مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۸، دی ۱۳۹۸، ۱۰۴۸-۱۰۳۵

اثر سمیت عصاره هیدرو الکلی پوست پسته و فرم لیپوزومی آن بر رده سلول‌های سرطانی کبد (HepG2)

حمیدرضا هرندی[۱]، احمد مجد[۲]، سوده خنامانی فلاحتی پور[۳]، مهدی محمودی[۵،۴]

دریافت مقاله: ۹۸/۳/۲۱ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۸/۴/۱۱ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۸/۴/۲۴ پذیرش مقاله: ۹۸/۴/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: پوست پسته غنی از ترکیبات فنلی و یک منبع ارزان قیمت حاوی آنتی اکسیدان‌ها می‌باشد که می‌تواند گزینه مناسبی جهت مبارزه با سلول‌های سرطانی باشد. این مطالعه با هدف تعیین پتانسیل عصاره هیدروالکلی پوست پسته (*pistacia vera*) و شکل لیپوزومی آن به عنوان یک عامل احتمالی سمیت سلولی در رده سلولی HepG2 که مربوط به سرطان کبد در انسان می‌باشد، انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی اثرات مهاری عصاره پوست پسته و شکل لیپوزومی آن بر روی رده سلول‌های HepG2 و L929 با استفاده از روش دی متیل تیازول - ۲ و ۵ دی فنیل تترازولیوم برمید -(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) [MTT 2,5-diphenyltetrazolium)] در غلظت‌های ۰ تا ۴ میلی‌گرم بر میلی لیتر در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت سنجیده شد و در هر رده سلولی، با استفاده از آزمون تعقیبی Dunnett، میانگین درصد زنده‌مانی سلول‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان داد که عصاره هیدروالکلی پوست پسته باعث کاهش زنده مانی سلول‌های HepG2 می‌شود و با افزایش زمان و افزایش غلظت میزان زنده مانی سلول‌ها کم‌تر می‌شود. نتایج فرم لیپوزومی عصاره نیز نشان داد که عصاره لیپوزومی باعث کاهش زنده مانی سلول‌های HepG2 می شود.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان دهنده کندتر آزاد شدن عصاره در شکل لیپوزومی نسبت به عصاره آزاد بود به عبارتی دیگر نشان دهنده آهسته رهش شدن عصاره در فرم لیپوزومی می باشد. هم‌چنین فرم لیپوزومی عصاره اثر سمیت کم‌تری بر روی سلول‌های سالم L929 به نسبت سلول‌های HepG2 دارد.

واژه‌های کلیدی: سمیت سلولی، پسته، لیپوزوم، سرطان کبد

۱- دانشجوی دکترای تخصصی بیوشیمی، دانشکده بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲- استاد، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۳- استادیار، مرکز تحقیقات سلامت پسته، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
۴- استاد، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان ایران
۵-استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
تلفن: ۳۱۳۱۵۱۷۵-۰۳۴، دورنگار: ۳۱۳۱۵۰۰۳-۰۳۴، پست الکترونیکی: mahmoodies@yahoo.com

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.10.8.2]

مقدمه

گیاهان دارویی قرن‌های زیادی جهت درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود [۱]. پسته (*Pistacia Vera*) متعلق به خانواده آناکاردیاسه (anacardiacea) است (درخت پسته در مرکز هرباریوم دانشگاه فردوسی با کد ۰۱۲-۱۶۲۲-۰۵ شناسایی شد). درخت پسته درخت کوچک با گسترده جغرافیایی از آسیا تا شرق مدیترانه است و تولید کنندگان عمده آن شامل ایران، آمریکا، ترکیه و سوریه می‌باشند [۲]. قسمت‌های مختلف گیاه پسته شامل برگ، دانه و میوه خواص ضد التهابی، ضد میکروبی و ضد سرطانی نشان داده‌اند [۳].

پسته به طور گسترده در زمان‌های قدیم جهت درمان کلیه، کبد، قلب و دستگاه تنفس استفاده گردیده است [۴]. پوست پسته هنگام فرآوری از میوه پسته جدا می‌شود و سالیان زیادی است که به عنوان ضایعات پسته دور ریخته می‌شود و یک منبع ارزان حاوی ترکیبات فنلی است [۵].

پسته و پوست آن منبع غنی از ترکیبات فنلی، آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی مانند گالوتنین (Gallotannins)، اسید گالیک (Gallic acid)، مریستین (Myricetin) و کورستین (Quercetin) می‌باشد و اخیرا" در دسته ۵۰ منبع غنی از ترکیبات فنلی قرار گرفته است و این ترکیبات در پوست پسته نسبت به مغز پسته بیش‌تر است. گونه‌های مختلف پسته و هم‌چنین اجزاء مختلف درخت و میوه پسته خواص آنتی اکسیدانی را نشان می‌دهند. از جمله برگ و میوه پسته خاصیت آنتی اکسیدانی را نشان داده است [۶].

لیپوزوم‌ها (Liposomes)، وزیکول‌های کروی هستند که ترکیبات غشایی آن‌ها فسفولیپیدها هستند و قطری از ۲۰ نانومتر تا ۱۰ میکرومتر دارند. دارای ویژگی‌هایی نظیر، سمیت ذاتی پایین، زیست تجزیه‌پذیری و فقدان ایمینوژنیسیته می‌باشند و از آن‌ها به عنوان ناقلین غیر ویروسی در انتقال ژن و حامل‌های دارویی (داروهای محلول در آب و چربی) استفاده می‌شود. از دیگر کاربردهای آن‌ها می‌توان به استفاده از آن‌ها در ایمنی درمانی به‌عنوان ایمنوادجوانت اشاره نمود [۷]. لیپوزوم‌ها می‌توانند به نحوی مؤثر داروها و مواد زیستی فعال را درون خود به دام اندازند و آن‌ها را درون بدن در درازمدت آزاد نمایند [۸]. زمانی که داروهای گیاهی درون لیپوزوم‌ها بارگیری می‌شوند میزان حلالیت، فعالیت فارماکولوژیکی و دوام آن‌ها افزایش و از طرفی میزان سمیت آن‌ها کاهش می‌یابد [۹].

با توجه به اینکه سرطان کبد درکشورهای پیشرفته دنیا در حال افزایش است [۱۰] و این سرطان در برخی موارد مقاومت دارویی نشان داده است [۱۱]. بنابراین تلاش جهت پیداکردن داروهای جدید علیه این نوع سرطان اهمیت فوق‌العاده‌ای پیدا کرده است و همچنین درخت پسته گستردگی بالایی در جهان از جمله ایران دارد [۱۲] و با توجه به این‌که چنین مطالعه‌ای قبلا انجام نگرفته است، این مطالعه با هدف تعیین تفاوت اثر سمیت سلولی عصاره پوست

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.10.8.2]

پسته با فرم لیپوزومی آن بر سلول‌های سرطانی HepG2 انجام شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع مطالعه آزمایشگاهی است که از شهریور ماه ۱۳۹۷ تا اسفند ماه سال ۱۳۹۷ به طریق زیر انجام گرفت. پوست تازه پسته رقم فندقی در اواخر تابستان ۱۳۹۷ از باغات رفسنجان تهیه و پس از تأیید گیاه شناس دانشگاه ولی عصر رفسنجان، شسته و در سایه خشک شد سپس پوست پسته توسط آسیاب (SW, Snijders Scientific, Holland) پودر شد. به ۵۰۰ گرم از پودر بدست آمده مقدار ۱۰۰۰ میلی لیتر مخلوط الکل اتیلیک ۹۶ درصد (Sigma, Germany) و آب مقطر (به نسبت الکل ۷۵ و ۲۵) اضافه شد، ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه در حال به هم زدن با دستگاه مگنت استریر (113, Ara medical, Iran) انکوبه شد، سپس به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی قرار داده شد و بعد از این مدت، محلول حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد، محلول حاصله را در پتری دیش‌های استریل آزمایشگاهی ریخته و درون دستگاه فریز درایر (VaCo5-D, zibrus technology, germany) قرار گرفت تا به‌طور کامل خشک شد و پودر کریستالی ایجاد گردید. سپس با استفاده از کاردک‌های استریل، پودری که به کف ظروف چسبیده بود، جدا گردید و مورد استفاده قرار گرفت. برای نگهداری طولانی مدت، پودر مربوطه درون ظروف مناسب در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد (fh, LG, Korea) نگهداری شد. برای حل کردن پودر عصاره از بافرفسفات سالین [Phosphate-buffered saline (PBS)] با pH:۷/۴ استفاده شد و غلظت‌های ۰-۴ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره با استفاده از این بافر ساخته شد [۱۳].

جهت تهیه لیپوزوم‌ها، از روش آب گیری و آب‌دهی استفاده شد. به این منظور، لسیتین (Solarbio) و کلسترول (Samchun) به نسبت‌های وزنی مختلف ترکیب شدند. لسیتین و کلسترول با نسبت ۶ به ۴ در بالن ته گرد در حلال کلروفرم (Samchun) حل شد و سپس به کمک روتاری (Sorisole, LabTech S.r.l., Italy) و تبخیر حلال در ۴۰ درجه سانتی‌گراد، لایه نازک چربی در بالن باقی ماند. سپس به مدت یک شب بالن در پمپ خلأ قرارگرفته تا لایه لیپیدی به صورت کامل خشک گردید و اگر حلال آلی اضافی وجود داشت، حذف گردید. در مرحله بعد هیدراتاسیون انجام گردید، به این صورت که یک میلی‌لیتر بافر PBS حاوی مقدار مشخص (ده میلی‌گرم) عصاره به کلسترول و لسیتین اضافه شده و مخلوط حاصل تحت التراسونیکیشن به مدت یک ساعت قرار گرفت تا لیپوزوم‌های مناسب حاصل شدند. سپس مخلوط حاصل جهت غلظت سازی با بافر PBS رقیق شده و غلظت‌های ۵۰۰ تا ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. لیپوزوم‌های خالی (بدون عصاره) نیز به روش ذکر شده تهیه شدند با این تفاوت که در مرحله آبدهی از بافر PBS بدون عصاره استفاده شد. جهت جدا کردن ذرات بزرگتر از کوچک‌تر و یکنواخت کردن لیپوزومها از صافی ۰/۴۵ میکرونی و سپس ۰/۲ میکرونی استفاده شد (Siringe, Biofile, Germany). در فیلتراسیون

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.10.8.2]

علاوه بر اینکه لیپوزوم‌ها بر اساس سایز جدا می‌گردند. ویروس‌ها و باکتری‌ها نیز به دام افتاده و احتمال بروز آلودگی کاهش می‌یابد [۱۴].

در این مطالعه از رده‌های سلولی سرطانی کبد انسان (HepG2) استفاده شد و سلولهای فیبروبلاست موش (L929) به عنوان کنترل استفاده شده است [۱۵]. سلول‌های مورد نظر از انستیتو پاستور خریداری شدند. میکروتیوپ‌های حاوی رده سلولی پس از دو بار پاساژ و رسیدن تعداد سلول‌ها به حد لازم (پوشش بالای ۷۰ درصد) با تریپسینه کردن محیط کشت جهت آنالیزهای بعدی استفاده شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 (Gibco) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله Fetal bovine serum (FBS)، آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین (100u/ml) و استرپتومایسین (100mgr/ml) کشت شده و در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد CO_2 انکوبه شد [۱۶].

۲۵ میلی گرم پودر MTT (Sigma, Germany) را به ۵ میلی لیتر محیط کشت RPMI1640-phenol red (Sigma, Germany) اضافه کرده سپس در حجم یک میلی لیتر تهیه و در ظرف تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در این مرحله سلول‌های داخل فلاسک (T75, SPL, Korea) تریپسینه شد و با استفاده از محلول PBS شستشوی آنها انجام شد و سپس سانتریفیوژ شد. سپس محیط کشت اضافه شد و سلول‌ها روی ۵۰۰۰ سلول تنظیم شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این سلول‌ها به هر چاهک در پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. واکنش رنگ سنجی مستقیم است و با استفاده از رنگ MTT (۳-۴ و ۵- دی متیل تیازول-۲ ایل ۲ و ۵-دی فنیل تترازولیوم بروماید زرد) (Sigma,Germany) انجام شد. به چاهک محتوی سلول‌ها که حاوی حداکثر ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت و ۵۰۰۰ سلول بود، ۱۰ میکرولیتر از رنگ MTT (۵ mg/ml) اضافه شد و پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از ۴ ساعت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول دی متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک اضافه شد و سه دقیقه در دور rpm ۱۲۰۰ سانتریفوژ شد تا محلول شفاف و رنگی به دست آمد. پلیت را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. پس از آن میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط Elisa reader (Biotech ELX808, USA) خوانش شد.

درصد زنده مانی سلول‌ها از فرمول :

" = (تعداد سلول‌های زنده / تعداد کل سلول‌ها) × 100

توان زیستی سلول‌ها "محاسبه گردید

[۱۷-۱۸] .

روش محاسبه حجم نمونه و تعداد آن

سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ چاهکی و پس از سه بار تکرار در سه چاهک کشت داده شدند. نتایج برگرفته از آزمایش‌ها در یک چک لیست ثبت و وارد رایانه شد. در مجموع ۸ غلظت کمپلکس بر سلول سالم و سرطانی (۳ بار تکرار و هر غلظت ۳ نمونه) و تعداد ۱۴۴ نمونه موجود بود [۱۹]. اطلاعات جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پس از تأیید

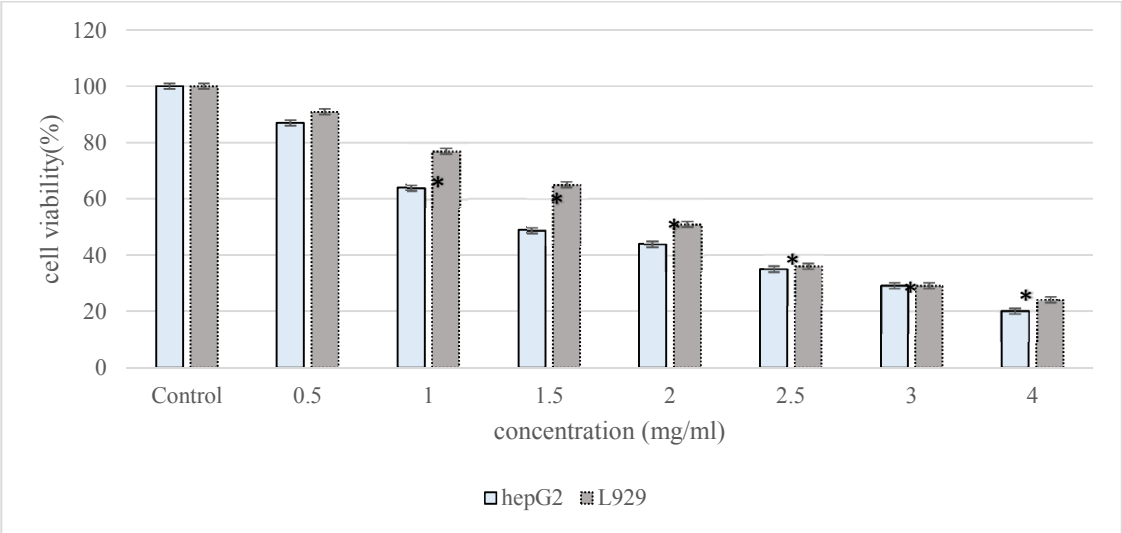
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.10.8.2]

فرض نرمالیتی با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف، جهت مقایسه میانگین میزان زنده مانی سلول‌ها در غلظتهای مختلف با گروه کنترل (غلظت ۰) از آزمون تعقیبی Dunnett استفاده شد. داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین و در قالب نمودار گزارش شدند. سطح معنی‌داری در تمام آزمون‌ها برابر با ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

برای هر کدام از رده‌های سلولی، با استفاده از آزمون تعقیبی Dunnett، درصد زنده مانی غلظت‌های مختلف با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج تست MTT بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون رده سلولی HepG2 و L929 با غلظت‌های مختلف عصاره پوست پسته و فرم لیپوزومی آن نشان می‌دهد که اثر عصاره پوست پسته در هر دو رده سلولی در زمان ۲۴ ساعت از غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر و بیش‌تر از آن و در زمان ۴۸ ساعت از غلظت ۰/۵میلی‌گرم بر میلی لیتر و بیش‌تر از آن در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار شد (P<۰/۰۵). IC50 (half maximal inhibitory concentration) برای سلول‌های HepG2 در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۱/۵ و ۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. در حالیکه IC50 سلول‌های سالم L929 در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۲ و ۱/۵ میلیگرم بر میلی لیتر به‌دست آمد (نمودار ۱ و ۲). هم‌چنین نتایج حاصل از اثر فرم لیپوزومی عصاره نیز نشان داد در زمان ۲۴ ساعت از غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بیش‌تر از آن و در زمان ۴۸ ساعت از غلظت ۰/۵میلی گرم بر میلی‌لیتر و بیش‌تر از آن در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار شد (P<۰/۰۵) و IC50 مربوطه برای فرم لیپوزومی در سلول‌های HepG2 در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۲ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (نمودار ۳ و ۴).

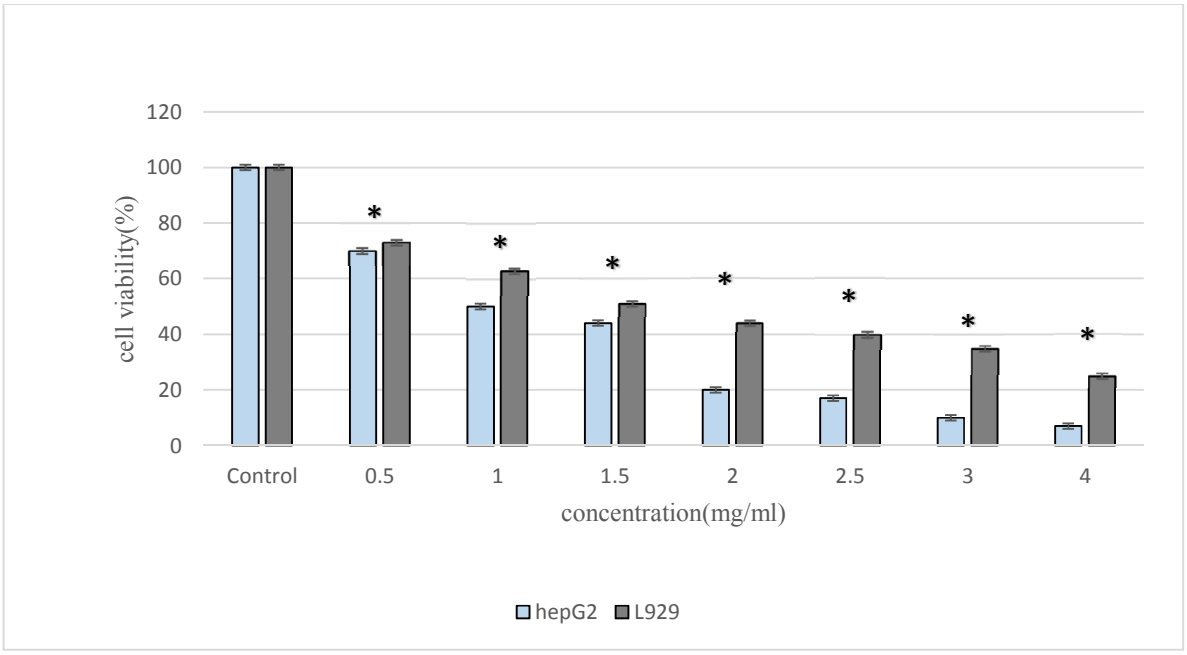


** آزمون Dunnett، معنی داری در سطح پنج درصد در مقایسه با گروه کنترل*

نمودار ۱- میانگین درصد زنده مانی غلظت‌های مختلف عصاره پوست پسته بر روی HepG2 و L929 بعد از ۲۴ ساعت با روش MTT

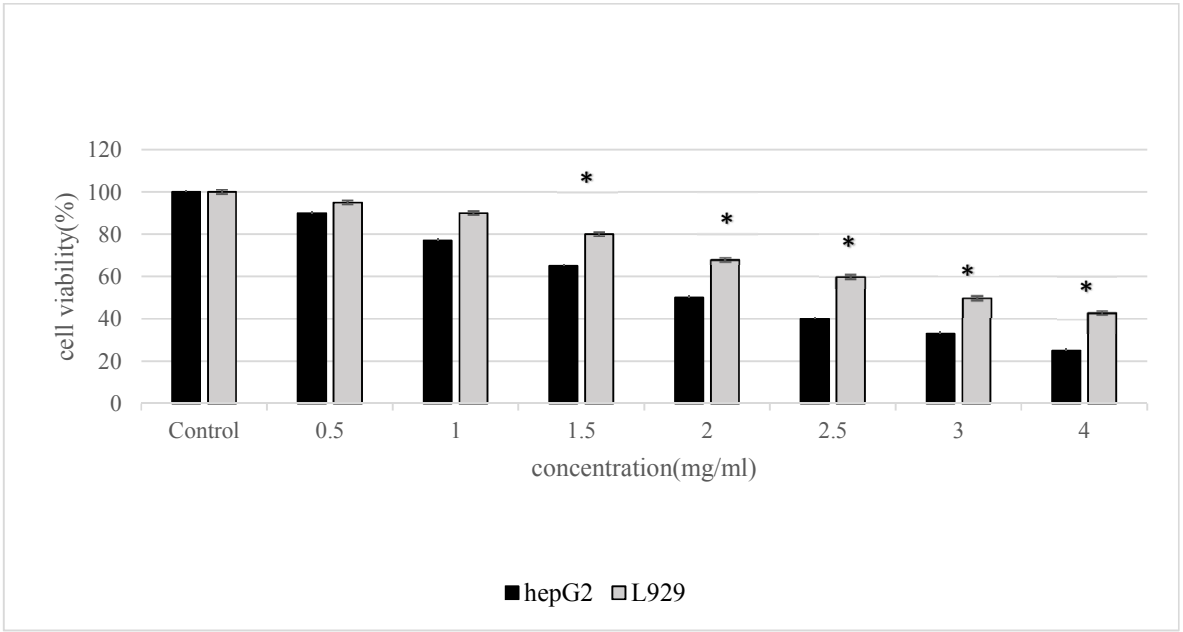
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.10.8.2]



** آزمون Dunnett، معنی داری در سطح پنج درصد در مقایسه با گروه کنترل*

نمودار ۲- میانگین درصد زنده مانی غلظت‌های مختلف عصاره پوست پسته بر روی HepG2 و L929 بعد از ۴۸ ساعت با روش MTT

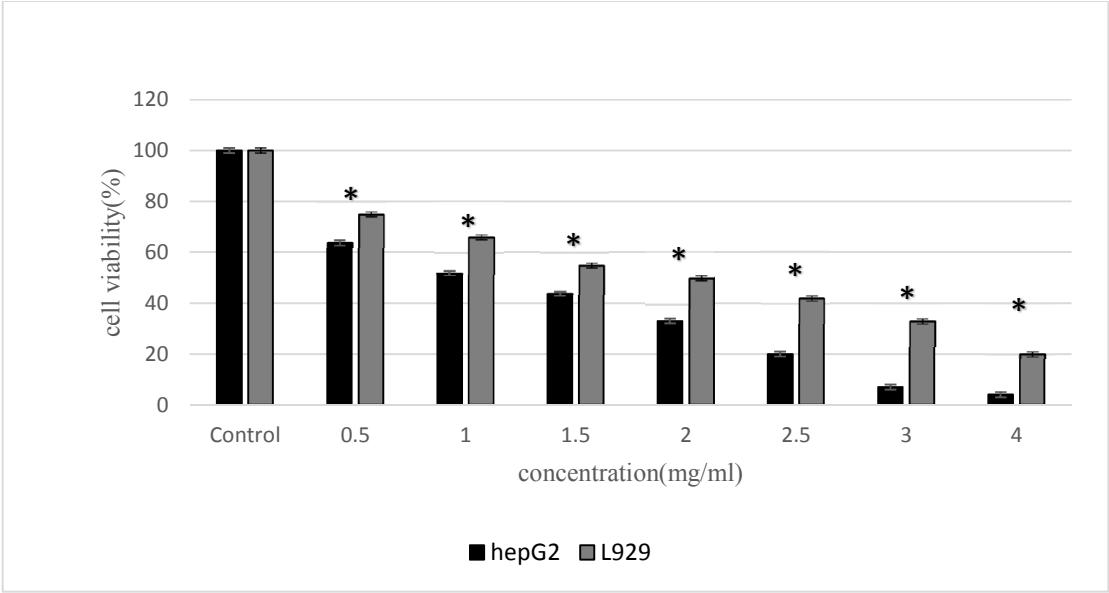


** آزمون Dunnett، معنی داری در سطح پنج درصد در مقایسه با گروه کنترل*

نمودار۳- میانگین درصد زنده مانی غلظت‌های مختلف عصاره لیپوزومی پوست پسته بر روی HepG2 بعد از ۲۴ ساعت با روش MTT

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.10.8.2]



** آزمون Dunnett، معنی داری در سطح پنج درصد در مقایسه با گروه کنترل*

نمودار ۴- میانگین درصد زنده مانی غلظت‌های مختلف عصاره لیپوزومی پوست پسته بر روی HepG2 بعد از ۴۸ ساعت با روش MTT

بحث

در این مطالعه اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی پوست پسته و هم‌چنین فرم لیپوزومی آن بر روی سلول‌های سرطانی HepG2 با استفاده از روش MTT انجام شد. در مقایسه با گروه کنترل بدون تیمار، اثر عصاره و فرم لیپوزومی آن علاوه بر سلول‌های HepG2 برسلول‌های L929 (به عنوان سلول سالم) نیز بررسی شد و نتایج حاصله نشان داد که با افزایش غلظت عصاره و زمان تیمار، میزان زنده مانی سلول‌ها کاهش می‌یابد.

در واقع ترکیبات فنلی عصاره به‌دلیل داشتن خواص آنتی اکسیدانی فراوان، مهار سلول‌های سرطانی را افزایش می‌دهند [۲۰]. ترکیبات فنولی موجود درگیاهان دارویی در پیشگیری و درمان سرطان نقش مهمی دارند. ترکیبات فنلی شامل اسید فنولیک، فلاونوئیدها، تانن‌ها، کورکومینوئیدها، کومارین‌ها، لیگنان‌ها، کینون‌ها و غیره هستند و خواصی مانند آنتی اکسیدانی، اثرات ضد انعقادی، ضد التهابی را از خود نشان می‌دهند [۲۱]. این مشتقات جدا شده از گیاهان دارویی در رده سلول‌های سرطانی گوناگونی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند از جمله توت فرنگی و تمشک که در رده سلولی سرطانی پستان، کولون و پروستات بررسی شده اند که نشان داده شده غلظت‌های مختلف این ترکیبات فنلی رشد سلول‌ها را مهار می‌کند [۲۳-۲۲].

در تمامی مطالعات قبلی با توجه به اینکه عصاره پسته استفاده شده و نه عصاره پوست پسته و این تحقیق برای اولین بار انجام می‌شود، نمی‌توان به مقایسه داده‌ها پرداخت اما می‌توان نتایج را با نتایج کلی مغز پسته و هم‌چنین با فرم

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.10.8.2]

لیپوزومی عصاره سایر گیاهان و سایر داروها مقایسه کرد. از جمله در مطالعه ای که بر روی تأثیر پسته وحشی بر رده سلولی سرطانی کولون به انجام رسیده نشان داده شده است که پسته وحشی حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات پلی فنولیک، فلاونوئیدها و آنتوسیانین است که به دلیل وجود ترکیبات زیست فعال، عصاره متانولی پسته وحشی اثرات سمیت سلولی قابل توجهی در برابر سلول‌های سرطان روده بزرگ HT29 انسان از خود نشان می‌دهد [۲۴]. درمطالعه حاضر نیز به این نتیجه رسیدیم که این ترکیبات فنلی پتانسیل مهار کنندگی رشد سلول‌های سرطان کبد را دارند. در مطالعهای دیگرکه توسط Rezaei و همکاران بر روی تأثیر پوست بنه (پسته نوع وحشی) بر روی رده سلولی سرطانی پستان T47D انجام گرفت، خواص ضد سرطانی بنه تأیید شده است [۲۵]. در مطالعه حاضر نیز اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی پوست پسته بر روی رده سلولی HepG2 آشکار شد و نشان داده شد با افزایش غلظت و زمان، زنده‌مانی سلول‌ها کاهش می‌یابد. در مطالعه‌ای دیگرکه توسط Balan و همکاران انجام شد مشخص گردید که ترکیبات مشتق از بنه، باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی روده انسان می‌شوند [۲۶] که نتایج مطالعه حاضر نیز این پتانسیل ضد سرطانی را تأیید می‌کند. هم‌چنین در مطالعه‌ای اثر عصاره هگزان، اتیل استات، متانول و آبی پسته بر روی سرطان کلون و سینه با روش MTT انجام شد که نشان دهنده کاهش زنده‌مانی سلولی این سرطان‌ها می‌شود [۲۷].

در مقایسه با مطالعه Jourghanian و همکارانش در آمریکا که اثرات کورکومین (ماده مؤثره زردچوبه) بارگیری شده درون لیپوزوم و کورکومین به فرم آزاد را بر فاکتور NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) و ژن‌های تحت کنترل آن از جمله اینترلوکین ۸ (IL-8) و سیکلواکسیژناز ۲ (COX-2) در ۶ رده سلولی سرطانی پانکراس (BxPC-3, Capan-1, Capan-2, ASPC-1, HS766-T, MiaPaCa2) مورد مطالعه قراردادند و نتایج حاکی از آن بود که کورکومین لیپوزومی در مقایسه با کورکومین به فرم آزاد قدرت بیش‌تری در مهار فعالیت NF-κB،IL-8 و COX-2 دارد که درنتیجه مهار رشد سلول‌ها کاهش یافته و آپوپتوز در آن‌ها القاء گردید [۲۸]. نتیجه حاضر نشان می‌دهد که فرم لیپوزومی سنتز شده، قادر است عصاره مورد نظر را به آهستگی آزاد کند در واقع میزان سمیت عصاره کاهش یافت ولی در افزایش قدرت مهاری عصاره تأثیری نگذاشت و در نهایت قدرت مهار رشد سلولی عصاره لیپوزومی در غلظت IC50 برابر با قدرت عصاره تنها در غلظت IC50 بود. هم‌چنین نتایجی مشابه با مطالعه Ochiو همکارانش در دانشگاه تهران به‌دست آمد که آنها نانولیپوزوم‌های کروی با غشاء لیپیدی سنتز کردند و به عنوان حامل‌های دارویی برای بهبود رسانش عوامل درمانی مورد مطالعه قرار دادند. این تحقیق به منظور بررسی هدف مندسازی نانو سامانه لیپوزومی حامل داروی گیاهی سیلیبینین برای رسانش به سلول‌های سرطانی کبد ارائه گردید. نتایج حاکی از آن بود که انکپسوله شدن سیلیبینین

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.10.8.2]

در نانولیپوزوم، فعالیت بیولوژیکی آن را بهبود بخشیده و پایداری آن را در خون افزایش می‌دهد؛ بنابراین این سامانه می‌تواند راهکاری مؤثر برای افزایش پایداری این ماده در بدن باشد [۲۹]. در مقایسه این تحقیق با مطالعه حاضر می توان گفت که نتایجی مشابه به‌دست آمد و نتایج IC50 در زمان ۴۸ ساعت با نتایج عصاره به تنهایی مشابه شد که نشان دهنده این است که در واقع قدرت عصاره بیشتر نشده است اما اثرات کم‌تری بر روی سلول‌های سالم L929، نسبت به عصاره تنها می‌گذارد. هم‌چنین نتایجی عکس با مطالعه Karimi در دانشگاه اردبیل که اثر سیتوتوکسی سیتی عصاره خیار وحشی (Ecballium elaterium) را به دو فرم عصاره خالص و نانو لیپوزوم حاوی عصاره بر سلول‌های آدنوکارسینومای معده انسان مورد بررسی قراردادند که نتایج آنها نشان داد که فرم نانو لیپوزومی عصاره دارای اثرات سیتوتوکسی سیتی بیش‌تری در مقایسه با فرم عصاره بدون لیپوزوم می‌باشد [۳۰].

نتایج مطالعه حاضر نیز احتمالاً می‌تواند به دلیل ترکیبات فنلی گوناگونی باشد که در پوست پسته به میزان زیادی وجود دارد و اثرات سمیت سلولی و ضد سرطانی خود را نشان می‌دهد و موجب کاهش معنی‌داری در زمان ۲۴ ساعت در زنده مانی سلول‌های HepG2 شد و هم‌چنین اثرات سمیت سلولی این عصاره بر روی رده سلول‌های فیبروبلاست موشیL929 نیز کاهش معنی‌دار را نشان داد ولی نه به اندازه سلول‌های HepG2. همین نتایج در مدت زمان ۴۸ ساعت برای سلول‌های HepG2 و L929 نشان دهنده اثرات سمیت سلولی بیش‌تر این عصاره در زمان ۴۸ ساعت است و هم‌چنین در زمان ۴۸ ساعت نیز اثرات سمیت سلولی عصاره بر سلول‌های HepG2 بیش‌تر از L929 است. در واقع روش معمول درمان سرطان این است که ماده مؤثره را وارد بدن می‌کنند و این ماده علاوه بر سلول‌های سرطانی ، سلول‌های سالم را نیز متأثر می‌کند از آنجایی که پوست پسته یک ماده طبیعی گیاهی است تأثیر مخرب کم‌تری بر روی سلول‌های سالم می‌گذارد و در نهایت سبب افزایش اثر درمانی می‌شود. مطالعه حاضر نشان داد که عصاره به شکل لیپوزومی موجب رهایی کندتر (آهسته رهش) عصاره می‌شود که احتمالا" به دلیل اینکه در فرم لیپوزومی، عصاره در یک غشاء فسفولیپیدی دیگر قرار گرفته است در نتیجه مدت زمان بیش‌تری نیاز است تا عصاره از این غشاء آزاد شود و هم‌چنین اثرات سمیت سلولی کم‌تری بر روی سلول‌های سالم L929 می‌گذارد.

به هر حال علی رغم این تحقیق، جهت مشخص شدن اثرات پوست پسته مطالعات بیش‌تری نیاز است و پیشنهاد می‌شود در آینده مطالعاتی مشابه بر روی گونه‌های دیگر پسته و روش‌های دیگر عصاره گیری و همچنین رده‌های سلولی سایر سرطان‌ها و مشخص شدن ماده موثره و مکانیسم عمل ماده مؤثره صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه در مجموع نشان داد که عصاره پوست پسته و هم‌چنین فرم لیپوزومی آن خاصیت سمیت سلولی

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.10.8.2]

دارند با این تفاوت که در فرم لیپوزومی، عصاره به تدریج آزاد می‌شود و هم‌چنین سلول‌های سالم L929 در فرم لیپوزومی نسبت به سلول‌های سرطانی HepG2 مقاومت بهتری نسبت به عصاره از خود نشان می‌دهند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان و جناب آقای دکتر محمدهادی نعمت اللهی از دانشکده پزشکی افضلی پور کرمان جهت تهیه فرم لیپوزومی صمیمانه قدردانی می‌نمایند..

References

[1] Zhuang S-R, Chiu H, Chen S, Tsai J, Lee M, Lee H, et al. Effects of a Chinese medical herbs complex on cellular immunity and toxicity-related conditions of breast cancer patients. *Br J Nutr* 2012; 107(5): 712-718.

[2] AL-Saghir MG, Porter DM. Taxonomic revision of the genus Pistacia L.(Anacardiaceae). *AJPS* 2012; 3:12.

[3] Martorana M, Arcoraci T, Rizza L, Cristani M, Bonina FP, Saija A, et al. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effect of pistachio (Pistacia vera L., variety Bronte) seed and skin extracts. *Fitoterapia* 2013; 85: 41-8.

[4] Iranmanesh F, Mousaei Amin A, Shamsizadeh A, Fatemi I, Malaki Rad A, Rahnama A. Effects of Pistacia Vera Hydro-Alcoholic Extract on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Male Rats. *IJPT* 2016; 14: 35-0.

[5] Mahoney N, Molyneux RJ. Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in Aspergillus flavus by constituents of walnut (Juglans regia). *J Agric Food Chem* 2004; 52: 1882-9

[6] Barreca D, Laganà G, Leuzzi U, Smeriglio A, Trombetta D, Bellocco E. Evaluation of the nutraceutical, antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (Pistacia vera L., variety Bronte) hulls. *Food Chem* 2016; 196 :493-502..

[7] Raissi S, Shareghi B, Raissi S. An overview of application and types of liposomes. *Genetics in the Third Millennium* 2012; 9: 2583-88..

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.10.8.2]

[8] Pattni BS, Chupin VV, Torchilin VP. New developments in liposomal drug delivery. *Chem Rev* 2015; 115: 10938-66.

[9] Plangsombat N, Rungsardthong K, Kongkaneramit L, Waranuch N, Sarisuta N. Anti-inflammatory activity of liposomes of Asparagus racemosus root extracts prepared by various methods. *EXP THER MED* 2016; 12: 2790-6.

[10] Zhang H, Deng T, Liu R, Bai M, Zhou L, Wang X, et al. Exosome-delivered EGFR regulates liver microenvironment to promote gastric cancer liver metastasis. *Nat. Commun* 2017; 8: 150.

[11] Galun D, Srdic-Rajic T, Bogdanovic A, Loncar Z, Zuvela M. Targeted therapy and personalized medicine in hepatocellular carcinoma: drug resistance, mechanisms, and treatment strategies. *J Hepatocell Carcinoma* 2017; 4: 93.

[12] Rabadán A, Pardo JE, Gómez R, Alvarruiz A, Álvarez-Ortí M. Usefulness of physical parameters for pistachio cultivar differentiation. *SCI HORTIC* 2017; 222: 7-11.

[13] Mahmoodi M, Hosseini-Zijoud S-M, Arababadi MK, Khorramdelazad H, Moradi-Sardareh H, Moradi Y, et al. Effect of Persian shallot (Allium hirtifolium Boiss.) extract on glucokinase (GCK), glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) genes expression in diabetic rats. *Afr J Pharm Pharmaco* 2013; 7: 389-96.

[14] Kang MJ, Eum JY, Park SH, Kang MH, Park KH, Choi SE, et al. Pep-1 peptide-conjugated elastic liposomal formulation of taxifolin glycoside for the treatment of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Int J Pharm* 2010; 402: 198-204.

[15] Elsayed EA, Sharaf-Eldin MA, Wadaan M. In vitro evaluation of cytotoxic activities of essential oil from Moringa oleifera seeds on HeLa, HepG2, MCF-7, CACO-2 and L929 cell lines. *ASIAN PAC J CANCER P* 2015; 16: 4671-5.

[16] Choi EJ, Bae SM, Ahn WS. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. Arch. *Pharmacal Res* 2008; 31: 1281.

[17] Mohammad-Sadeghipour M, Mahmoodi M, Falahati-pour SK, Khoshdel A, Fahmidehkar MA, Mirzaei MR, et al. Trigonella foenum-graecum seed extract modulates expression of lipid metabolism-related genes in HepG2 cells. *Asian Pac. J Trop Biomed* 2019; 9: 240.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.10.8.2]

[18] Hosseini FS, Falahati-pour SK, Hajizadeh MR, Khoshdel A, Mirzaei MR, Ahmadirad H, et al. Persian shallot, Allium hirtifolium Boiss, induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Cytotechnology* 2017; 69: 551-63.

[19] Banitaba MH, Davarani SSH, Mehdinia A. Study of interactions between DNA and aflatoxin B1 using electrochemical and fluorescence methods. *Anal Biochem* 2011; 411: 218-22.

[20] Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 2010; 15: 7313-52.

[21] Huang W-Y, Cai Y-Z, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr. Cancer* 2009; 62: 1-20.

[22] Zhang Y, Seeram NP, Lee R, Feng L, Heber D. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *J. Agric. Food Chem* 2008; 56: 670-5.

[23] Seeram NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS, et al. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J Agric. Food Chem* 2006; 54: 9329-39.

[24] Rezaei PF, Fouladdel S, Hassani S, Yousefbeyk F, Ghaffari SM, Amin G, et al. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by pericarp polyphenol-rich extract of Baneh in human colon carcinoma HT29 cells. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 1054-9.

[25] Rezaei PF, Fouladdel S, Ghaffari SM, Amin G, Azizi E. Induction of G1 cell cycle arrest and cyclin D1 down-regulation in response to pericarp extract of Baneh in human breast cancer T47D cells. *Daru* 2012; 20: 101.

[26] Balan K, Prince J, Han Z, Dimas K, Cladaras M, Wyche J, et al. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from Pistacia lentiscus L. var. chia. *Phytomedicine* 2007; 14: 263.

[27] Seifaddinipour M, Farghadani R, Namvar F, Mohamad J, Abdul Kadir H. Cytotoxic Effects and Anti-Angiogenesis Potential of Pistachio (Pistacia vera L.) Hulls against MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Molecules* 2018; 23(1): 110.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.10.8.2]

herbal drug (nano phytosome). *SSU Journals* 2015; 23: 2000-12.

[28] Jourghanian P, Ghaffari S, Ardjmand M, Haghighat S, Mohammadnejad M. Sustained release curcumin loaded solid lipid nanoparticles. *Adv Pharm Bull* 2016; 6: 17

[29] Ochi Ardebili M, Amoabediny G, Rezayat S, Akbarzadeh A, Ebrahimi B. Design and preparation of encapsulated nano-liposome controlled release including silibinin anti-cancer

[30] Karimi N, Bohlooli S, Mazani M. Nanoliposomal formulation of Ecballium elaterium Extract: Cytotoxic Evaluation against Human Gastric Adenocarcinoma (AGS) Cell Line. *Nanomed Res J* 2016; 1 :9-14.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.10.8.2]

Toxicity Effect of Hydro-Alcoholic Extract of Pistachio Hull and Its Liposomal Form on Liver Cancer Cells (HepG2)

H. Harandi[1], A. Majd[2], S. Khanamani Falahati-Pour[3], M. Mahmoodi[4,5]

Received: 11/06/2019 Sent for Revision: 02/07/2019 Received Revised Manuscript: 15/07/2019 Accepted: 16/07/2019

Background and Objectives: Pistachio skin is rich in phenolic compounds and an inexpensive source of antioxidants, which can be a good option for combating cancer cells. The aim of this study was to determine the potential of pistacia vera hydroalcoholic extract and its liposomal form as a potential cytotoxic agent in HepG2 cell line, which is related to human liver cancer.

Materials and Methods: In this in vitro study, the inhibitory effects of pistachio hull extract and its liposomal form on HepG2 and L929 cells were determined by the method of 3- (4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyltetrazolium (MTT) at the concentrations of 0 to 4 mg / ml in 24 and 48 hrs, and for each cell line, the survival mean of the cells was analyzed using Dunnett's test..

Results: The results of this study showed that the hydroalcoholic extract of pistachio skin reduced the survival of liver cancer cells (HepG2) and decreased the cell viability by increasing time and concentration. Also, the results of the liposomal form of the extract showed that the liposomal extract reduced the survival of liver cancer cells (HepG2).

Conclusion: The findings of this study indicated that the extract was more slowly released in the liposomal form than the free extract. Also in the liposomal form of the extract, the extract showed a lower toxicity to healthy L929 cells than liver cancer cells (HepG2).

Key words: Cytotoxicity, Pistachio, Liposomes, Liver cancer

Funding: This study did not have any funds.

Conflict of Interest: None declared.

Ethical approval: This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

How to cite this article: Harandi H, Majd A, Khanamani Falahati-Pour S, Mahmoodi M. Toxicity Effect of Hydro-Alcoholic Extract of Pistachio Hull and Its Liposomal Form on Liver Cancer Cells (HepG2). *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2020; 18 (10): 1035-48. [Farsi]

1- PhD Candidate of Biochemistry, Faculty of Biochemistry, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran, ORCID: 0000-0002-5312-6227
2- Prof., Faculty of Biology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran, ORCID: 0000-0003-3707-7581
3- Assiatant Prof., Pistachio Safety Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran, ORCID: 0000-00023539-8982
4 - Prof., Molecular Medicine Research Center, Research Institute of basic medical Sciences, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
5- Prof., Faculty of Clinical Biochemistry, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran, ORCID: 0000-0002-8463-8364
(Corresponding Author) Tel: (0341) 31315175, Fax: (034) 31315003, E-mail: mahmoodies@yahoo.com

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.10.8.2]