

بررسی اثرات ضد رگ زایی نانومولسیون سنتز شده از اسانس زیره سیاه

نیلوفر خاتمیان^۱، مسعود همایونی تبریزی^{۲*}، پوران اردلان^۳

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۱۱/۲۲ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۰۲/۲۷

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: آنژیوژن نقش مهمی در شرایط فیزیولوژیک (جنین زایی) و پاتولوژیک (برخی بیماری‌ها مانند سرطان) بر عهده دارد. کپسوله کردن ترکیبات ضد رگ زایی و استفاده از آن‌ها برای مهار پروسه رگ زایی در مقابله با بیماری‌های مختلف مورد توجه بسیاری پژوهشگران می‌باشد. این مطالعه با استفاده از روش CAM خواص ضد رگ زایی نانومولسیون زیره سیاه را ارزیابی کرده است.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی اثرات ضد رگ زایی در روز دوم پنجره بر روی تخم‌ها ایجاد شد و در روز ۸ نانومولسیون زیره با دوزهای مختلف (۱۲.۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد و در روز ۱۲ ام میزان رگ زایی بررسی شد. از استریومیکروسکوب برای تصویربرداری ناحیه تیمار استفاده شد و فاکتورهای عروقی با نرم‌افزار Image J بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج بررسی اثر نانومولسیون بر میزان رگ زایی در تست CAM. کاهش طول و تعداد رگ‌های پرده کوریوالانتوپیک را در نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با تیمار نشده نشان داد. همچنین کاهش قد و وزن جنین‌های تیمار شده در مقایسه با تیمار نشده در این بررسی نشان داده شد ($P<0.05$).

نتیجه‌گیری: فعالیت ضد رگ زایی نانومولسیون زیره سیاه کاربرد احتمالی آن را برای بیماری‌هایی که مهار تشکیل رگ‌های خونی در آن‌ها موردنظر است مانند سرطان، نشان می‌دهد. بنابراین می‌تواند به عنوان یک ماده برای مطالعات بیشتر در زمینه سرطان پیشنهاد گردد.

واژه‌های کلیدی: نانومولسیون، اسانس زیره سیاه، رگ زایی

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره چهارم، ص ۲۹۵-۳۰۴، تیر ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: مشهد، دانشگاه آزاد مشهد، گروه زیست‌شناسی تلفن: ۰۹۱۵۴۵۰۵۸۹۴

Email: mhomayouni6@gmail.com

مقدمه

سلول‌های سرطانی برای تکثیر و رشد خود نیاز به اکسیژن و مواد غذایی دارند که باید از طریق خون‌رسانی به بافت هدف انجام شود لذا مهار رگ زایی می‌تواند در مهار سرطان نقش مهمی ایفا نماید^(۱).

متاپولیت‌های ثانویه گیاهان یک منبع عمدۀ برای ترکیبات جدید پزشکی به شمار می‌رود و بسیاری از گیاهان ترکیبات فعالی را تولید می‌کنند که می‌تواند به عنوان عامل دفاعی در برابر بسیاری بیماری‌ها عمل نماید. این ترکیبات شامل ترکیبات فنلی، الکالولئیدها، استروئیدها، تربین‌ها، ساپونین‌ها می‌باشند که دارای اثرات بیولوژیک مهم همچون اثرات ضد سرطان، آنتی‌اکسیدان و ضد میکروبی می‌باشد^(۲). روغن‌های گیاهی دارای محتوای فنولی می‌باشد که آن‌ها را کاندید مناسبی برای درمان سرطان کرده است.

آنژیوژن برای فعالیت‌های فیزیولوژیکی معمولی مانند درمان صدمات، چرخه قاعدگی و رشد جنین بسیار مهم است. همچنین این پروسه در پاتولوژن برخی بیماری‌ها نیز نقش بسیار مهمی بر عهده دارد. بینظمی آنژیوژن باعث بروز و پیشرفت برخی بیماری‌ها مانند دژنراسیون ماکولا مربوط به سن و تومورهای بدخیم می‌شود تومورهای بدخیم برای تکثیر و رشد سریع به خون بیش از حد نیاز دارند. بنابراین، رگ زایی برای شروع، توسعه و متاستاز تومورهای بدخیم بسیار ضروری می‌باشد^(۳).

استراتژی‌های مختلفی جهت مهار سلول‌های سرطانی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به استفاده از مهارکننده‌های رگ زایی جهت مهار رشد و توسعه تومور اشاره نمود. با توجه به اینکه

^۱ گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

^۲ گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ استادیار شیمی فیزیک، گروه شیمی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

کپسوله کردن (محصور کردن) و اموسیفیکاسیون روغن‌های گیاهی به دلیل اثرات ضد سرطان این ترکیبات می‌تواند سبب استفاده وسیع‌تری از آن‌ها در زمینه مهار سلول‌های سرطانی گردد. تاکنون نیز مطالعاتی در زمینه استفاده از روغن‌های گیاهی در درمان برخی سرطان‌ها از جمله سرطان سینه و کبد انجام شده است^(۷). در این بررسی از نانومولسیون تهیه شده از زیره سیاه، به‌منظور افزایش پایداری و دسترسی زیستی به اسانس زیره استفاده شد و اثرات این نانومولسیون بر میزان رگ زایی با استفاده از روش CAM مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نانومولسیون و بررسی سمیت آن

در آزمایش حاضر نانومولسیون تهیه شده از اسانس زیره سیاه بر اساس روشی که در مقاله قبلی همین نویسنده‌گان جزئیات آن ذکر شده است، سنتز شد^(۱۱). این نانومولسیون دارای اندازه ۳۴.۶ نانومتر با ۰.۲۴۱ PDI می‌باشد. مورفولوژی نانومولسیون به شکل تقریباً کروی گزارش شد. همچنین در این بررسی نشان داده شد که نانومولسیون دارای اثرات سمیت بیشتری بر علیه سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال می‌باشد. جدول ۱ به اختصار اثر سمیت نانومولسیون زیره سیاه را بر علیه سلول‌های سرطانی و نرمال نشان می‌دهد^(۱۱).

جدول (۱): غلظت میانه (IC50) در سلول‌های تیمار شده با نانومولسیون

سلول مورد بررسی	زمان	غلظت میانه
TUBO	۴۸ ساعت	31.44 μ g/ml
L929	۴۸ ساعت	36.54 μ g/ml
HT-29	۲۴ ساعت	37.69 μ g/ml
	۴۸ ساعت	12.26 μ g/ml
	۷۲ ساعت	10.9 μ g/ml
Huvec	۲۴ ساعت	بالاتر از ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر
	۴۸ ساعت	45.35 μ g/ml
	۷۲ ساعت	6.83 μ g/ml

شدن. ۴۸ ساعت بعد، در سر پهن هر تخم مرغ یک پنجه ایجاد و در ادامه پنجه با استفاده از چسب و پارافین پوشانده شد. نمونه‌ها در ۵ گروه ۱۰ تایی شامل دو گروه شاهد و شاهد آزمایشگاهی و سه گروه تجربی شامل غلظت‌های مختلف نانومولسیون (۱۲.۵، ۲۵ و ۵۰

زیره منبع عالی ویتامین‌ها و مواد معدنی نظیر آهن، مس، کلسیم، پتاسیم، منگنز، سلنیوم، روی و منیزیم است.^(۵) زیره دارای تانن، ماده روغنی، موم، موسیلاژ، موارد رزینی، مواد قندی مختلف، مواد ازته و اسانس است. اسانس این گیاه از ترکیبات ترپنی و ترپنوتییدی تشکیل شده است و مقدار عمده‌ترین آن‌ها کارون (۵۰۰ تا ۷۰ درصد) است. از ترکیبات دیگر می‌توان به لیمونن، دی‌هیدروکارون، کاروئول و دی‌هیدروکاروئول، اشاره کرد.^(۶) به دلیل دارا بودن مواد فعال بیولوژیک در اسانس گیاه زیره می‌توان از آن در جهت تهیه فرمولاسیون مناسب نانو امولسیون استفاده نمود.

درواقع روغن‌های گیاهی می‌توانند به عنوان فاز روغنی در سیستم‌های امولسیون مورد استفاده قرار گیرند تا اثربخشی و دسترسی زیستی به آن‌ها افزایش یابد^(۷). نانو امولسیون‌ها گروهی از ذرات پراکنده و شفاف با قطر ۲۰-۲۰۰ نانومترمی باشند که از نظر جنبشی، سینتیکی و ترمودینامیکی پایدار هستند^(۱). این ترکیبات دارای خواص منحصر به‌فرد مانند سهولت در آماده‌سازی، دسترسی زیستی بالا، شفافیت و ثبات طولانی‌مدت می‌باشند که همین امر سبب استفاده از آن‌ها در زمینه‌های غذایی، دارویی، بهداشتی شده است^(۸). مهم‌ترین ویژگی نانومولسیون‌ها اندازه کوچک آن‌ها می‌باشد که سبب افزایش نفوذ یا جذب آن‌ها توسط سلول‌ها می‌گردد^(۹). استفاده از نانومولسیون‌ها برای مصارف درمان و دارو اخیراً موردن توجه بسیاری قرار گرفته است. بررسی‌ها نشان داده است که

بررسی رگ زایی:

به‌منظور بررسی فعالیت رگ زایی از تست^۱ CAM استفاده شد؛ در این بررسی ۵۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار از نژاد ROSS از شرکت مرغداران توک مشهد، تهیه و پس از ضدعفونی به ماشین جوچه‌کشی با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۵ درصد منتقل

^۱ Chorioallantoic Membrane

با استفاده از چسب و پارافین مجدداً بسته شد و نمونه‌ها برای ۴ روز دیگر به دستگاه جوجه‌کشی منتقل شدند.

در روز دوازدهم نمونه‌ها از ماشین جوجه‌کشی خارج شدند، پنجه باز شد و توسط استریو میکروسکوپ (نیکون) از نمونه‌ها در محدوده اسفنج تصویربرداری شد. تصاویر با استفاده از از نرم‌افزار ImageJ برای ارزیابی طول و تعداد رگ‌ها بررسی شدند. وزن و قد (فرق سر تا نشیمنگاه) جنین‌ها نیز به ترتیب توسط ترازو و کولیس اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون LSD تحلیل شدند.

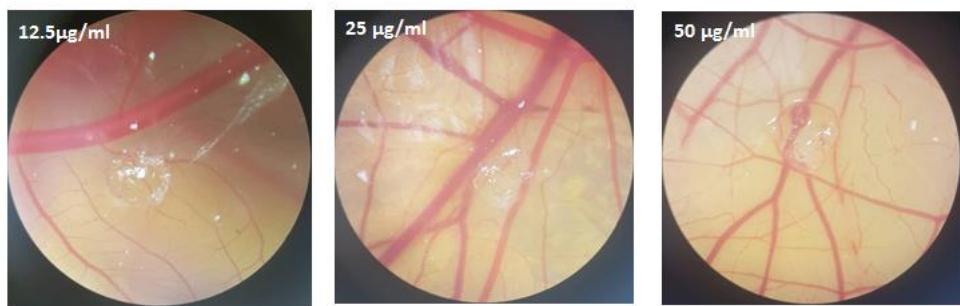
یافته‌ها

بررسی تغییرات مورفولوژیک رگ زایی:

میزان رگ زایی با استفاده از تست CAM و تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانو امولسیون زیره (۰، ۱۲.۵، ۲۵، و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر روی پرده کوریوالانتویک جوجه مورد بررسی قرار گرفت و تعداد و طول رگ‌های خونی و همچنین قد و وزن جنین اندازه‌گیری شد. تصاویر مورفولوژی از پرده کوریوالانتویک در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانو امولسیون در مقایسه با نمونه‌های شاهد و شاهد آزمایشگاهی کاهش میزان رگ‌ها را نشان می‌دهد (شکل ۱).

میکروگرم (میلی‌لیتر) تقسیم شدند و مجدداً به ماشین جوجه‌کشی منتقل شدند.

در روز هشتم اسفنج ژلاتینی به منظور فراهم نمودن بستر تیمار نانو امولسیون بر روی پرده کوریوالانتویک جوجه، تهیه گردید. به منظور تهیه اسفنج ژلاتینی از تخم مرغ بدون نطفه، آنتی‌بیوتیک و محلول آگار استفاده شد. برای تهیه اسفنج ابتدا آلومین سفیده تخم مرغ و محلول آگار (تهیه شده با نرمال سالین) هم‌دما شده و سپس با هم مخلوط می‌گردند و در ادامه به آن، آنتی‌بیوتیک اضافه می‌گردد. سپس محلول حاصل به پتری دیش منتقل شده و به منظور ایجاد یک لایه ژلاتینی در یخچال نگهداری می‌گردد. در زمان استفاده اسفنج تهیه شده به قطعات کوچک تقسیم شده و هر قطعه با ابعاد $4 \times 4 \times 1$ میلی‌متر بر روی پرده کوریوالانتویک قرار می‌گیرد گروه شاهد در شرایط طبیعی نگهداری و به اسفنج ژلاتینی روی پرده کوریوالانتویک توسط میکروپیت میزان ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد، گروه شاهد آزمایشگاهی با ۱۰ میکرولیتر ترکیب نانو امولسیون بدون اسانس زیره سیاه تیمار شد و در ادامه ۱۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف (۱۲.۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نانو امولسیون زیره سیاه بر روی اسفنج بارگذاری گردید. پس از تیمار نمونه‌ها، پنجه تخم مرغها



شکل (۱): نتایج مورفولوژی به منظور بررسی اثرات نانو امولسیون گیاه زیره بر میزان رگ زایی پرده کوریوالانتویک جوجه که نشان دهنده کاهش میزان رگ زایی در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف (۱۲.۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) در مقایسه با شاهد و شاهد آزمایشگاهی می‌باشد.

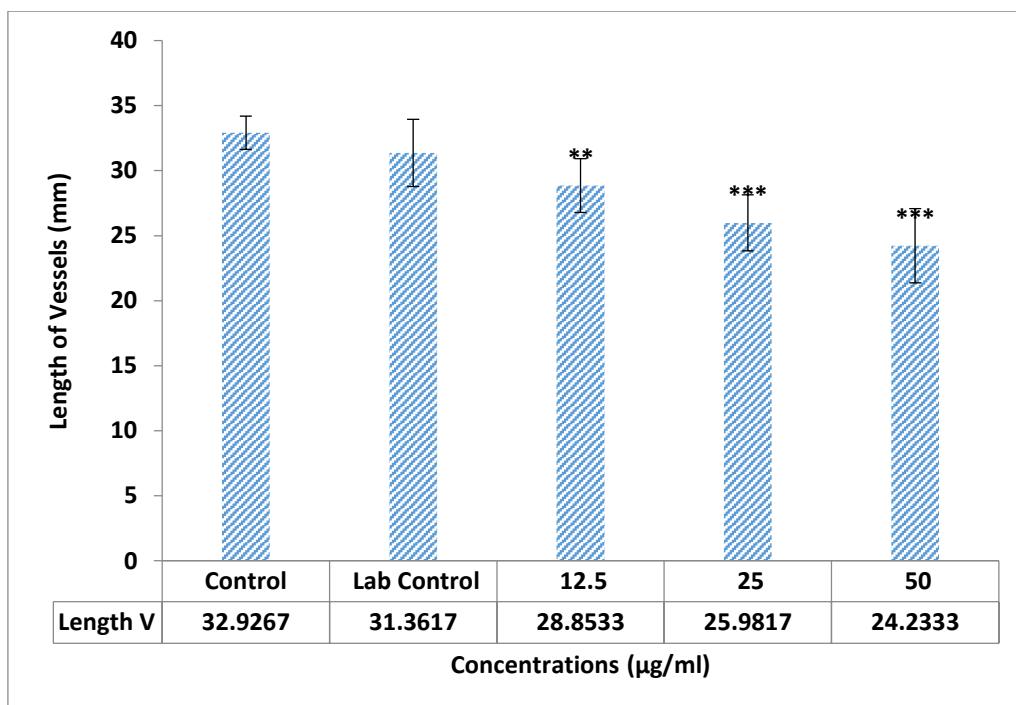
نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۲.۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی دار به صورت $P<0.001$ نشان می‌دهد (جدول ۲، شکل ۲).

بررسی طول رگ‌های خونی:

در بررسی طول عروق خونی در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد که طول عروق خونی در نمونه‌های شاهد نسبت به شاهد آزمایشگاهی اختلاف معنی داری ندارد. اما طول عروق خونی در

جدول (۲): نتایج میانگین طول عروق خونی به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	میانگین طول ± انحراف معیار	ANOVA (p-value)
شاهد	۳۲.۹۲±۱.۲۸	
شاهد آزمایشگاهی	۳۱.۳۶±۲.۵۸	۰.۲۴
۱۲.۵ میکروگرم/میلی‌لیتر	۲۸.۸۵±۲.۰۶	0.004**
۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر	۲۵.۹۸±۲.۱۵	0.000***
۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر	۲۴.۲۳±۲.۸۶	0.000



شکل (۲): کاهش طول عروق خونی در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانومولسیون (۱۲.۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در

مقایسه با شاهد و شاهد آزمایشگاهی در سطح معنی داری $p<0.01$.

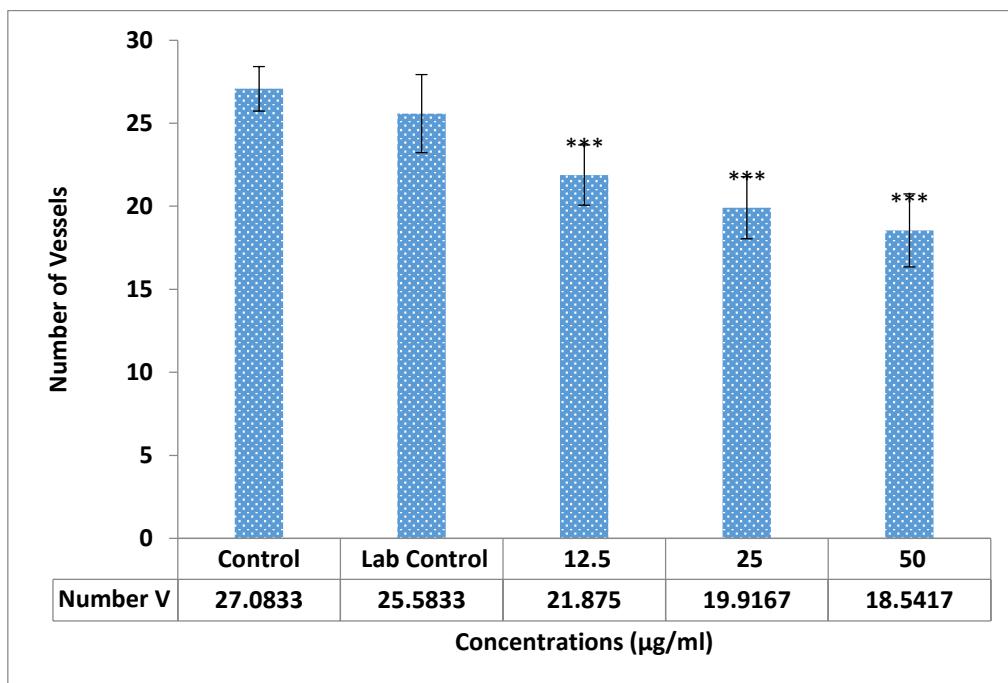
آزمایشگاهی وجود ندارد اما بین تمام غلظت‌های تیمار شده با شاهد اختلاف معنی دار $P<0.001$ می‌باشد.

بررسی میانگین تعداد عروق خونی:

در بررسی جدول ۳ شکل ۳ مربوط به تعداد عروق خونی مشاهده می‌گردد که اختلاف معنی داری بین گروه شاهد و شاهد

جدول (۳): نتایج تعداد عروق خونی به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	میانگین تعداد \pm انحراف معیار	سطح معنی داری
شاهد	۲۷۰.۸ \pm ۱۰.۳۳	
شاهد آزمایشگاهی	۲۵۰.۵۸ \pm ۲.۳۴	۰.۱۹
۱۲.۵ میکروگرم/میلی لیتر	۲۱۸.۷ \pm ۱۰.۸۱	۰.۰۰۰***
۲۵ میکروگرم/میلی لیتر	۱۹۹.۱ \pm ۱۰.۸۶	۰.۰۰۰***
۵۰ میکروگرم/میلی لیتر	۱۸۰.۵۴ \pm ۲۰.۱۹	۰.۰۰۰***



شکل (۳): مقایسه میانگین تعداد انشعابات عروقی در سطح پرده کوریو آلانتوئیک در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانومولسیون (۱۲.۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در مقایسه با شاهد و شاهد آزمایشگاهی که نشان دهنده کاهش تعداد عروق در سطح معنی داری (***) $p<0.001$ می‌باشد.

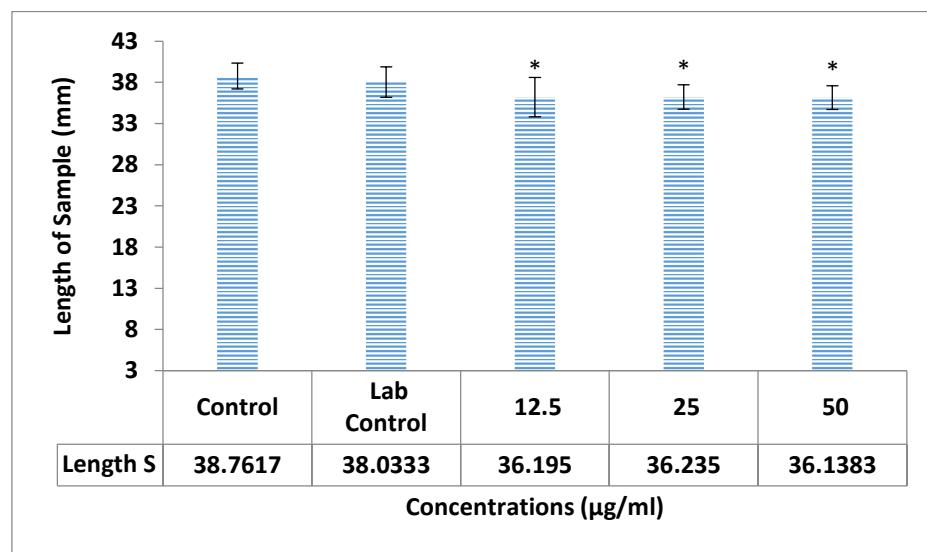
معنی داری بین شاهد و شاهد آزمایشگاهی وجود ندارد. همچنین بین شاهد و نمونه تیمار شده با غلظت ۱۲.۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر هم تفاوت وجود ندارد اما با افزایش غلظت به ۲۵ و ۵۰ تفوت در سطح معنی داری $P<0.05$ و $P<0.01$ مشاهده می‌گردد. نتایج حاصل از بررسی میزان رگ زایی نشان می‌دهد که در هیچ یک از فاکتورها بین شاهد و شاهد آزمایشگاهی تفاوت معنی دار نمی‌باشد ولی با تیمار نمونه‌ها با نانومولسیون طول و تعداد رگ‌ها کاهش می‌یابد و این کاهش میزان رگ زایی رشد جنین (قد و وزن) را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد.

ارزیابی فاصله سر تا نشیمنگاه و وزن جنین‌ها:

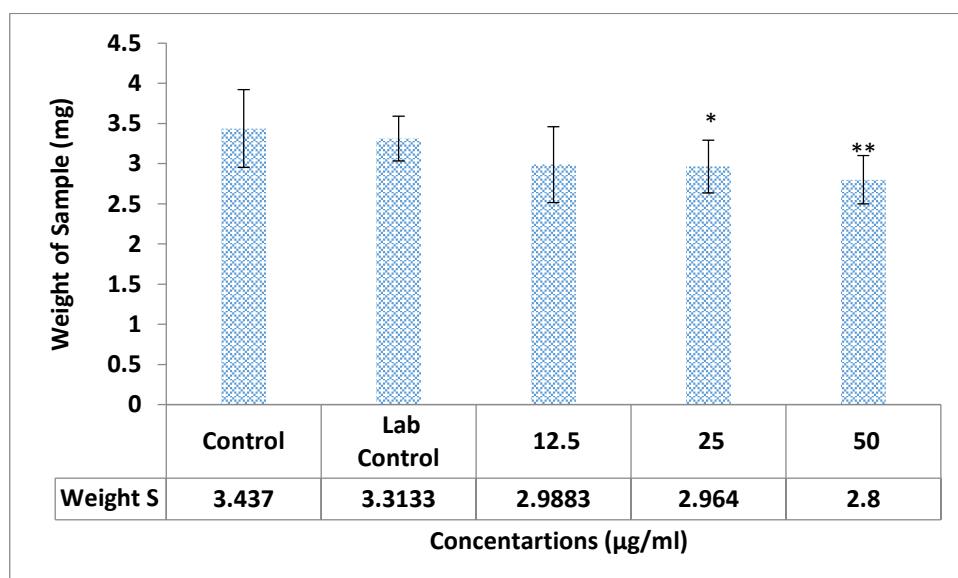
در این برسی قد و وزن جنین‌ها با استفاده از کولیس و ترازو ارزیابی گردید و در ادامه سطح معنی داری تغییرات نسبت به گروه شاهد با استفاده از نرم‌افزار آماری بررسی گردید. ارزیابی فاصله سر تا نشیمنگاه در جنین‌های تیمار شده در مقایسه با شاهد (شکل ۴) نشان می‌دهد که اختلاف معنی داری بین گروه‌های تیمار شده در مقایسه با شاهد با سطح معنی داری $P<0.05$ (***) وجود دارد در حالی که بین شاهد و شاهد آزمایشگاهی هیچ تفاوت معنی داری مشاهده نمی‌شود. در ارزیابی وزن جنین‌ها (شکل ۵) نیز هیچ نتیج

جدول (۴): میانگین قد و وزن جنبین به تفکیک گروههای مورد مطالعه

گروهها	میانگین قد ± انحراف معیار	سطح معنی داری	وزن جنبین		فاصله سر تا نشیمنگاه (قد)
			میانگین وزن ± انحراف معیار	سطح معنی داری	
شاهد	۳۸.۷۶±۱.۵۶		۳.۴۳±۰.۴۸		
شاهد آزمایشگاهی	۳۸.۰۳±۱.۸۳	۰.۴۵	۳.۳۱±۰.۲۷	*	۰.۵۸
۱۲.۵ میکروگرم/میلی لیتر	۳۶.۱۹±۲.۳۹	*۰.۰۱۹	۲.۹۸±۰.۴۷	*	۰.۰۵۳
۲۵ میکروگرم/میلی لیتر	۳۶.۲۳±۱.۴۷	*۰.۰۲۱	۲.۹۶±۰.۳۲	*	*۰.۰۴۲
۵۰ میکروگرم/میلی لیتر	۳۶.۱۳±۱.۴۴	*۰.۰۱۷	۲.۸±۰.۲۹	*	**۰.۰۰۸



شکل(۴): مقایسه میانگین فاصله سر تا نشیمنگاه در نمونههای تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانومولسیون (۱۲.۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در مقایسه با شاهد و شاهد آزمایشگاهی که نشان دهنده کاهش قد در سطح معنی داری $p<0.05$ * می‌باشد.



شکل(۵): مقایسه میانگین وزن جنبین‌ها در نمونههای تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانومولسیون (۱۲.۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در مقایسه با شاهد و شاهد آزمایشگاهی که نشان دهنده کاهش وزن در سطح معنی داری $p<0.05$ *** و $p<0.01$ ** می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

شده از روغن گیاه دارویی چریش بر روی لنفوسیت‌های انسانی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد نانومولسیون سنتز شده از روغن چریش در غلظت‌های بالاتر (۱/۲-۲ میلی گرم بر میلی لیتر) قادر به مهار سلول‌ها می‌باشد. (۱۵). همچنین بررسی اثرات سیتوکسیک نانومولسیون سنتز شده از روغن هسته‌ی آلبالو برعلیه سلول‌های سرطان ریه (A549) و سلول‌های اندوتیال ورید ناف انسان (HUVEC) نشان داد که، سمیت سلولی اعمال شده بر روی سلول‌های سرطانی بیشتر از سلول‌های طبیعی است(۱۶). در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۲ اثرات سمیت سلولی نانومولسیون سنتز شده از بادام هندی بر روی سلول‌های سرطانی پستان (MCF-7) ارزیابی شد و نتایج نشان داد نانومولسیون قادر است سلول‌های مذکور را ۴۸ ساعت پس از تیمار با IC₅₀ حدود $\pm 14/2$ ۸۸ میکروگرم بر میلی لیتر مهار نماید که قابل مقایسه با اثر مهاری نانومولسیون زیره سیاه (IC₅₀: 12.26 μg/ml) در زمان مشابه بر سلول‌های سرطان کولون می‌باشد(۱۷). بررسی‌های دیگر نیز اثراً ضد سرطانی نانومولسیون های تهیه شده از اوژنول (۷)، نانومولسیون ویتامین D (۱۸)، نانومولسیون کورکومین (۱۹)، نانومولسیون روغن ریحان (۲۰) و ... را نشان می‌دهد که قابل مقایسه با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد.

جلوگیری از توسعه سلول‌های سرطانی و مهار آن‌ها می‌تواند با استراتژی‌های مختلفی همچون القا اپیپتوز یا مهار رگ زایی صورت پذیرد. مهار رگ زایی یکی از مهم‌ترین راهکارها جهت سرکوب سرطان به شمار می‌آید. ریز محیط زیست تومور از ماتریس خارج سلولی (ECM)، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اپیتیلیال، سلول‌های ایمنی، پریسیت‌ها، چربی‌ها، سلول‌های گلیال (موجود در سیستم عصبی)، پروتئین‌ها، سلول‌های عروقی و سلول‌های لنفاوی تشکیل شده است (۲). در مراحل اولیه رساندن اکسیژن و مواد مغذی به تومور با انتشار ساده صورت می‌گیرد اما هنگامی که اندازه تومور از ۲۰ میلی متر مکعب بزرگ‌تر شود، سطح اکسیژن کاهش یافته و منجر به هیپوکسی و رشد رگ‌های خونی جدید می‌شود (۳)، بنابراین مهار فرایند رگ زایی، سبب مهار رشد و توسعه سلول‌های سرطانی می‌گردد. در سال‌های اخیر بسیاری از داروهای ضد رگ زایی مورد بررسی قرار گرفته است اما بیشتر مهارکننده‌های رگ زایی دارای سمیت بالا بوده و مقاومت داری ایجاد نموده‌اند و از طرفی قادر به عور از موانع برای رسیدن به هدف موردنظر نیستند(۲۱). نانومولسیون‌ها به دلیل ویژگی‌های خاص مانند

اسانس‌ها (روغن‌های فرار) مخلوطی از ترکیبات روغنی فرار می‌باشد که به عنوان یک متابولیت ثانویه در گیاهان دارویی ساخته می‌شوند(۱۲) این ترکیبات بسیار آبگریز بوده و حلالیت بسیار پایینی در آب دارند و به سهولت توسط نور، گرما و هوا اکسیده می‌شوند(۱۳). انسان زیره‌ی سیاه یکی از اسانس‌ها بسیار پرکاربرد می‌باشد که شامل کومین آلدھید، پاراسایمین، آلفاپین و گاما ترپنین و بسیاری مواد مؤثر دیگر می‌باشد که اغلب از ترکیبات ترپنی هستند و در صنایع دارو و غذا کاربرد گسترده‌ای دارد و اثرات بیولوژیک آن در مطالعات مختلف بررسی و تأیید شده است(۱۴). روغن‌های گیاهی به دلیل محتوای فنولی موجود در آن‌ها کاندید مناسبی برای درمان برخی بیماری‌ها از جمله سرطان به شمار می‌روند و تاکنون بسیاری مطالعات اثرات این روغن‌ها را برای درمان سرطان‌هایی همچون کبد، سینه، روده‌ی بزرگ و... مورد بررسی قرار داده‌اند. مهم‌ترین معضل استفاده از این ترکیبات حلالیت ضعیف آن‌ها در آب و چربی دوستی بالا این ترکیبات است که استفاده از آن‌ها را محدود نموده است. لذا، اخیراً تلاش شده است که نانومولسیونهای سنتز شده از روغن‌های گیاهی بهمنظور افزایش سازگاری زیستی و اثربخشی بیشتر مورد استفاده قرار گیرد(۷)، لذا در این مطالعه ما از نانومولسیون اسانس زیره سیاه به دلیل پایداری و فراهمی زیستی بالاتر نسبت به انسان جهت بررسی اثرات بیولوژیک استفاده نمودیم. در این بررسی که برای اولین بار در ایران انجام گرفته است، از نانومولسیون زیره سیاه جهت ارزیابی اثرات رگ زایی بر روی پرده کوریوالانتویکیک جوچه با روش CAM استفاده گردید. در بررسی‌های انجام شده قبلی نیز اثراً سمیت سلولی نانومولسیون زیره سیاه تأیید گردید(۱۱).

نتایج مطالعات قبلی بر روی نانومولسیون زیره سیاه نشان داده است که این ترکیب قادر است سلول‌های سرطانی را با قدرت بالاتری نسبت به سلول‌های نرمال (جدول ۱) مهار نماید. نتایج حاصل از بررسی میزان رگ زایی نشان می‌دهد که نانومولسیون زیره سیاه قادر به کاهش تعداد و طول عروق خونی در جنین‌های تیمار شده در مقایسه با تیمار نشده می‌باشد و احتمالاً کاهش رگ زایی سبب کاهش رشد جنین (کاهش قد و وزن) شده است(شکل ۱-۵). بررسی‌ها نشان می‌دهد که نانومولسیون‌های سنتز شده از اسانس‌های گیاهی دارای اثرات سمیت برعلیه سلول‌های مختلف می‌باشند. برای مثال در بررسی انجام شده توسط Jerobin و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثرات سمیت سلولی نانومولسیون سنتز

کوریوالنتوییک جوجه بررسی کردند و نتایج این آزمایش نیز کاهش میزان رگ زایی را نشان داد (۲۴). در بررسی حاضر نیز اثرات ضد رگ زایی نانومولسیون روغن زیره سیاه تأیید شده است. این بررسی مشابه بررسی‌های ذکر شده کاهش معنی دار ($***P<0.001$) تعداد و طول رگ‌های خونی را در پرده کوریوالانتوییک جوجه نشان داد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر اثرات رگ زایی نانومولسیون سنتز شده از اساس زیره سیاه با استفاده از روش‌های CAM مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد این نانومولسیون زیره سیاه قادر است میزان رگ زایی را کاهش دهد. از آن جا که کاهش پروسه رگ زایی یکی از استراتژی‌های مهم جهت مهار رشد تومور به شمار می‌رود، بنابراین می‌توان نانومولسیون سنتز شده از زیره سیاه را به عنوان عاملی برای مطالعات بیشتر در زمینه سرطان پیشنهاد نمود.

مساحت بزرگ، شارژ سطحی، بالا بودن نیمه عمر در گردش خون، هدف گذاری خاص و ظرفیت تصویربرداری امروزه در درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته‌اند. نانومولسیون‌ها با توجه به اندازه کوچکشان توانایی عبور از سد خونی را داشته و به راحتی می‌توانند از طریق عروق خونی احاطه کننده تومور، در بافت‌های توموری حضور یافته و اثرات خود را اعمال نمایند. علاوه بر این، آن‌ها همچنین می‌توانند برای کپسوله کردن انواع مختلفی از داروها و انتخاب اهداف خاص طراحی شوند (۲۲).

در برخی مطالعات اثرات ضد رگ زایی نانومولسیون‌های تهییه شده از ترکیبیات مختلف تأیید شده است. برای مثال در مطالعه Dehelean و همکاران (۲۰۱۱) یک ترکیب ضدسرطانی نامحلول را در نانومولسیون سنتز شده از روغن دانه کتان فرموله کردند و با استفاده از روش CAM اثر آنتی آنزیوئتیک آن را بررسی کرده و نشان دادند که این ترکیب دارای اثرات مهاری بر رگ‌زایی می‌باشد (۲۳). همین گروه مطالعاتی در سال ۲۰۱۳ در تحقیق دیگری اثر نانومولسیون بتولین (ترکیبی که از پوست درخت غان جدا شده بود) را بر رگ‌زایی در سلول‌های کارسینوم پوست در موش و پرده

References:

1. Lu K, Bhat M, Basu S. Plants and their active compounds: natural molecules to target angiogenesis. *Angiogenesis* 2016; 19(3): 287-95.
2. Arruebo, M. and M. Valladares, A. Gonz alez-Fern andez. *J. Nanomater* 2009; 2009(1).
3. Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(7): 537-50.
4. Nirmala MJ, Samundeeswari A, Sankar PD. Sankar, Natural plant resources in anti-cancer therapy-A review. *Res Plant Biol* 2011; 1(3): 1-14 .
5. Savković Ž, Džamić A, Stupar M, Unković N, Vukojević J, Ljaljević Grbić M. Antifungal activity of Eugenia caryophyllata Thun., Cinnamomum zeylanicum Blume and Carum carvi L. essential oils using resazurin based microdilution method. [Internet]. 2018 [cited 2020 Aug 17]. Available from: <https://biore.bio.bg.ac.rs/handle/123456789/2112>
6. Haghrossadat F, Bernard F, Kalantar M, Sheikhha MH, Hokmollahi F, Azimzadeh M, et al. Bunium persicum (black caraway) of yazd province: chemical assessment and evaluation of its antioxidant effects. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2010;18(3): 284-91.
7. Nirmala M, Nagarajan R. Nanoemulsions in Cancer Therapeutics. *J Nanomed Nanotechnol*. 2016;07(02).
8. Changediya VV, Jani R, Kakde P. A Review on Nanoemulsions: A Recent Drug Delivery Tool. *J Drug Delivery Therapeutics* 2019; 9(5): 185-91.
9. Guglielmini G. Nanostructured novel carrier for topical application. *Clin Dermatol* 2008; 26(4): 341-6.
10. Feizi Langaroudi N, Motakef Kazemi N. Preparation and characterization of O/W nanoemulsion with Mint essential oil and Parsley aqueous extract and the presence effect of chitosan. *Nanomed Res J* 2019; 4(1): 48-55.

11. Khatamian N, Homayouni Tabrizi M, Ardalan P, Yadamani S, Darchini Maragheh A. Synthesis of Carum Carvi essential oil nanoemulsion, the cytotoxic effect, and expression of caspase 3 gene. *J Food Biochemistry* 2019; 43(8): e12956.
12. Geng S, Cui Z, Huang X, Chen Y, Xu D, Xiong P. Variations in essential oil yield and composition during *Cinnamomum cassia* bark growth. *Industrial Crops and Products* 2011; 33(1): 248-52.
13. Sabzghabaei AM, Nili F, Ghannadi A, Eizadi-Mood N, Anvari M. Role of menthol in treatment of candidial napkin dermatitis. *World J Pediatr* 2011; 7(2): 167-70.
14. Shankaracharya NB, Shankaranarayana ML. Research Note on the Essential Oil of *Cuminum cymimum* L. and *Bunium persicum* B. *Pafai J* 1988; 10(4): 33-5.
15. Jerobin J, Makwana P, Kumar RS, Sundaramoorthy R, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Antibacterial activity of neem nanoemulsion and its toxicity assessment on human lymphocytes in vitro. *Int J Nanomedicine* 2015; 10 (Suppl 1): 77-86.
16. Darchini Maragheh A, Homayouni Tabrizi M, Karimi E. Evaluation of antioxidant and cytotoxic effects of nanoemulsion of cherry kernel oil on A549 lung cancer and HUVEC normal cells. *Jundishapur Sci Med J* 2019; 18(1): 71-9.
17. Al-Hazzani A, Periyasamy V, Subash-Babu P, Alshatwi AA. Formulation of cashew nut shell liquid (CSNL) nanoemulsion, a potent inhibitor of human MCF-7 breast cancer cell proliferation. *Med Chem Res* 2012; 21(7): 1384-8.
18. Razak S, Afsar T, Almajwal A, Alam I, Jahan S. Growth inhibition and apoptosis in colorectal cancer cells induced by Vitamin D-Nanoemulsion (NVD): involvement of Wnt/β-catenin and other signal transduction pathways. *Cell Bioscience* 2019; 9(1): 15.
19. Guan YB, Zhou SY, Zhang YQ, Tian YD, Jia YY, Sun YJ. Therapeutic effects of curcumin nanoemulsions on prostate cancer. *J Huazhong Univ Sci Technol (Medical Sciences)*. 2017; 37(3): 371-8.
20. da Silva Gündel S, Velho MC, Diefenthaler MK, Favarin FR, Copetti PM, de Oliveira Fogaça A, et al., Basil oil-nanoemulsions: Development, cytotoxicity and evaluation of antioxidant and antimicrobial potential. *J Drug Deliv Sci Technol* 2018; 46: 378-83.
21. Tan W, Wang H, Chen Y, Zhang X, Zhu H, Yang C, et al., Molecular aptamers for drug delivery. *Trends in biotechnology* 2011; 29(12): 634-40.
22. Sandip T, Yi-Meng T, Mansoor A. Preparation and in vitro characterization of multifunctional nanoemulsions for simultaneous MR imaging and targeted drug delivery. *J Biomed Nanotechnol* 2006; 2: 217-24.
23. Dehelean CA, Feflea S, Ganta S, Amiji M. Anti-angiogenic effects of betulinic acid administered in nanoemulsion formulation using chorioallantoic membrane assay. *J Biomed Nanotechnol* 2011; 7(2): 317-24.
24. Dehelean CA, Feflea S, Gheorgheosu D, Ganta S, Cimpean AM, Muntean D, et al. Anti-angiogenic and anti-cancer evaluation of betulin nanoemulsion in chicken chorioallantoic membrane and skin carcinoma in Balb/c mice. *J Biomed Nanotechnol* 2013; 9(4): 577-89.

INVESTIGATING THE BIOLOGICAL EFFECTS OF SYNTHESIZED NANOEMULSION FROM *CARUM CARVI* ESSENTIAL OIL BASED ON CELLULAR TOXICITY AND ANGIOGENIC PROPERTIES

Niloufar Khatamian¹, Masoud Homayouni Tabrizi², Pouran Ardalan³

Received: 11 Feb, 2020; Accepted: 16 May, 2020

Abstract

Background & Aims: Angiogenesis plays an important role in physiological (fetal) and pathological conditions (some diseases such as cancer). Many researchers are interested in encapsulating anti-angiogenic compounds and using them to inhibit the process of angiogenesis in the fight against various diseases. This study evaluated the antiangiogenic properties of *Carum Carvi* essential oil nanoemulsion using the CAM method.

Materials & Methods: In order to investigate the angiogenesis effects of *Carum Carvi* nanoemulsion, on the 2nd day, a window was created on the eggs and on the 8th day, *Carum Carvi* nanoemulsion with different doses (12.5, 25 and 50 µg/ml) were used and on the 12th day, the rate of angiogenesis was investigated. The stereomicroscope was used to take image of the treatment area, and vascular factors were examined with Image J software.

Results: The angiogenic results in the CAM assay showed a decrease in the length and number of vessels in chorioallantoic membranes in the treated samples compared to the untreated. The reduction in height and weight of the treated embryos compared to the untreated was also shown in this study ($p < 0.05$).

Conclusion: The anti-angiogenic activity of *Carum Carvi* nanoemulsion implicates its possible application for diseases where inhibition of blood vessel formation is desired, so it can be recommended as a substance for further studies about cancer.

Keywords: Nanoemulsions, *Carum Carvi* oil, Angiogenesis

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

Tel: +989154505894

Email: mhomayouni6@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2020; 31(4): 304 ISSN: 2717-008X

¹ Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

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

³ Department of Chemistry, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran