول و در ۱۰ ساعت اول رهایش سریع و با شیب تند صورت می‌گیرد که به‌دلیل اختلاف غلظت دارو در درون نانو سامانه‌ی سنتز شده با بافر پیرامون می‌باشد و در فاز دوم رهایش با سرعت کمتر و شیب یکنواخت صورت می‌گیرد که به‌دلیل کاهش این اختلاف غلظت می‌باشد.



شکل ۲- (A) نمودار کالیبراسیون اسانس زنجبیل در بافر PBS. (B) نمودار رهایش اسانس از نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس

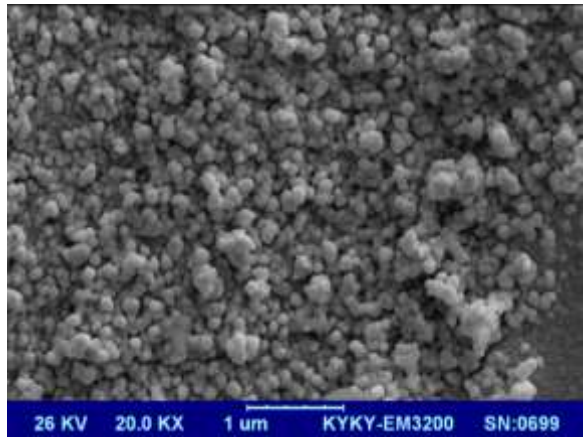
اندازه نانو لیپوزوم‌های تولیدی حاوی اسانس که به روش سونیکه کردن (با توان:۶۰٪ Amplitude) کاهش اندازه داده شد به‌طور میانگین با استفاده از دستگاه نانو سایزر اندازه‌گیری گردید. جدول ۱ تأثیر بارگذاری ترکیب دارویی بر اندازه نانو لیپوزوم‌های تولیدی را نشان می‌دهد. پتانسیل زتا سطح نانو لیپوزوم‌های تولیدی حاوی ترکیب دارویی که به روش سونیکه کردن (با توان: ۶۰٪ Amplitude) کاهش اندازه داده شده‌اند به‌طور میانگین با استفاده از دستگاه زتا سایزر اندازه‌گیری شد که در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- تأثیر بارگذاری اسانس بر اندازه نانولیپوزوم‌های تولیدی

	قبل از بارگذاری اسانس	بعد از بارگذاری اسانس
اندازه لیپوزوم	۵۲/۶ ± ۶/۵۴	۸۵/۷۲ ± ۴/۳۸
شاخص پراکندگی	۱/۲۵ ± ۰/۳۵	۱/۴۸ ± ۰/۵۸
بار لیپوزوم	-۳۲/۶ ± ۱/۳۶	-۱۹/۱۷ ± ۱/۱۹

در تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ الکترونیکی (SEM) (با توان ۲۵ کیلو ولت) نانو لیپوزوم‌های تولیدی حامل اسانس زنجبیل دارای اشکال کروی و ساختاری یکنواخت بودند. در ضمن نانولیپوزوم‌های سنتز شده دارای

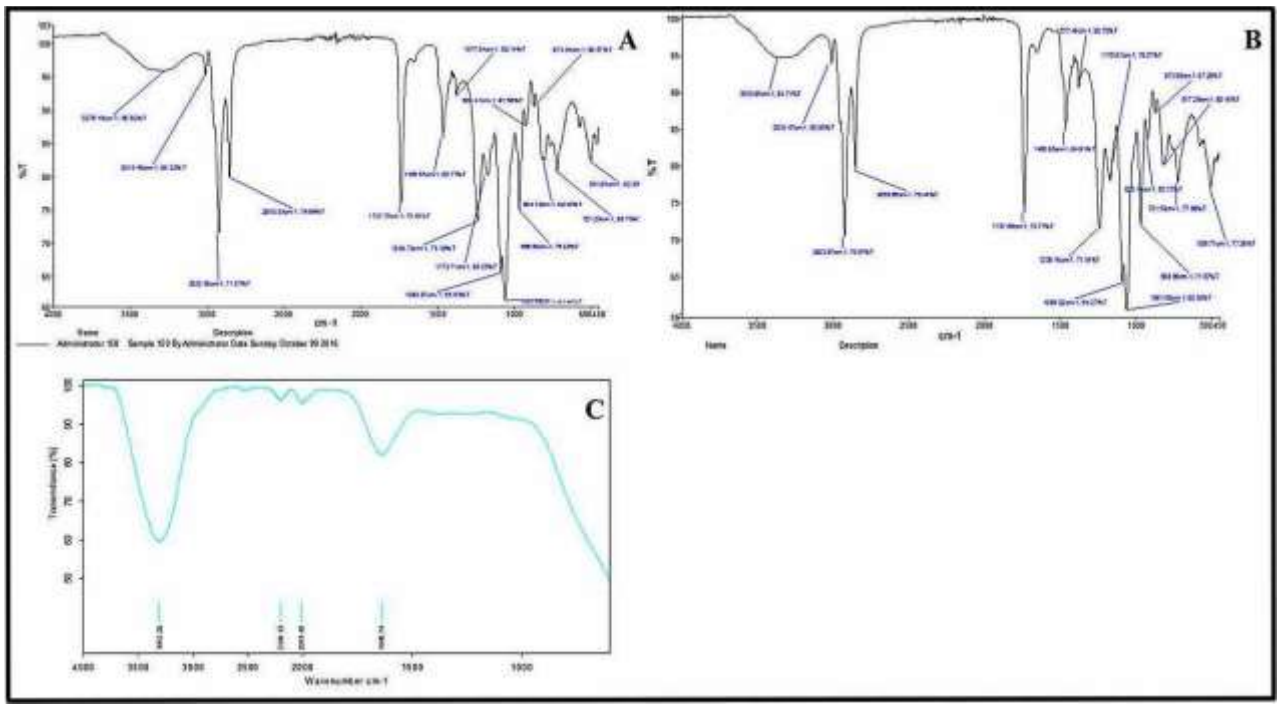
سطوح و حدود کاملاً صاف و یکنواختی می‌باشند. بررسی‌های میکروسکوپی همچنین همسو با نتایج DLS صحت آنها را تأیید می‌کند.



شکل ۳- میکروگراف الکترونی (SEM) نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس (با بزرگنمایی ۲۰/۰۰۰ برابر)

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، عدم وجود هیچگونه پیک اضافی در سامانه حاوی اسانس در مقایسه با سامانه لیپوزومی فاقد اسانس نشان‌دهنده عدم تداخل و نیز عدم تشکیل پیوندهای کووالانسی اسانس با سامانه لیپوزومی طراحی و سنتز شده است و این مهم نشان می‌دهد که اسانس به خوبی در موقعیت موردنظر در سامانه نانویی مستقر گردیده است.

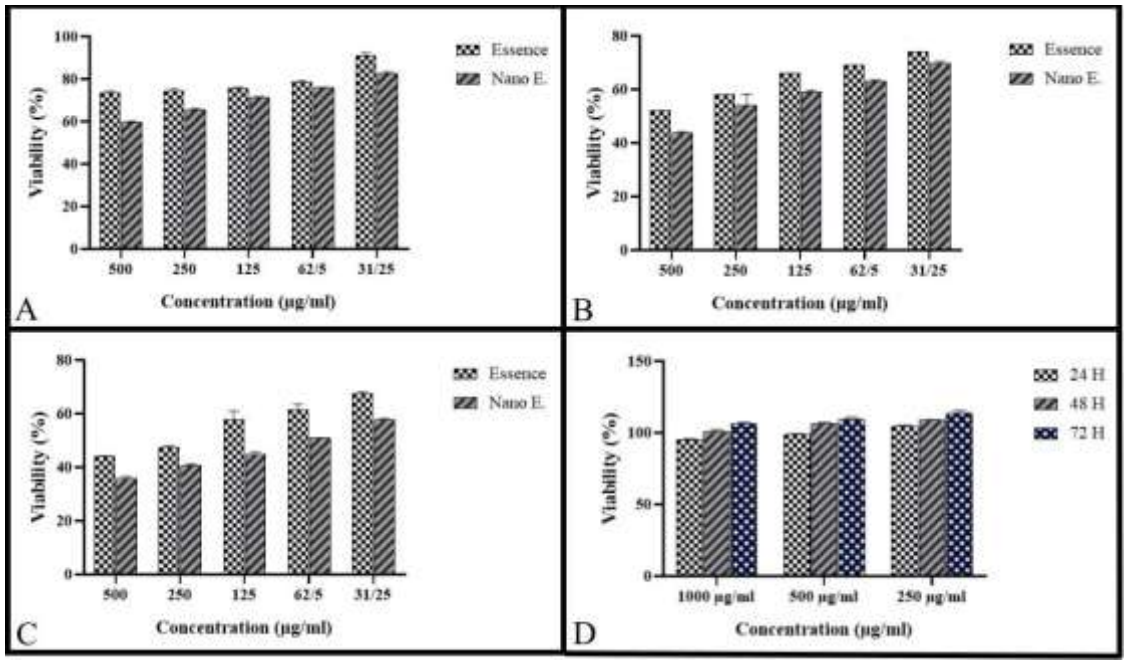
نتایج حاصل از ارزیابی سایتوتوکسیسیتی با استفاده از آزمون MTT نشان می‌دهد که سمیت اسانس آزاد و لیپوزومه وابسته به دوز و زمان است، به گونه‌ای که کمترین بقای سلول‌های سرطانی رده A-2780 تیمار شده با اسانس زنجبیل و نانوذره لیپوزومی حاوی این اسانس مربوطبه غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است و با کاهش غلظت اسانس و نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس از میزان سمیت سلولی آن کاسته می‌شود و بر میزان بقای سلول‌ها افزوده می‌شود. با توجه به نمودار بقای سلول‌های رده A-2780 تحت تأثیر لیپوزوم‌های خالی از اسانس (نمودار 5D) مشخص می‌شود که میزان بقای سلول‌ها در غلظت‌های مختلف لیپوزوم‌های بلانک بیش از ۹۰ درصد است که خود نشان‌دهنده عدم سمیت سامانه لیپوزومی فاقد اسانس بر سلول‌های سرطان تخمدان می‌باشد. براساس شکل ۵ (A-C) کمترین بقای سلول‌ها تحت تأثیر اسانس آزاد و اسانس لیپوزومه مربوطبه بیشترین غلظت تیمار در هر سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت می‌باشد که غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است، کمترین میزان بقای سلول‌ها مربوطبه سلول‌های تیمار شده با اسانس لیپوزومه طی زمان ۷۲ ساعت و با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد که دارای تفاوت معناداری ($P<0/05$) است. همچنین بیشترین درصد زنده ماندن سلول‌های تیمار شده با اسانس آزاد و لیپوزومه در برابر کمترین غلظت استفاده شده یعنی غلظت ۳۱/۲۵



شکل ٤- تجزیه و تحلیل FTIR. (A) طیف FTIR سامانه لیپوزومی بدون اسانس. (B) طیف FTIR سامانه حاوی اسانس زنجبیل. (C) طیف FTIR اسانس زنجبیل

میگروگرم بر میلی‌لیتر برای تیمار با اسانس آزاد لیپوزومه در بازه زمانی ۲۴ ساعت بوده که به ترتیب برای اسانس آزاد و لیپوزومه برابر ۹۱/۲۴ و ۸۲/۶ درصد می‌باشد که این ارقام دارای تفاوت معناداری ($P<0/05$) می‌باشند. نتایج حاصل از بررسی سمیت سلولی نشان می‌دهند که اسانس

زنجبیل دارای خاصیت سایتوتوکسیک علیه سرطان تخمدان بوده و این سمیت با لیپوزومه کردن اسانس به‌طور معناداری افزایش‌یافته است (P<۰/۰۵).



شکل ۵- بررسی سمیت سلولی با استفاده از آزمون MTT

(A) تیمار با غلظت‌های متفاوت اسانس و لیپوزوم حاوی اسانس زنجبیل طی ۲۴ ساعت. میزان بقا وابسته به دوز بوده و اختلاف بین دو نوع تیمار معنادار بوده است (P<۰/۰۵). (B) تیمار با غلظت‌های متفاوت اسانس و لیپوزوم حاوی اسانس زنجبیل طی ۴۸ ساعت. میزان بقا وابسته به دوز بوده و اختلاف بین دو نوع تیمار معنادار بوده است (P<۰/۰۵). (C) تیمار با غلظت‌های متفاوت اسانس و لیپوزوم حاوی اسانس زنجبیل طی ۷۲ ساعت. میزان بقا وابسته به دوز بوده و اختلاف بین دو نوع تیمار معنادار بوده است (P<۰/۰۵). (D) فراگیری در معرض غلظت‌های مختلف لیپوزوم فاقد اسانس که میزان بقا نشان‌دهنده عدم سمیت لیپوزوم تنها می‌باشد.

بحث

اسانس زنجبیل طبق تحقیقات مختلف صورت گرفته، دارای ترکیب زینجی برن (زینگیبر) که ماده مؤثره گیاه دارویی زنجبیل است می‌باشد. این ماده دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریال، ضدسرطانی و تحریک‌کننده سیستم ایمنی است. با توجه به پایداری و ماندگاری کم ترکیب آزاد زینجی برن در بدن، استفاده از نانولیپوزوم به‌عنوان حامل برای انتقال ترکیب زینجی برن به سلول‌های سرطانی، نقش مهمی در پایداری این ماده در بدن ایفا می‌نماید (۱۳). این دارو در بخش آبی لیپوزوم‌ها بارگذاری می‌گردد. در مطالعه حاضر، اسانس زنجبیل به‌منظور افزایش پایداری آن در بدن و تأثیرگذاری بهینه پس از رسانش مؤثر به سلول‌های سرطانی، در داخل نانولیپوزوم بارگذاری گردید. نانو لیپوزوم تولیدی از نوع آهسته رهش می‌باشد و فسفولیپیدها نیز که اجزای اصلی این نانولیپوزوم را تشکیل می‌دهند، موادی زیست تخریب‌پذیر و عموماً غیرسمی می‌باشند که اغلب در تمامی غشاءهای زیستی موجودات زنده وجود دارند. نوآوری‌های این مطالعه شامل: ۱- دستیابی به دانش فنی تهیه نانولیپوزوم حاوی ماده مؤثره گیاهی به‌عنوان نانوسامانه حاوی داروی ضدسرطان زینگیبر ۲- بارگذاری مناسب ترکیب زینگیبر (با اثر ضد سرطان) به میزان ۳/۲۱ ± ۵۶/۴۱٪ در داخل نانولیپوزوم با اندازه زیر ۷۰ نانومتر به‌منظور تشدید اثر بخشی این دارو در درمان سرطان ۳- تهیه نانولیپوزوم حاوی ماده مؤثره گیاهی زیست سازگار با بدن دارای منحنی آهسته رهش و دارای پایداری مناسب اندازه و بار سطحی. با توجه به ویژگی‌های ارزشمند ذکر شده، نانو حامل لیپوزومی تولیدی حامل داروی زینجی برن (زینگیبر) دارای منحنی آهسته رهش و زیست سازگار با بدن می‌باشد که می‌تواند در تهیه سامانه‌های دارورسان حاوی داروی‌های آبگریز مشابه استفاده گردد و به‌عنوان راهکاری مؤثر در درمان سرطان‌های مختلف در نظر گرفته شود.

آمار و ارقام نشان‌دهنده‌ی ناکارآمدی روش‌های کنونی در درمان سرطان تخمدان است. مقاومت تومورها به شیمی درمانی از یکسو و اثرات جانبی نامطلوب شیمی درمانی از سوی دیگر نیاز مبرم به یک استراتژی درمانی جدید را آشکار می‌سازد. مطالعات زیادی استفاده از گیاهان دارویی و انسانس

آنها را به‌عنوان سلاحی جدید با عوارض جانبی کم جهت مقابله با سرطان پیشنهاد می‌کنند. در سال ۲۰۱۲، لیو و همکاران نشان دادند که زنجبیل میتواند از طریق القای آپوپتوز در در سلول‌های سرطانی اندومتری دهانه‌ی رحم سبب مرگ آنها گردد. آنها بیان داشتند که این خاصیت ضد سرطانی زنجبیل می‌تواند به‌دلیل وجود ترکیبات فنولی مثل جینجرول (Gingerol) و شوگائول (Shogaol) و یا ۶-Gingerol در ترکیب شیمیایی این ماده باشد. آنها همچنین بیان داشتند که زنجبیل از یکسو می‌تواند با افزایش سطح کلسیم داخل سلولی سبب فعال شدن مسیر p53 و کاهش سطح Bcl-2/Bax در سلول‌های سرطانی گردد که خود سبب القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌گردد و از طرف دیگر می‌تواند با فسفوریلاسیون آمینواسید سرین-۱۵ در پروتئین p53 سبب ایجاد تداخل در تعامل این پروتئین با پروتئین MDM2 که تنظیم‌کننده‌ی منفی این پروتئین است گردد و به نوبه‌ی خود باعث افزایش p53 و در نتیجه القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌گردد (۱۹). همسو با این مطالعه، مطالعه ما نیز نشان داد که استفاده از اسانس زنجبیل می‌تواند سبب کاهش بقا در سلول‌های سرطانی رده A-2780 گردد. همچنین مطالعات زیادی نشان می‌دهد که انکپسولاسیون اسانس‌های گیاهی سبب افزایش خواص درمانی آنها و در مجموع افزایش کارایی آنان می‌گردد. برای مثال طی مطالعه‌ایی که اخلاقی و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام دادند مشخص شد که خواص ضدسرطانی عصاره‌ی شیرین‌بیان در حالت نیوزومه نسبت به حالت آزاد آن افزایش می‌یابد (۲۰). در مطالعه‌ی دیگر نیز که در سال ۲۰۲۱ توسط طائب‌پور و همکاران انجام گردید، مشخص گردید که خواص ضدسرطانی عصاره‌ی گیاه خار مریم در حالت انکپسوله بر روی سلول‌های سرطان استخوان SAOS-2 نسبت به حالت آزاد آن افزایش می‌یابد (۸). در این مطالعه نیز ما نشان دادیم که لیپوزومه کردن اسانس زنجبیل سبب کاهش IC50 آن نسبت‌به حالت آزاد آن بر روی سلول‌های سرطانی می‌گردد که خود نشان‌دهنده‌ی کاهش میزان مصرفی اسانس در مقایسه با حالت آزاد آن است و این خود گواهی بر افزایش خواص ضدسرطانی اسانس زنجبیل و در نتیجه افزایش کارایی آن است. همچنین بررسی تست سمیت سلولی از سوی دیگر نشان داد که لیپوزوم‌های فاقد اسانس سمیتی بر روی سلول‌ها ندارد که خود نشان‌دهنده‌ی زیست سازگاری نانو ذرات ساخته شده با سلول‌های بدن است.

میزان بارگذاری دارو نیز از جمله عوامل مهم در ارزیابی یک نانو سامانه به‌عنوان یک سیستم حامل دارویی است که به عوامل مختلفی مثل روش ساخت، مواد به‌کار رفته در ساخت آن و نسبت‌های مولی هریک و غیره بستگی دارد. بررسی‌های فیزیکوشیمیایی در این مطالعه نشان داد که میزان انکپسولاسیون نانو لیپوزوم‌های ساخته شده در این مطالعه برابر با ۳/۲۱ ± ۵۶/۴۱٪ بوده است که از نظر عددی قابل قبول است. در ساخت لیپوزوم‌های این مطالعه از SPC80 و کلسترول به همراه PEG استفاده گردید. SPC80 در مقایسه با SPC60 از درجه اشباع بیشتری برخوردار است که این به نوبه‌ی خود، سبب کاهش سیالیت غشای لیپوزوم‌ها و افزایش میزان سختی آنها می‌گردد که در مجموع سبب افزایش میزان درونگیری اسانس توسط لیپوزوم‌ها می‌شود. استفاده‌ی مناسب از کلسترول نیز سبب ثبات غشای لیپوزوم‌ها و در نتیجه افزایش میزان درون‌گیری آنها می‌گردد اما استفاده نامناسب از کلسترول نه تنها ثبات و درون‌گیری را افزایش نمی‌دهد، بلکه باعث کاهش آن نیز می‌گردد، در حقیقت میزان کلسترول استفاده شده یک اثر دوگانه بر نانوذرات ساخته شده دارد چرا که میزان خیلی زیاد و یا خیلی کم آن می‌تواند سبب ایجاد اثرات نامطلوب بر میزان بارگیری و ثبات نانو سامانه‌ها شود (۲۱). اضافه کردن پلیمر PEG نیز به نوبه‌ی خود می‌تواند سبب افزایش میزان درون‌گیری نانو ذرات گردد، چرا که علاوه بر ایجاد پیوند هیدروژنی با اسانس که خود باعث افزایش میزان درونگیری می‌گردد، می‌تواند حلالیت داروهای آبگریز را نیز افزایش دهد و سبب پایداری نانوسامانه در سیستم گردش خون گردد (۲۲ و ۲۳).

پتانسیل زتا نیز از جمله عوامل مهم در به‌کارگیری یک نانوسامانه به‌عنوان حامل دارویی است. پتانسیل زتای نانو لیپوزوم‌های ساخته شده در این مطالعه بعد از بارگذاری اسانس زنجبیل در آن برابر با ۱۷/۱۹ ±۱۹/۱mV – بود. اگرچه که از نظر تئوری پتانسیل‌های زتای بسیار مثبت و بسیار منفی (بیشتر از ۳۰±) به‌دلیل ایجاد نیروی دافعه‌ی قوی سبب ایجاد پایداری کلوئیدی می‌شود، اما توجه به این نکته نیز ضروری است که در عمل، ذراتی با بار الکتریکی متفاوت نسبت‌به سلول‌های بدن به سرعت توسط سیستم ایمنی بدن شناسایی و حذف می‌گردند. بار الکتریکی منفی همچنین از ایجاد تعاملات غیر اختصاصی نانوذرات با سلول‌های بدن که سبب شناسایی و پاکسازی آنها به وسیله‌ی ماکروفاژها نیز می‌گردد، جلوگیری می‌کند (۲۴ و ۲۵).

از اندازه‌ی نانو ذرات نیز به‌عنوان یک فاکتور حیاتی در انتخاب آنها به‌عنوان حامل‌های دارویی یاد می‌شود. اندازه‌ی نانو لیپوزوم‌های ساخته شده در این مطالعه، بعد از بارگذاری اسانس زنجبیل در آنها برابر با ± 38/4 nm ۷۲/۸۵ و شاخص پراکندگی آنها نیز برابر با ۰/۵۸ ± ۱/۴۸ بوده است. اندازه‌ی نانو ذرات بر توزیع، پایداری و حذف آنها در سیستم گردش خون تأثیر به سزایی دارد. ترکیب شیمیایی نانوذرات و استفاده از روش‌های مناسب در ساخت آنها جهت کاهش سایز نانوذرات از عوامل تأثیرگذار در سایز آنها می‌باشد. مطالعات زیادی نشان داده است که اندازه نانوذرات عامل مهمی در حذف آنها از بدن است و ذره‌هایی با اندازه‌ی بزرگتر از ۲۵۰ نانومتر قادر به پاکسازی توسط بدن نیستند و به عبارت دیگر زیست تخریب‌پذیری مناسبی ندارند و سبب ایجاد مشکلات ثانویه می‌گردند. فسفولیپیدها به‌عنوان یکی از ترکیبات اصلی در ساختمان لیپوزوم‌ها نقش مهمی در اندازه‌ی آنها دارد. مطالعات زیادی نشان داده است که کاهش غلظت فسفولیپیدها (فسفاتیدیل

کولین) سبب کاهش اندازه‌ی لیپوزوم‌ها می‌گردد، در حقیقت، لیپوزوم‌ها با محتوای کمتری از فسفولیپیدها اندازه‌ی کوچکتری نسبت‌به لیپوزوم‌ها با محتوای بیشتری از فسفولیپید دارند. کلسترول نیز به‌عنوان یک ترکیب مهم در ساختمان لیپوزوم‌ها که سبب پایداری آنها می‌گردد، نقش تعیین کننده‌ایی در اندازه‌ی لیپوزوم‌ها دارد. افزایش غلظت کاسترول سبب افزایش توزیع این مولکول در دو لایه‌ی فسفولیپیدی کلسترول می‌گردد که این امر به نوبه‌ی خود سبب افزایش میانگین قطر لیپوزوم‌ها می‌شود (۱۱ و ۲۶).

بررسی‌های طیف فروسرخ نیز در این مطالعه نشان داد که پس از بارگذاری اسانس درون نانولیپوزوم‌ها هیچ بر هم‌کنش غیر طبیعی ایجاد نگردید است و اسانس توانسته است ماهیت طبیعی خود را حفظ کند که نشان از تعامل سازنده نانوسامانه‌ی سنتز شده با اسانس بارگذاری شده است. بر اساس نتیاج به‌دست آمده از طیف FTIR مشخص گردید که پیک شاخص 3279 cm-1 که گروه عاملی الکلی را نشان می‌دهد با اندکی اختلاف در ناحیه‌ی 3353 cm-1 طیف لیپوزوم حاوی اسانس تکرار شده است. پیک شاخص 2923 cm-1 نیز که نشان‌دهنده‌ی گروه عاملی آلکانی با پیوند کششی C-H است در سامانه‌ی حاوی اسانس در ناحیه‌ی 2853 cm-1 تکرار شده است. پیک شاخص 2853 cm-1 که گواهی بر حضور گروه عاملی –CH2 است در سامانه بعد از بارگذاری نیز در ناحیه‌ی 2803 cm-1 تکرار شده است که در مجموع می‌توان به این نتیجه رسید که بین نانولیپوزوم‌های سنتز شده و اسانس هیچ‌گونه تعامل غیرسازنده‌ایی که سبب به هم‌خوردن ماهیت شیمیایی آنان گردد، اتفاق نیفتاده است.

همان‌طور که گفته شد، رهایش آهسته و هدفمند دارو از مهمترین دلایل انکپسولاسیون داروها درون نانوحامل‌های دارویی از جمله لیپوزوم است. نتایج این مطالعه نشان داد که حداکثر میزان رهاسازی اسانس زنجبیل از نانولیپوزوم‌های سنتز شده در طی ۴۸ ساعت برابر با ۲/۴۱ ± ۶۲/۵ درصد بوده است. میزان رهاسازی دارو از نانوذرات ساخته شده به عوامل مختلفی مانند نوع و میزان مواد به کار رفته در ساختمان نانو ذرات بستگی دارد. برای مثال افزایش میزان کلسترول می‌توانند سبب افزایش میزان رهاسازی دارو از نانوذرات گردد، چرا که افزایش میزان کلسترول در ساختمان لیپوزوم‌ها، سبب افزایش رقابت بین دارو و کلسترول برای جای‌گیری در درون دو لایه‌ی فسفولیپیدی لیپوزوم‌ها می‌شود که این امر می‌تواند به نوبه‌ی خود سبب افزایش میزان رهاسازی دارو گردد. از طرف دیگر افزایش میزان کلسترول سیالیت غشای لیپوزومی را کاهش می‌دهد که این امر نیز میزان رهاسازی دارو را از نانولیپوزوم‌ها افزایش می‌دهد (۱۱).

پس از نتایج بالا می‌توان اینگونه برداشت کرد که ما در این مطالعه موفق به ساخت و مشخصه‌یابی لیپوزوم‌های حاوی عصاره‌ی زنجبیل گشتیم که علاوه بر داشتن خواص فیزیکوشیمیایی مناسب توانسته است باعث بهبود خواص درمانی اسانس زنجبیل نسبت به حالت آزاد آن گردد و در موجوع انکپسولاسیون این اسانس سبب افزایش خاصیت ضدسرطانی آن نسبت‌به حالت آزاد آن بر روی سلول‌های سرطان تخمدان شده است.

در این مطالعه ما موفق به سنتز نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس زنجبیل با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسب، رهایش آهسته و میزان انکپسولاسیون بالا شدیم که با ارزیابی اثر سمیت آن بر روی سلول‌های سرطانی رده‌ی A-2780 سرطان تخمدان به این نکته پی‌بردیم که لیپوزوم‌های سنتز شده در مقایسه با اسانس آزاد دارای اثر سمیت بیشتری بر روی سلول‌های سرطانی هستند و در نتیجه انکپسولاسیون اسانس سبب افزایش خواص ضد سرطانی آن گردیده است. اگرچه که لیپوزوم‌های خالی فاقد اثر سمی بر روی این سلول‌های بوده‌اند که خود نشان‌دهنده‌ی زیست سازگاری بالای نانوسامانه‌ی سنتز شده با بدن است. این پژوهش نیز مانند سایر پژوهش‌ها دارای کاستی‌های هم بود از جمله؛ عدم بررسی پایداری نانوسامانه در شرایط مختلف، عدم بررسی روند رهایش دارو از نانو سامانه در شرایط دمایی و pH مختلف و همچنین عدم بررسی ورود نانو سامانه‌ی سنتز شده به بافت هدف که بررسی و ارزیابی آن به سایر پژوهشگران علاقمند در این زمینه پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمام کسانی که ما را در پیشبرد این پژوهش یاری رساندند سپاس‌گذاریم.

ملاحظات اخلاقی،

بدین‌وسیله نویسندگان اعلام می‌دارند که این نتایج این پژوهش پیش از این در هیچ مجله و یا کنفرانسی ارایه و منتشر نشده و کلیه ملاحضات اخلاقی مرتبط با نگارش و تحقیقات مقاله رعایت شده است.

تعارض منافع

هیچ تعارض منافعی در ارتباط با این پژوهش وجود ندارد.

مشارکت نویسندگان

هر یک از نویسندگان نقش مهمی در تهیه و تدوین این مقاله داشته‌اند.

طرحی و مفهوم پژوهش: نرگس نیکو نهاد

جمع آوری داده‌ها و تحلیل: نرگس نیکونهاد، مریم انتظاری

نگارش و بازبینی مقاله: میلاد اخلاقی، شایسته شهریاری

نظارت بر مطالعه: بی بی فاطمه حقیر السادات

حمایت مالی

این پژوهش با حمایت مالی از سوی دانشگاه علم و هنر یزد و شرکت ریز زیست فناوران فردانگر انجام شده است.

کد اخلاق

این پژوهش دارای کد اخلاق IR.SSU.RSI.REC.1398.039 از دانشگاه علوم پزشکی یزد است.

References

1. Jin M, Cai J, Wang X, Zhang T, Zhao Y. Successful maintenance therapy with apatinib inplatinum-resistant advanced ovarian cancer and literature review. Cancer Biology & Therapy 2018;19:1088-92. doi: 10.1080/15384047.2018.1491500
2. Ghashghaei M, Akhlaghi M, Khyavi AA, Haghirosadat BF. Investigation of nanoniosomal formulation containing doxorubicin effect on ovarian cancer cell line (OVCAR-3 cell line). New Cellular and Molecular Biotechnology Journal 2021;11:46-62.
3. Moore KN, Martin LP, O'Malley DM, Matulonis UA, Konner JA, Vergote I, et al. A review of mirvetuximab soravtansine in the treatment of platinum-resistant ovarian cancer. Future Oncology 2018;14:123-36. doi: 10.2217/fon-2017-0379
4. Muinao T, Boruah HPD, Pal M. Diagnostic and prognostic biomarkers in ovarian cancer and the potential roles of cancer stem cells–An updated review. Experimental Cell Research 2018;362:1-10. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.10.018
5. Greenwell M, Rahman P. Medicinal plants: their use in anticancer treatment. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2015;6:4103. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232
6. Mohseni M, Dehghani Ashkezari M, Akhlaghi M, Ansari K, Haghirosadat BF. A new therapeutic approach for the treatment of breast cancer using synthesis of liposomes scan online to view this article containing silybinin and their characterization. NCMBJ 2021;11:57-70.
7. Bonifácio BV, da Silva PB, dos Santos Ramos MA, Negri KMS, Bauab TM, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. International Journal of Nanomedicine 2014;9:1. doi: 10.2147/IJN.S52634
8. Taebpour M, Majdizadeh M, Haghiralsadat BF, Nanotechnology M. Fabrication and characterization of liposomal nanoparticles containing hydroalcoholic extract of Artemisia absintium and its toxicity on MCF-7 breast cancer cell line. Iranian Quarterly Journal of Breast Diseases 2021. doi:10.30699/ijbd.14.1.64
9. Azazuddin S. Application of novel drug delivery system for herbal formulation. Fitoterapia 2010;81:680-9. doi: 10.1016/j.fitote.2010.05.001
10. Akhlaghi M, Eftekharivash L, Parnian F, Taebpour M, Rostamian T, Zarezadeh Mehrizi M, et al. Synthesis and study of cellular and physicochemical properties of nanoliposomes containing aqueous extract of Hedera Helix. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal 2021;12:97-112.
11. Akhlaghi M, Eftekharivash L, Taebpour M, Afereydoon S, Ebrahimpour M, Mehrizi MZ, et al. Improving the therapeutic performance of glycyrrhiza glabra hydroalcoholic extract using liposomal nano-carriers and their characterization. Disease and Diagnosis 2022;11:39-48. doi: 10.34172/ddj.2022.09
12. Saiah W, Halzoune H, Djaziri R, Tabani K, Koceir EA, Omari N. Antioxidant and gastroprotective actions of butanol fraction of Zingiber officinale against diclofenac sodium-induced gastric damage in rats. Journal of Food Biochemistry 2018;42:e12456. doi: 10.3390/foods8060185
13. Stoilova I, Krastanov A, Stoyanova A, Denev P, Gargova S. Antioxidant activity of a ginger extract (Zingiber officinale). Food Chemistry 2007;102:764-70. doi:10.1016/j.foodchem.2006.06.023
14. Bhagat, Neeta and Archana Chaturvedi. Spices as an alternative therapy for cancer treatment. Systematic Reviews in Pharmacy 2016;46-56. doi:10.5530/srp.2016.7.7
15. Shukla Y, Singh M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. Food and Chemical Toxicology 2007;45:683-90. doi: 10.1016/j.fct.2006.11.002
16. Surh YJ, Park KK, Chun KS, Lee LJ, Lee E, Lee SS. Anti-tumor-promoting activities of selected pungent phenolic substances present in ginger. J Environ Pathol Toxicol Oncol 1999;18:131-9.
17. Rahnama PA, Fallah Huseini H, Mohammadi H, Modares MA, Khajavi Shojaee K, Askari MA, et al. The effects of zingiber officinale r. on primary dysmenorrhea. Journal of Medicinal Plants 2010;9:81-6.
18. Mohseni M, Dehghani Ashkezari M, Akhlaghi M, Ansari K, Haghirosadat BF. A new therapeutic approach for the treatment of breast cancer using synthesis of liposomes containing silybinin and their characterization. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal 2021;11:57-70.
19. Liu Y, Whelan RJ, Pattnaik BR, Ludwig K, Subudhi E, Rowland H, et al. Terpenoids from zingiber officinale (Ginger) induce apoptosis in endometrial cancer cells through the activation of p53. PloS one 2012;7:e53178. doi: 10.1371/journal.pone.0053178
20. Akhlaghi M, Ebrahimpour M, Ansari K, Parnian F, Zarezadeh Mehrizi M, Taebpour M. Synthesis, study and characterization of nano niosomal system containing Glycrrizha glabra extract in order to improve its therapeutic effects. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal 2021;11:65-82.
21. Pezeshky A, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, Moghadam M, Babazadeh A. Vitamin A palmitate-bearing nanoliposomes: Preparation and characterization. Food Bioscience 2016;13:49-55. doi:10.1016/j.fbio.2015.12.002
22. Akhlaghi M, Taebpour M, Lotfabadi NN, Naghib SM, Jalili N, Farahmand L, et al. Synthesis and characterization of smart stimuli-responsive herbal drug-encapsulated nanoniosome particles for efficient treatment of breast cancer. Nanotechnology Reviews 2022;11:1364-85. doi: 10.1515/ntrev-2022-0080
23. Pawlikowska-Pawlęga B, Dziubińska H, Król E, Trębacz K, Jarosz-Wilkołazka A, Paduch R, et al. Characteristics of quercetin interactions with liposomal and vacuolar membranes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 2014;1838:254-65. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.08.014
24. Akhlaghi M, Taebpour M, Sharafaldini M, Javani O, Haghiralsadat BF, Orojalian F, et al. Fabrication, characterization and evaluation of anti-cancer and antibacterial properties of nanosystems containing Hedera Helix aqueous extracts. Nanomedicine Journal 2022;9:43-56. doi: 10.22038/NMJ.2022.62364.1647
25. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2013;12:265-73.
26. Nowroozi F, Almasi A, Javidi J, Haeri A, Dadashzadeh S. Effect of surfactant type, cholesterol content and various downsizing methods on the particle size of niosomes. Iran J Pharm Res 2018;17:1-11.

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2024; Vol 18, No 4

DOI: 10.22100/jkh.v18i4.2918

Original Article

Formulation of lipid Nanosystem Containing Ginger Essential Oil to Affect Cancer Cells and Evaluate Its Cytotoxicity Against Ovarian Cancer (Cell Line A2780)

Narges Nikoonahad Lotfabadi (Ph.D.)[1], Milad Akhlaghi (M.Sc.)[2], Maryam Entezari (M.Sc.)[3], Shayesteh Shahriary (M.Sc.)[4], Bibi Fatemeh Haghiralsadat (Ph.D.)[5*]

1- Dept. of Biology, Faculty of science, Science and Art university, Yazd, Iran.
2- Dept. of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
3- Master of Biology, Taft Payameh Norh university, Yazd, Iran.
4- Dept. of Medical Biotechnology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
5- Medical Nanotechnology and Tissue Engineering Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

Received: 18 February 2022**, Accepted:** 13 February 2023

Abstract:

Introduction*: Ovarian cancer is one of the most common causes of cancer-related deaths in women. Therefore, this study aimed to produce and analyze nanoliposomes that encapsulate ginger essential oil and assess its cytotoxic effects on the A-2780 ovarian cancer cell line, comparing it to the unencapsulated essential oil.*
Methods: *Following the extraction of ginger essential oil using the Clevenger apparatus, liposomes containing the oil were created using the thin film method, and the essential oil was then incorporated into them using the hydration method. Next, the encapsulation efficiency and release pattern of the essential oil from the liposome were assessed using the spectrophotometry method. Physicochemical properties of the synthesized nanosystems, like size, PDI, zeta potential, morphology, and the lack of interaction between essential oils and liposomes, were investigated using DLS, SEM, and FTIR methods, respectively. Finally, the cytotoxicity effect of the synthesized nanosystems on ovarian cancer cells was measured using MTT assay.*
Results*: In this study, we successfully produced nanoliposomes incorporating ginger essential oil with an encapsulation efficiency of 56.41 ± 3.21%, a size of 85.72 ± 4.38 nm, a PDI of 1.48 ± 0.58, a zeta potential of -19.17 ± 1.19, and suitable morphology. These nanoliposomes exhibited a slow and semi-controlled release pattern, with a maximum essential oil release rate of 62.5 ± 2.41% over 48 hours. The nanosystems and essential oil did not exhibit any chemical interaction, and the encapsulation of the essential oil enhanced its anti-cancer properties when compared to its free form on ovarian cancer cells.*
Conclusion*: The results of this study showed that synthesized nano-liposomes with appropriate physicochemical properties can serve as effective nano-carriers for delivering ginger essential oil to cancer cells.*

Keyword: Ovarian cancer, Ginger essential oil, Nano liposomes, Encapsulation efficiency.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** B.F. Haghiralsadat, **Email**: Fhaghirosadat@gmail.com*

Citation: Nikoonahad Lotfabadi N, Akhlaghi M, Entezari M, Shahriary Sh, Haghiralsadat BF. Formulation of lipid nanosystem containing ginger essential oil to affect cancer cells and evaluate its cytotoxicity against ovarian cancer (cell line A2780). Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2024;18(4):1-11.

CC BY NC