فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۹، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۵۰-۳۵ (۱۳۹۲)

مقایسه اثر ضدسرطانی نانوکپسول عصاره گیاه علف چشمه (*Nasturtium officinalis* (L.) R. Br.) با عصاره متانولی و فراکسیون‌های آن

فاطمه سفیدکن[1*]، بابک ترابی سگوند[2]، محمود نادری[3] و سید اشرف‌الدین گوشه‌گیر[4]

۱*- نویسنده مسئول، استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، پست الکترونیک: Sefidkon@rifr-ac.ir
۲- دکترای عمومی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران
۳- کارشناس ارشد، بخش تحقیقات گیاهان دارویی و محصولات فرعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور
٤- استادیار، مؤسسه مطالعات تاریخ پزشکی طب اسلامی و مکمل

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۱ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۱

چکیده

Nasturtium officinalis (L.) R. Br. با نام فارسی علف چشمه، گیاهیست پایا و آبزی که در جریان‌های آب غالب نواحی ایران می‌روید. در برگ و گل این گیاه ترکیب‌های فلاونوئیدی وجود دارد که می‌توانند خاصیت ضدسرطانی داشته باشند. در این تحقیق به‌منظور تهیه عصاره علف چشمه و فراکسیون‌های آن و تبدیل عصاره به نانوکپسول و بررسی اثر ضدسرطانی عصاره و نانوکپسول‌های تهیه شده از آن، از برگ و گل علف چشمه به روش ماسراسیون با حلال متانول عصاره‌گیری انجام شد. از عصاره تام، فراکسیون‌های دی‌کلرومتانی، دی‌اتیل اتری و متانولی تهیه شد. از روش امولسیون دوگانه نیز برای تهیه نانوکپسول با استفاده از پلی‌لاکتیک-گلایکولیک اسید استفاده شد. نانوکپسول‌های تهیه شده خشک شده و اندازه ذرات و ضریب توزیع آنها تعیین گردید. عصاره معمولی و فراکسیون‌ها به همراه نمونه عصاره نانوکپسول شده به‌منظور ارزیابی اثر مهارکنندگی بر تکثیر سلول‌های سرطانی سینه (T47D) و سرطان کلون (HT-29) با داروی دوکسوروبیسین در غلظت ۵۰۰ نانومولار به‌عنوان شاهد مثبت و کنترل RPMI مقایسه شدند. اندازه‌گیری میانگین اندازه ذرات نانوکپسول نشان داد که ۵۰٪ کل نانوکپسول‌ها ابعادی کوچکتر از ۱۰ نانومتر و ۵۰٪ دیگر ابعادی بین ۵۰ تا ۹۰۰ نانومتر داشتند. در بررسی نتایج ضدسرطانی عصاره و فراکسیون‌های علف چشمه بر روی هر دو نوع سلول‌های سرطانی پستان و کلورکتال، بین ۱ تا ۳ روز مشخص شد که فراکسیون دی‌کلرومتان اثر قویتری در مهار تکثیر سلول‌های سرطانی در مقایسه با عصاره تام و دیگر فراکسیون‌ها دارد. همچنین نانوکپسول‌های تهیه شده نسبت به عصاره تام در یک غلظت ثابت و در مدت زمان مشابه تعداد بیشتری از سلول‌های سرطانی را از بین می‌برند. ضمناً در مجموع اثر ضدسرطانی عصاره علف چشمه بر روی سرطان پستان قویتر از سرطان کولورکتال بود. بنابراین امکان ساخت داروهایی از عصاره این گیاه، به‌ویژه به فرم نانوکپسول قابل بررسی است.

واژه‌های کلیدی: علف چشمه (*Nasturtium officinalis* (L.) R. Br.)، عصاره، نانوکپسول، سرطان کولون، سرطان سینه.

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

نانوکپسول‌ها نانوذراتی هستند که دارای یک پوسته و فضای خالی داخل آن جهت قرار گرفتن و حمل مواد مورد نظر باشند (Yang *et al.*, 2000). فسفولیپیدها با یک سر آب‌دوست و یک سر آب‌گریز وقتی در یک محیط آبی قرار می‌گیرند، تشکیل کپسول‌هایی می‌دهند که سر آب‌دوست آن در بیرون و سر آب‌گریز مولکول در درون آن قرار می‌گیرند، از پلیمرهایی مثل لیپید و پروتئین نیز می‌توان برای ساخت نانوکپسول استفاده کرد (Su *et al.*, 2003).

از مهمترین کاربرد نانوکپسول‌ها دارورسانی هدفمند و ساختن مواد غذایی کاربردی و تعاملی است (Ansel *et al.*, 1999).

تحقیقات مختلف نشان داده که تهیه نانوکپسول از داروهای مختلف باعث می‌شود که نخست سامانه رهایش دارو قابل کنترل باشد، درثانی میزان غلظت دارو در پلاسمای خون برای مدت زمان طولانی بدون رسیدن به نواحی نامطلوب و نامؤثر حفظ شود، سوم اینکه امکان تهیه داروهایی فراهم شود که در مدت زمان کوتاهتر و با دوز کمتر اثربخشی بیشتری داشته باشند (Rafienia *et al.*, 2006).

فرایند عمومی ساخت نانوکپسول‌ها یک امولسیون روغن در آب یا آب در روغن به‌ترتیب نانوکپسول‌های روغنی و آبی هستند (Garti & Aserin, 1996a). برای روکش دادن کپسول‌ها می‌توان از پروتئین‌ها، پلیمرها و مواد طبیعی یا مصنوعی استفاده کرد (Derick & Hodge, 2005). امولسیون تبخیر حلال، یکی از روشهای مرسوم بکار گرفته شده مبتنی بر امولسیون روغن در آب است که فاکتورهای زیادی از قبیل دما، سرعت تبخیر حلال، حجم فاز آبی، شیوه و زمان هم‌زدن، غلظت پروتئین و سورفکتانت، نوع مواد سطح فعال در فاز آبی، سایر افزودنی‌ها در فازهای آبی، وزن مولکولی و ساختار پلیمر، حجم فاز روغنی و غلظت پلیمر بر مورفولوژی، ساختار و نرخ رهایش نانوکپسول‌ها اثر می‌گذارند (Yang *et al.*, 2001).

استفاده از مواد مؤثره گیاهان دارویی به‌صورت نانوکپسول باعث کاهش واکنش ماده فعال (ماده مؤثره گیاهی) با محیط اطراف مانند آب و اکسیژن شده و شدت انتقال یا تبخیر به محیط بیرون را تقلیل می‌دهد. کپسوله کردن موجب می‌شود که آزادسازی تا زمان مورد نظر و ایجاد محرک مورد نظر برای شکست کپسول به تأخیر بیفتد و پس از شروع آزادسازی مواد مؤثره به‌صورت یکنواخت در تمام مخلوط پخش شوند (Zhang *et al.*, 2004). همچنین با توجه به این‌که مقدار مواد مؤثره گیاهی داخل کپسول کم می‌باشد، استفاده از این کپسول‌ها باعث می‌شود که با توزیع یکنواخت داخل ماده میزبان پخش شده و خواص آن مدت زیادی باقی بماند (Dziezak, 1998؛ Garti & Aserin, 1996b).

نانوکپسوله کردن می‌تواند رنگ، شکل، حجم، دانسیته ظاهری، واکنش، پایداری و استقامت، حساسیت نسبت به فشار، دما و نور ماده کپسول شده را تغییر دهد (Sela *et al.*, 1995).

در حال حاضر، سرطان‌ها یکی از مسائل مهم و اصلی بهداشت و درمان در ایران و تمام دنیا می‌باشد. به موازات کاهش مرگ و میر ناشی از بیماریهای عفونی، سرطان یکی از علل اصلی مرگ و میر در بیشتر کشورهای جهان می‌باشد (حنفی، ۱۳۸۵). بیشترین میزان مرگ و میر ناشی از سرطان به‌ترتیب مربوط به سرطان ریه، پستان، پروستات و روده بزرگ است (Kawashita *et al.*, 2005).

Archive of SID

www.SID.ir

گیاهان یکی از مهمترین منابع دارویی مؤثر برای درمان بسیاری از سرطان‌ها می‌باشند. در حال حاضر داروهای ضدسرطان گیاهی که استفاده کلینیکی وسیعی دارند، عبارتند از: آلکالوئیدهای وینکا، اتوپوزاید و تنی‌پوزاید، (مشتقات اپی‌پودوفیلوتوکسین)، تاکسول و مشتقات کامپتوتسین. با توجه به اهمیت روزافزون گیاهان به‌عنوان منابع طبیعی حاوی مواد مؤثره مختلف، بررسی اثر ضدسرطانی عصاره‌های گیاهی برای دستیابی به داروهای جدید ضدسرطان، یکی از اقدامات رایج در مراکز تحقیقاتی جهان می‌باشد (Mendelsohn *et al.*, 2001؛ Katzung, 2001؛ Cecil *et al.*, 2000).

سرطان پستان شایعترین سرطان در بین خانم‌ها در سطح جهان است و ۱۸٪ کل انواع سرطان‌های زنان را تشکیل می‌دهد. تفاوت‌های ژنتیکی سلول‌های متشکله تومور پستان در بیماران مبتلا و تنوع ژن‌های مداخله‌گر در بروز و پیشرفت بیماری و همچنین عدم پاسخ‌دهی به درمان‌های موجود ازجمله علل اصلی عدم موفقیت در درمان این نوع سرطان به‌شمار می‌روند (Mendelsohn *et al.*, 2001؛ Perry, 1996).

سرطان کلون در پی رشد سلول‌های سرطانی در کولون، رکتوم و آپاندیس بروز می‌کند. این سرطان سومین رتبه را در میان شایعترین سرطان‌ها داشته و عنوان دومین عامل مرگ ناشی از سرطان را در جهان غرب به خود اختصاص داده‌است. سرطان کولون معمولاً تا رسیدن به مراحل پیشرفته، هیچ نوع علامتی ندارد (Ionov *et al.*, 1993).

Nasturtium officinalis با نام فارسی علف چشمه، آب تره، بولاغ اوتی از تیره Brassicaceae گیاهیست پایا، آبزی به ارتفاع ۲۰ تا ۸۰ سانتی‌متر که موسم گل آن اردیبهشت تا تیرماه است. اندام مورد استفاده این گیاه برگ آن است. علف چشمه در جریان‌های آب غالب نواحی ایران، راه کرج به چالوس، ارتفاعات سیاه بیشه، عمارلو، اطراف تهران، ری، گیلان، آذربایجان، شیراز، نزدیک بوشهر، سیستان و بسیاری نواحی دیگر می‌روید.

بقراط مصرف علف چشمه را به‌عنوان خلط‌آور توصیه نموده بود و دیوسکورید برای آن اثر مدر قائل بود. علف چشمه (به‌صورت خام و یا شیره‌ی آن)، دارای اثر ضداسکوربوت قوی است، به‌طوری که مصرف آن عوارض ناشی از فقدان ویتامین C را در مدت کوتاهی رفع می‌نماید. برای آن اثر تصفیه‌کننده‌ی خون، نیرودهنده، مدر، اشتهاآور، مقوی معده، آرام‌کننده دردهای عصبی، تب‌بر و کرم‌کش قائلند. در موارد مذکور مخصوصاً در طب عوام از آن استفاده بعمل می‌آید. مصرف آن در بیماریهای قند اثر مفید دارد. علف چشمه، اثر خلط‌آور دارد. مصرف این گیاه باعث کم شدن قند در ادرار مبتلایان به بیماری قند می‌شود. ضمناً مصرف آن در اگزما و ریزش موی سر مؤثر است.

علف چشمه دارای آهن، ید (به مقدار زیاد)، منگنز، کلسیم، یک گلوکزید گوگرددار و محلول در آب به نام گلوکوناستورتین (Gluconasturtine) یا ایزوسولفوسیانوراتیل بنزن است. به‌علاوه دارای ویتامین های A و C به مقدار زیاد و ویتامین D به مقدار کمتر است. مقدار آهن و ید در علف چشمه، بستگی به ترکیب‌های زمینی دارد که در آنجا رشد می‌کند. دانه این گیاه دارای موسیلاژی است که بر اثر هیدرولیز، موادی نظیر آرابینوز، رامنوز، گلوکز و اسید گالاکتورونیک (Acide galacturonique) می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir

تحقیقات نشان داده که در برگ و گل این گیاه بتا-کاروتن، اروسیک اسید (Erucic-Acid)، فیبر، روتین، آسکوربیک‌اسید، ۲- فنیل-اتیل ایزوتیوسیانات، آلانین، گلایسین، متیونین، نیاسین، پنتوتنیک‌اسید، سرین، ریبوفلاوین و تیروزین وجود دارد. این ترکیب‌ها می‌توانند باعث خاصیت ضدسرطانی این گیاه شوند.

هدف از انجام این تحقیق، تهیه عصاره علف چشمه و فراکسیون‌های آن و تبدیل عصاره به نانوکپسول و بررسی اثر ضدسرطانی عصاره و نانوکپسول‌های تهیه شده بود.

مواد و روشها

تهیه مواد گیاهی و عصاره‌گیری

برای این تحقیق برگ و گل علف چشمه در اوایل خرداد از بعد از تونل کندوان (ارتفاع ۲۰۰۰ متر) جمع‌آوری گردید. ابتدا برای خشک شدن در محیط سایه و دمای ۲۵ درجه پهن شد. سپس آسیاب گردیده و با روش خیساندن در حلال یا ماسراسیون مورد عصاره‌گیری قرار گرفت. برای اینکه بتوان حتی‌الامکان همه ترکیب‌های ضدسرطانی گیاه را با هم، در یک عصاره، از گیاه استخراج نمود از متانول ۱۰۰٪ برای استخراج استفاده شد.

فراکسیون‌گیری

برای مشخص شدن اینکه آیا دسته خاصی از مواد مؤثره استخراجی مسئول خاصیت ضدسرطانی این گیاه هستند یا اینکه این اثر برای دسته خاصی بالاتر است اقدام به فراکسیون‌گیری از این عصاره‌ها با استفاده از حلال‌های دی‌اتیل اتر، کلروفرم و متانول شد و اثر ضدسرطانی فراکسیون‌های تهیه شده نیز مورد بررسی قرار گرفت. برای فراکسیون‌گیری مقداری از عصاره تام غلیظ شده در بشر ریخته شد و به آن حجم معینی دی‌اتیل اتر افزوده و آهسته هم زده شد. آنگاه بشر حدود ۱۵ دقیقه در سونی‌کیتور قرار گرفت تا مواد در حلال حل شوند. سپس فراکسیون دی‌اتیل اتر در ارلن جمع‌آوری شد. به همین صورت تهیه فراکسیون با حلال‌های دی‌کلرومتان و متانل نیز انجام شد و حلال موجود در فراکسیون‌ها با استفاده از دستگاه تبخیر در خلأ حذف شد (Handa *et al*., 2008).

تهیه نانوکپسول

از روش امولسیون دوگانه آب/روغن/آب- تبخیر حلال برای تهیه نانوکپسول استفاده شد. در فاز آبی داخلی عصاره گیاهی و حلال بکار رفت. به این صورت که مقداری از عصاره علف چشمه وزن شده و در متانول در حمام ٦٠ درجه سانتی‌گراد با استفاده از همزن حل شد. فاز روغنی شامل پلیمر پلی‌لاکتیک گلایکولیک اسید و حلال بود. ابتدا وزن خاصی از پلیمر PLGA (یک بار پلیمر ۵۰:۵۰ و یک بار پلیمر ۷۵:۲۵) وزن و به آن حلال دی‌کلرومتان اضافه شد تا محلول پلیمری بدست آید. برای تهیه فاز آبی خارجی از پلیمر و حلال با تهیه محلول ۳٪ وزنی پلی‌وینیل الکل استفاده شد.

پس از تهیه فاز داخلی آبی و فاز روغنی، فاز روغنی درون حمام یخ در دستگاه سونیکاتور (TECHNO GAZ s.p.a) گذاشته شد. سپس۲۰٪ وزنی از فاز داخلی آبی (عصاره گیاهی) به‌صورت قطره قطره با سرنگ به محلول پلیمری تحت امواج اولتراسونیک به مدت ۲ دقیقه افزوده شد تا امولسیونی یک دست از فاز آبی حاوی دارو پراکنده شده در فاز روغن بدست آمد.

پس از تهیه‌ی امولسیون آب/روغن، این محلول به‌صورت قطره قطره با سرنگ به ۲۵ میلی‌لیتر فاز خارجی

Archive of SID

www.SID.ir

آبی تحت امواج ماوراء صوت به مدت ۲ دقیقه افزوده شد تا امولسیونی یک دست از آب/روغن/آب بدست آمد. امولسیون w1/o/w2 بدست آمده از سونیکاتور خارج شده و روی همزن با دور rpm ۱۵۰۰ قرار گرفت تا حلال آن خارج شد. سپس نمونه‌ها با دور rpm ۳۳۰۰ سانتریفیوژ شده و ذرات بدست آمده سه بار با آب دیونیزه شستشو داده شدند؛ تا ذرات عصاره دارویی بارگذاری نشده از سیستم خارج شده و خطای تست رهایش به کمینه مقدار خود برسد. پس از شستشو، به مدت ۱۲ ساعت داخل خشک‌کن سرمایشی LD، (ALPHA ۱-۲ Gemny) در دمای ۵۷- درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۰/۰۳ پاسکال قرار داده شد تا آب باقی‌مانده در سیستم از بین برود، زیرا پلیمر حاوی عصاره دارویی تحت تأثیر آب ممکن است تخریب هیدرولیکی شود (Matsumoto, 1987).

خشک کردن نمونه نانوکپسول با استفاده از دستگاه فریز درایر (Thermo MODULOD-230) صورت گرفت و پس از اطمینان از انجماد کامل ذرات، در دمای ۵۰- سانتی‌گراد و فشار m bar ۰/۰۲ عملیات لیوفیلیزاسیون انجام شد.

تهیه تصاویر SEM از نانوکپسول‌ها

برای تهیه تصاویر SEM کمی از نانوکپسول‌های تهیه شده به‌وسیله چسب دو طرفه روی پایه مخصوص (holder) تثبیت شد و پوششی از طلا با ضخامت چند لایه اتمی بر روی آنها ایجاد شد (Scahing Electron Microscope TESCA/VEGA) و تصویربرداری SEM انجام گردید.

انجام آزمایش‌های کشت سلولی و سایتوتوکسیک

رده سلولی T47D سرطان پستان و HT-29 سرطان کلون انسان در آزمایشگاه تحقیقات مولکولی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد.

محیط کشت RPMI-1640، با ۱۰٪ FBS و ۱٪ آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین/استرپتومایسین در شرایط استریل مخلوط و در دمای یخچال (٤- درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردید و پیش از هر بار مصرف دمای آن با قرار دادن در حمام آب گرم به ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسانیده شد (حنفی، ۱۳۸۵؛ Abdolmohammadi *et al.*, 2006).

برای تهیه بافر، از نمک‌های KH2 PO4، KCl، NaCl و Na2 HPO4. 7H2O استفاده شد و pH آن در محدوده ۷/۲ تا ۷/٦ تنظیم گردید. سپس به کمک اتوکلاو با فشار ۱۵ psi به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید. این بافر به‌عنوان محلول شستشو قبل از جداسازی سلول‌ها و همچنین به‌عنوان رقیق‌کننده Trypsin-EDTA بکار رفت. بافر PBS در یخچال نگهداری شد و قبل از مصرف به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسانده شد (Matysik *et al.*, 2005).

آماده‌سازی رقت‌های مختلف دوکسوروبیسین و عصاره گیاهی

ابتدا ۱ میلی‌لیتر محلول با رقت ۲×۱۰^{-٤} مولار از ویال دوکسوروبیسین تهیه شد و بعد به مقادیر خاصی رقیق شد تا رقت‌های ۲×۱۰^{-٥} مولار، ۲×۱۰^{-٦} مولار و ۲×۱۰^{-۷} مولار بدست آید. رقت‌های دوکسوروبیسین دور از نور و در یخچال نگهداری شده و برای هر بار آزمایش محلول‌های تازه تهیه شد (Matysik *et al.*, 2005). به‌منظور تهیه سری رقت از عصاره یا فراکسیون‌های تهیه شده علف چشمه،

Archive of SID

www.SID.ir

DMSO به‌عنوان مناسبترین حلال شناخته شد. سپس محلول یکنواختی از عصاره به غلظت ۱g/۵ ml تهیه گردید و به‌عنوان محلول استوک در نظر گرفته شد. برای تهیه رقت های دیگر، این استوک ابتدا در PBS رقیق شد و بعد رقت های لازم جهت آزمایش در شرایط استریل به‌وسیله محیط کشت RPMI 1640 به‌طوری تهیه شد که غلظت DMSO در محدوده غیررسمی (۱٪ و کمتر) باشد و این رقت‌ها در آزمایش‌های اصلی برای بررسی‌های سلولی و مولکولی استفاده گردید.

پاساژ سلولی

سلول های سرطانی مورد نظر در فلاسک کاشته شدند و هر روز از لحاظ وضعیت ظاهری و تکثیر در زیر میکروسکوپ اینورت بررسی شدند. سپس هنگامی که سلول ها تقریباً ۹۰٪ سطح فلاسک را پوشاندند پاساژ سلولی انجام شد. ابتدا محیط کشت از فلاسک خارج گردید و به آن بافر اضافه شد تا مانع از تکثیر مناسب تریپسین بر سلول‌ها گردد. پس از خارج نمودن بافر و افزودن Trypsin-EDTA (1X)، سلول‌ها انکوبه شدند تا از سطح فلاسک و از یکدیگر جدا شوند. مجدداً ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت به فلاسک اضافه و محتویات به لوله سانتریفوژ منتقل شدند و سانتریفوژ نمودن با دور rpm ۲۰۰۰–۱۵۰۰ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. شمارش سلولی به کمک لام نئوبار و با استفاده از رنگ تریپان بلو انجام شد.

از آنجا که احتمال آلودگی تخریب و از دست دادن سلول‌ها وجود داشت، تعدادی از آنها به‌عنوان ذخیره پس از چند بار پاساژ سلولی فریز گردید.

بررسی تأثیر رقت‌های مختلف عصاره بر تکثیر سلول‌های سرطانی T47D و HT-29

هدف از این بخش مشخص‌کردن مؤثرترین غلظت از عصاره گیاه علف چشمه بر سلول های سرطانی T47D و HT-29 بود. در این خصوص از روش MTT که در مطالعات قبلی بر روی این سلول ها نیز استفاده شده بود استفاده گردید. به این ترتیب که تعداد ۵۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک از ۹۶ Well plate کاشته شد و پس از ۴۸ ساعت، محیط کشت هر سه چاهک (به‌عنوان یک گروه) با محیط کشت‌های مربوطه شامل غلظت‌های مختلف عصاره و همچنین کنترل بدون دارو (RPMI) و دوکسوروبیسین ۵۰۰ nM و ۲۵۰ nM به‌عنوان کنترل مثبت تعویض گردید و به مدت ۱، ۲ و ۳ روز در انکوباتور CO_2 در دمای ۳۷ درجه کشت داده شد. سپس در هر زمان به هر چاهک محلول MTT اضافه شد و دوباره به مدت ۳ ساعت انکوبه شد. پس از این مدت، محلول هر چاهک آسپیره شد و کریستال‌های فورمازان حاصل در DMSO حل گردید و نتیجه توسط plate reader در طول موج ۵۴۰ نانومتر (OD540) در مقابل طول موج رفرانس ۶۹۰ نانومتر تعیین گردید. با توجه به نتایج آزمایش‌های اولیه، آزمایش در محدوده غلظت‌های عصاره ۰/۵ تا ۱/۵ mg/ml انجام شد و سیتوتوکسیسیته عصاره‌ها در سه زمان مختلف شامل ۱ روز، ۲ روز و ۳ روز ارزیابی گردید. پس از تعیین IC50 عصاره تام، سایتوتوکسیسیته فراکسیون‌های دی‌اتیل اتر، کلروفرم و متانول در غلظت IC50 عصاره تام در زمان ۲ روز بررسی گردید.

Archive of SID

نتایج

بازده عصاره و فراکسیون‌ها

بازده عصاره متانولی برگ و گل‌های گیاه علف چشمه و فراکسیون های تهیه شده از آن نسبت به وزن خشک گیاه اولیه محاسبه شد که در جدول ۱ مشاهده می‌شود. وزن فراکسیون ها از ۵ گرم عصاره بدست آمده و بازده نسبت به وزن اولیه عصاره محاسبه شده‌است.

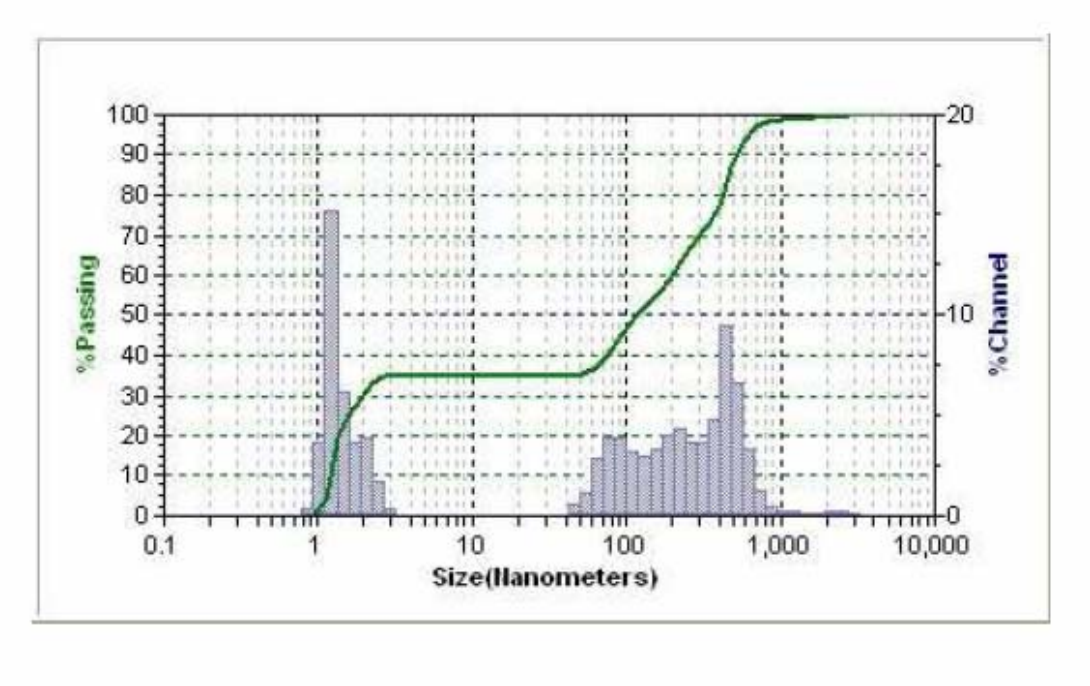
جدول ۱- وزن و بازده عصاره متانولی و فراکسیون‌های عصاره گیاه علف چشمه

ردیف	نوع عصاره	وزن (گرم)	بازده (٪)
۱	عصاره متانولی	۸/۱	۹/٦٤
۲	فراکسیون دی‌اتیل اتری	۱/۱۵	۲۳
۳	فراکسیون کلروفرمی	۲/۲۷	٤٥/٤
٤	فراکسیون متانولی	۱/۵۸	۳۱/٦

توزیع اندازه ذرات نانوکپسول

برای اندازه‌گیری ابعاد نانوکپسول‌های تهیه شده از دستگاه اندازه‌گیری پتانسیل زیتا و اندازه ذرات استفاده شد. این دستگاه از روش تفرق دینامیکی نور استفاده کرده و قادر به اندازه‌گیری سایز ذرات ۱ نانومتر تا ٦/۵ میکرومتر در محلول‌های آبی و آلی می‌باشد.

نمودار نشان داده شده در شکل ۱، ابعاد عصاره علف چشمه نانوکپسوله را نشان می‌دهد.



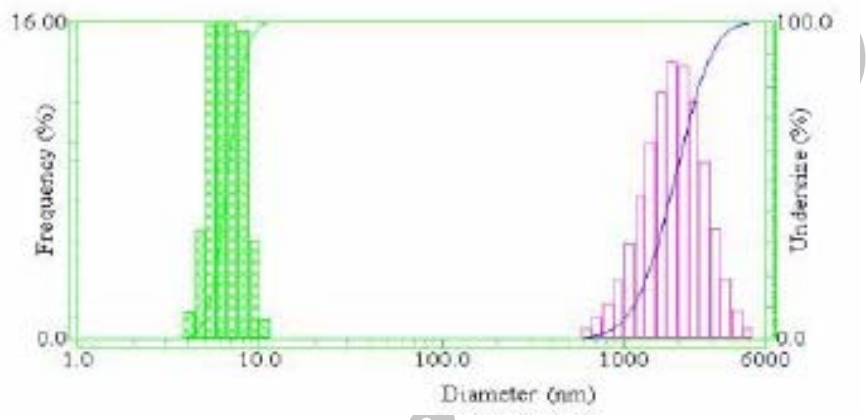
شکل ۱- نمودار حاصل از اندازه‌گیری توزیع اندازه ذرات نانوکپسول حاوی عصاره علف چشمه

Archive of SID

www.SID.ir

همان‌گونه که در شکل ۱ و جدول ۱ دیده می‌شود بیش از ۳۰٪ نانوکپسول‌های تهیه شده در این روش ابعادی بین ۱ تا ۵ نانومتر دارند، ۵۰٪ کل نانوکپسول‌ها ابعادی کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر و ۵۰٪ دیگر ابعادی بین ۵۰ تا ۹۰۰ نانومتر دارند.

برای اندازه‌گیری ضریب توزیع ذرات از دستگاه Dynamic light scattering particle size analyzer Horiba LB-550 استفاده شد. نتایج نشان داد که ذرات تولید شده در دو محدوده ۵ تا ۱۱ نانومتر و ۱۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر (شکل ۲) توزیع شده‌اند. به عبارت دیگر کلیه نانوکپسول‌های تهیه شده ابعادی کوچکتر از ۶۰۰ نانومتر دارند.



شکل ۲- نمودار ضریب توزیع اندازه ذرات نانوکپسول حاوی عصاره علف چشمه

بررسی اثر ضد سرطانی عصاره، فراکسیون‌ها و عصاره نانوکپسوله شده

مقایسه بین عصاره تام و فراکسیون‌های تهیه شده نشان داد که فراکسیون دی‌کلرومتانی بیشترین اثر مهاری را بر رشد سلول‌های T47D و HT-29 داشته‌است (شکلهای ۳ و ٤).

با توجه به نتایج (شکلهای ۳ و ٤ و جدولهای ۲ و ۳) و بررسی تأثیر عصاره تام علف چشمه و فراکسیون‌های بدست آمده بر روی سلول‌های سرطان سینه، مشخص شد که بیشترین اثر در از بین بردن سلول های سرطانی توسط فراکسیون دی‌کلرومتانی مشاهده شد. با وجود کاهش غلظت این فراکسیون به ۱۵ و ۲۵ نانومولار باز هم اثر آن در از بین بردن سلول های سرطانی سینه بیشترین می‌باشد. به‌طوری که درصد سلول‌های زنده در فراکسیون دی‌کلرومتانی با غلظت ۲۵ نانومولار در روز اول برابر ٤۳/۹٪ و در روز دوم برابر ۱۵/۲٪ و در روز سوم برابر ۵/۲٪ می‌باشد. همچنین در مورد سلول‌های سرطانی کلون نیز تأثیر این فراکسیون در غلظت ۱۵ نانومولار در روز اول برابر ٦۰٪ و در روز دوم برابر ۳۷/۱٪ و در روز سوم برابر ۲۰/٦٪ می‌باشد که بیشترین اثر را در از بین بردن سلول‌های سرطانی داشته است. به‌طوری که اثر فراکسیون دی‌کلرومتانی در پایین‌ترین غلظت تهیه شده (۱۵ نانومولار) نیز از اثر بالاترین غلظت عصاره تام (۲۰۰ نانومولار) بر روی هر دو نوع سلول سرطانی سینه و کولون بیشتر بوده‌است.

مقایسه بین تأثیر عصاره تام و نانوکپسول‌های تهیه شده از آن نیز نشان داد که در کلیه موارد نانوکپسول‌ها در مقایسه با عصاره تام اثر مهارکنندگی قویتری داشتند. مقایسه اثر

Archive
www.SID.ir

نانوکپسول تهیه شده از عصاره علف چشمه بر سلول‌های سرطانی سینه و عصاره تام در رقت ۱۵۰ نانومولار نشان داد، در حالی‌که عصاره تام پس از ۳ روز ۶۶/۷٪ سلول‌ها را از بین برده‌است، عصاره نانوکپسوله شده در این رقت، پس از ۳ روز ۹۴٪ سلول‌های سرطانی را نابود کرده‌است. عصاره نانوکپسولی در غلظت ۱۰۰ نانومولار نیز پس از ۳ روز بیش از ۸۰٪ سلول های سرطانی سینه را نابود کرده که اثر قویتری را نسبت به عصاره تام با غلظت ۲ برابر نشان می‌دهد.

براساس این نتایج نانوکپسول اثر بخشی قویتری را نسبت به عصاره معمولی بر روی سرطان سینه نشان داده‌است.

درصد سلول‌های زنده در اثر عصاره نانو کپسولی علف چشمه بر سلول‌های سرطانی کلون در دو غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ نانومولار در روز اول به‌ترتیب برابر ۸۷ و ۷۲/۴ درصد و در روز دوم ۴۳/۴ و ۴۴ درصد و در روز سوم به‌ترتیب برابر ۳۵/۸ و ۲۷/۴ درصد بدست آمد.

درصد سلول‌های زنده در اثر عصاره تام بر سلول‌های سرطانی کلون در دو غلظت ۱۵۰ و ۲۰۰ نانومولار در روز اول به‌ترتیب برابر ۹۳/۱ و ۸۴/۵ درصد و در روز دوم ۵۱/۷ ۴۹/۵ درصد و در روز سوم به‌ترتیب برابر ۴۳/۸ و ۳۹/۹ درصد بدست آمد.

مقایسه این مقادیر نشان می‌دهد در حالیکه عصاره نانویی در غلظت ۱۵۰ نانومولار پس از ۳ روز بیش از ۷۲٪ سلول‌های سرطانی را نابود کرده‌است، عصاره تام در همین غلظت و همین مدت زمان حدود ۶۰٪ سلول‌های سرطانی کلون را از بین برده‌است. اثر مهارکنندگی عصاره نانویی بر سلول‌های سرطانی کولون از اثر عصاره تام با غلظت ۲ برابر نیز بیشتر بوده‌است.

براساس این نتایج نانوکپسول اثر بخشی قویتری را نسبت به عصاره معمولی بر روی سرطان کولون نشان داده‌است.

تأثیر فراکسیون دی‌اتیل اتری بر سلول‌های سرطانی سینه در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ نانو مولار نشان داد که در روز اول به‌ترتیب ۷۲/۴ و ۷۰/۵ درصد، در روز دوم ۶۹/۵ و ۵۹ درصد و در روز سوم به‌ترتیب برابر ۵۱/۴ و ۴۷/۶ درصد سلول‌های سرطانی زنده باقی مانده‌اند. بنابراین اثر ضدسرطانی این فراکسیون از عصاره تام کمتر بوده‌است.

تأثیر فراکسیون دی‌اتیل اتری بر سلول‌های سرطانی کلون در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار نشان داد که در روز اول به‌ترتیب برابر ۶۲/۱ و ۵۲/۳ درصد، در روز دوم ۵۸/۶ و ۴۷/۸ درصد و در روز سوم به‌ترتیب برابر ۵۵/۸ و ۴۰/۶ درصد سلول‌های سرطانی زنده باقی مانده‌اند. بنابراین اثر ضدسرطانی این فراکسیون از عصاره تام کمتر بوده‌است.

تأثیر فراکسیون متانولی بر سلول‌های سرطانی سینه در دو غلظت ۱۵۰ و ۲۰۰ نانومولار نشان داد که در روز اول به‌ترتیب برابر ۹۳/۲ و ۷۰/۵ درصد، در روز دوم ۴۹/۷ و ۴۰/۳ درصد و در روز سوم به‌ترتیب برابر ۴۰/۹ و۲۴ درصد سلول‌های سرطانی زنده مانده‌اند. بنابراین استفاده از غلظت ۲۰۰ نانومولار این فراکسیون پس از۳ روز بیش از ۷۵٪ سلول‌های سرطانی سینه را نابود می‌کند، گرچه مناسبتر از فراکسیون دی‌اتیل اتری است، اما در مقایسه با فراکسیون کلروفرمی و عصاره تام کمتر است.

تأثیر فراکسیون متانولی بر سلول‌های سرطانی کلون در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ نانو مولار نشان داد که در روز اول به‌ترتیب برابر ۱۰۰ و ۹۴/۷ درصد، در روز دوم ۷۵/۲ و ۶۳/۵ درصد و در روز سوم به ترتیب برابر ۵۸ و ۵۲/۸ درصد سلول‌ها زنده باقی مانده‌اند. بنابراین فراکسیون متانولی عصاره علف چشمه اثر ضعیف‌تری بر روی سلول‌های سرطانی کولون نسبت به سرطان سینه دارد. مقایسه این فراکسیون با عصاره تام و سایر فراکسیون ها نشان می‌دهد که فراکسیون

Archive of SID

www.SID.ir

متانولی ضعیف‌ترین اثر مهارکنندگی را بـر روی سـلول‌هـای سرطان کولون دارد.

نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که برای هر دو نوع سلول سرطانی، اثر نانوکپسول قویتر از عصاره معمولی است.

با توجه به این‌که فراکسیون کلروفرمی اثر بیشتری نسبت به عصاره تام دارد، اما تهیه نانوکپسول از این فراکسیون می‌تواند اثر آن را شدت بیشتری ببخشد.

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف عصاره، فراکسیون‌ها و عصاره نانوکپسوله شده علف چشمه بر سلول‌های سرطانی T47D در زمان‌های یک، دو و سه روز

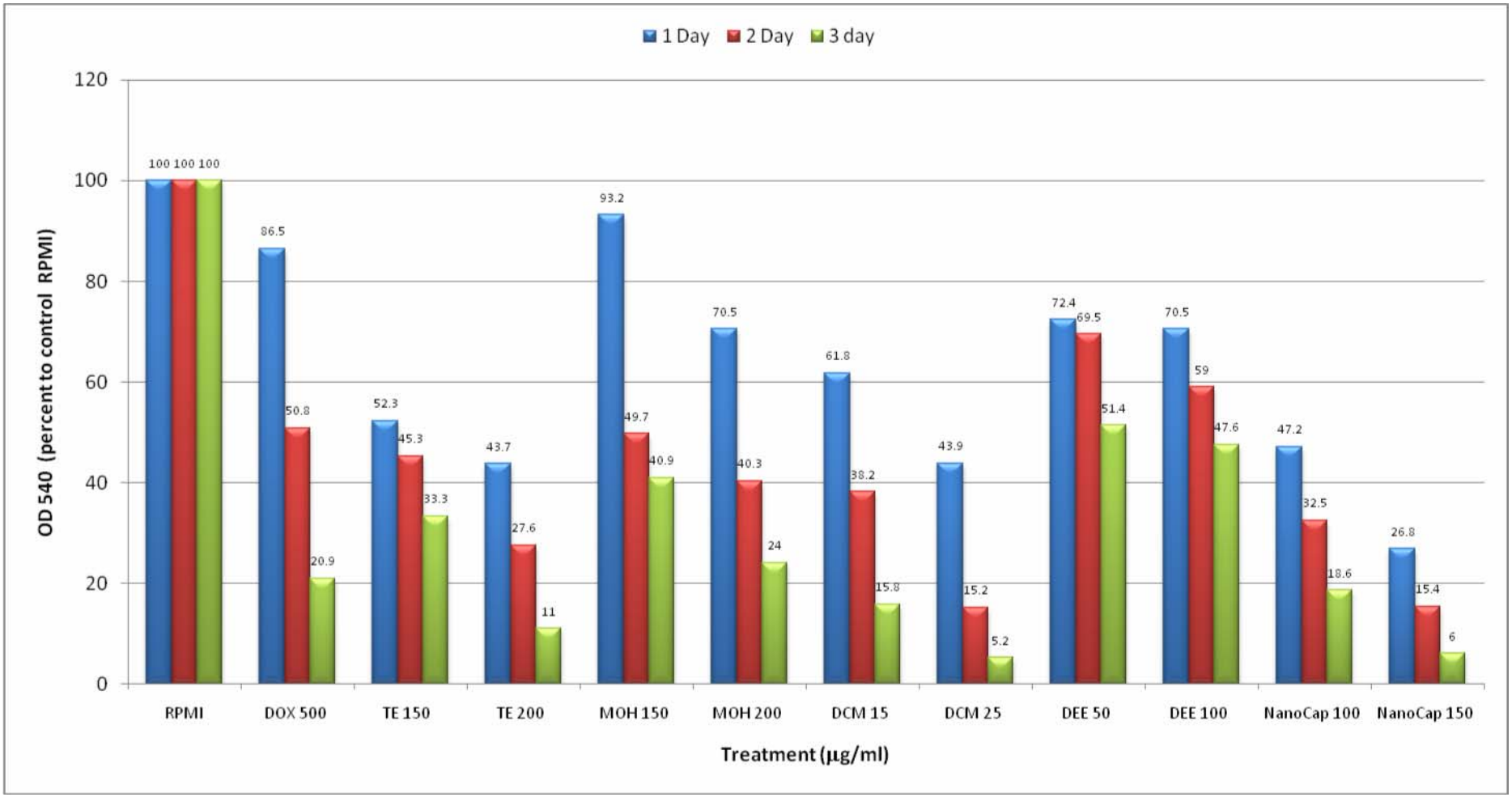
متغیرها	درصد سلول‌های زنده		
	روز اول	روز دوم	روز سوم
RPMI	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
DOX (500 nM)	۸٦/٥	٥۰/۸	۲۰/۹
Total Extract 150 nM	٥۲/۳	٤٥/۳	۳۳/۳
Total extract 200 nM	٤۳/۷	۲۷/۷	۱۱
Methanol 150 nM	۹۳/۲	٤۹/۷	٤۰/۹
Methanol 200 nM	۷۰/٥	٤۰/۳	۲٤
Dichloromethane 15 nM	٦۱/۸	۳۸/۲	۱٥/۸
Dichloromethane 25 nM	٤۳/۹	۱٥/۲	٥/۲
Diethyl ether 50 nM	۷۲/٤	٦۹/٥	٥۱/٤
Diethyl ether 100 nM	۷۰/٥	٥۹	٤۷/٦
Nanocapsule 100 nM	٤۷/۲	۳۲/٥	۱۸/٦
Nanocapsule 150 nM	۲٦/۸	۱٥/٤	٦

جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف عصاره، فراکسیون‌ها و عصاره نانوکپسوله شده علف چشمه بر سلول‌های سرطانی HT-29 در زمان‌های یک، دو و سه روز

متغیرها	درصد سلول‌های زنده		
	روز اول	روز دوم	روز سوم
RPMI	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
DOX (500 nM)	۹۹/۷	۸٦	٤۹/٤
Total Extract 150 nM	۹۳/۱	٥۱/۷	٤۳/۸
Total extract 200 nM	۸٤/٥	٤۹/٥	۳۹/۹
Methanol 150 nM	۱۰۰	۷٥/۲	٥۸
Methanol 200 nM	۹٤/۷	٦۳/٥	٥۲/۸
Dichloromethane 15 nM	٦۳/۱	٤۷/۸	۲۹/۲
Dichloromethane 25 nM	٦۰	۳۷/۱	۲۰/٦
Diethyl ether 50 nM	٦۲/۱	٥۸/٦	٥٥/۸
Diethyl ether 100 nM	٥۲/۳	٤۷/۸	٤۰/٦
Nanocapsule 100 nM	۸۷	٤۳/٤	۳٥/۸
Nanocapsule 150 nM	۷۲/٤	٤٤	۲۷/٤

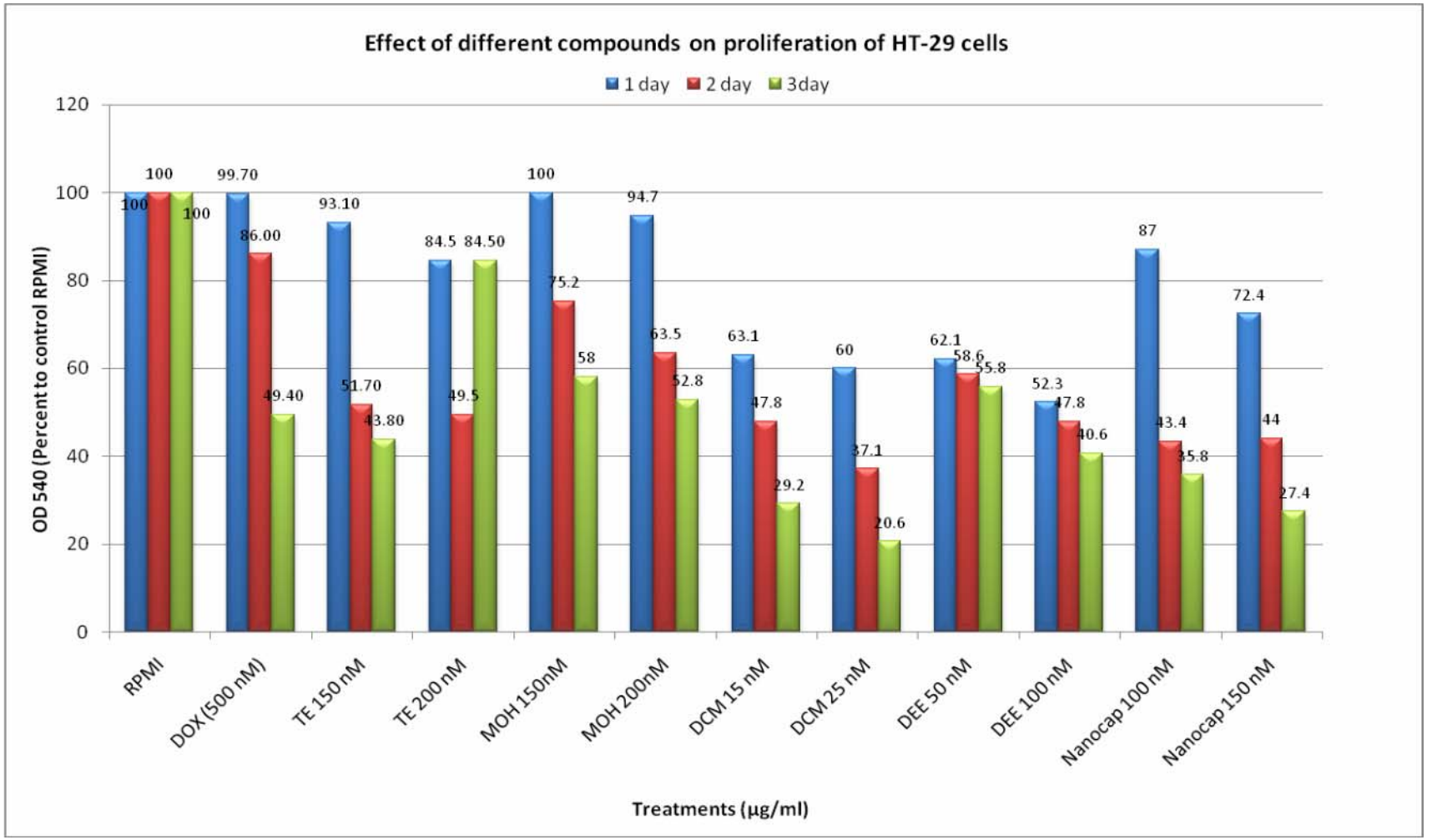
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف عصاره، فراکسیون‌ها و عصاره نانوکپسوله شده علف چشمه بر سلول‌های سرطانی T47D در زمان‌های یک، دو و سه روز

www.SID.ir



شکل ٤- اثر غلظت‌های مختلف عصاره، فراکسیون‌ها و و عصاره نانوکپسوله شده علف چشمه بر سلول‌های سرطانی HT-29 در زمان‌های یک، دو و سه روز

www.SID.ir

بحث

عوامل متعددی در نحوه تهیه نانوکپسول و اندازه ذرات آن نقش دارند که می‌باید در نظر گرفته شوند. نتایج حاصل از تحقیقات قبلی نشان داده که افزایش دور همزن و ایجاد توربولانس بیشتر در امولسیون نه تنها باعث ایجاد ذرات ریزتر نمی‌شود، بلکه از تشکیل ذرات جلوگیری کرده و پس از اتمام واکنش شبکه‌ای شدن، باعث تشکیل توده می‌شود. در هنگام استفاده از دستگاه هموژنایزر، شکل یا نوع تیغه همزن در اندازه ذرات، و توزیع پراکندگی نانو کپسول تأثیر دارد. نوع تکنیک خشک کردن نیز اثر قابل‌توجهی بر مورفولوژی ذرات دارد، به‌طوری که استفاده از تکنیک فریزدرایر جهت خشک کردن ذرات باعث متخلخل شدن ذرات شده و یا ذراتی با ساختار بسیار پوک بدست می‌آید، در حالی‌که در روش اسپری درایر ذرات توپر ولی کاملاً تفکیک شده خواهیم داشت. مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق با تحقیقات گذشته بیانگر شباهت‌ها و تفاوت‌هایی در یافته‌هاست.

Owlia و همکاران (۲۰۰۷) میکروسفرهای سفتریکسون را که یک ترکیب دارویی خالص می‌باشد بر پایه نشاسته به روش امولسیون معکوس تهیه کرده و اثر آن را بر میکروب‌های سالمونلا مورد ارزیابی قرار دادند. در این تحقیق سایز ذرات و مشخصات مورفولوژی میکروسفرهای تهیه شده مورد مطالعه قرار گرفت که میکروسفرهای کروی شکل بدست آمده دارای اندازه ذرات بین µm ٤-١ بودند.

در یک تحقیق مشترک بین ایران و هلند تهیه نانو انسولین مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این تحقیق، دارورسانی موفق، حفاظت داروها از اسید معده و آنزیم‌های روده و جذب مناسب دارو از جداره سلولی روده بیان شد و از روش Polyelectrolyte Complexation استفاده گردید. در این تحقیق از دو نوع پلیمر کیتوسان به نام‌های N-trimethel chitosan (TMC) و N-diethylmethyl chitosan (DEMC) استفاده گردید. اندازه نانو ذرات تهیه شده nm ۲۰ ± ۲۰۰ بدست آمد (Sadeghi *et al*., 2008).

در تحقیق دیگری تأثیر مدت زمان بارگذاری، متوسط حلالیت، دمای بارگذاری و غلظت دارو در رهایش دارو مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور تهیه میکروکپسول از روش امولسیون فاز آبی و فاز روغنی بر پایه نشاسته استفاده شده، توزیع اندازه ذرات بین ۱/۲۵۲ تا ۱۹/۰٤٦ میکرومتر بدست آمد (Fang *et al*., 2008).

همچنین از نانوسفرها برای درمان سرطان در دمای بالا استفاده شده، میکروسفرهای پارامغناطیسی Fe3O4 تهیه شده دارای اندازه ذرات بین µm ۳۰-۲۰ بودند که افزایش حرارت به ٦۰۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط خاص اندازه ذرات را به µm ۱ کاهش داد. همچنین در شرایط دمایی ٤۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت و شرایط ویژه، کریستال‌های Fe3O4 در اندازه ۵۰nm نیز گزارش شده‌است (Kawashita *et al*., 2005).

در بررسی آزمایشگاهی که در هلند بر روی تهیه میکروسفرها بر پایه پلیمر روی ترکیب Lysozyme انجام شد، مشخص شد که غلظت‌های مختلف استفاده شده از پلیمرهای در اندازه ذرات میکروسفر تأثیر زیادی دارد، به این صورت که در اثر افزایش غلظت مورد استفاده از پلیمر باعث افزایش سایز ذرات میکروسفر شده‌است (Bezemer *et al*., 2000).

در بررسی مقایسه‌ای تأثیر اندازه ذرات در درمان بیماریهایی مانند سرطان، دیابت، مشکلات قلبی- عروقی

Archive of SID
www.SID.ir

و جراحات مغزی- نخاعی مشاهده شد که تأثیر اندازه ذرات حتی از افزایش غلظت دارو در درمان بیماریها به‌دلیل جذب بیشتر ذرات نانو به‌وسیله سلول‌ها نسبت به ذرات میکرو بسیار بیشتر است. در این مطالعه از ذرات PLGA با اندازه ذرات مختلف (۲۵ µm، ۶ µm و ۲۴۰ nm) به‌عنوان آزادکننده هورمون رشد استفاده شد. نتایج مشخص کرد که ذرات میکرو جذب سطحی شده، فاکتورهای خود را به خارج از سلول آزاد می‌کنند، در حالی که نانو ذرات فاکتورهای خود را به داخل سلول آزاد می‌کنند (Kawashita *et al*., 2004).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که روش استفاده شده برای تهیه نانوکپسول منجر به اندازه کوچکتر ذرات در مقایسه با تحقیقات قبلی (Owlia *et al*., 2007؛ Fang *et al*., 2008؛ Sadeghi *et al*., 2008) شده که می‌تواند ناشی از نوع پلیمر انتخابی و تکنیک کپسوله کردن باشد. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره علف چشمه خواص ضدسرطانی دارد که می‌توان با استفاده از تکنیک نانوکپسوله کردن کارایی آن را بهبود بخشید. این نتایج می‌تواند مبنای تحقیقات بیشتر و فرمولاسیون داروهایی از این گیاه قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

- حنفی، س.، ۱۳۸۵. بررسی اثر کتوتیفن در کاهش مقاومت دارویی سلول‌های سرطانی پستان T47D مقاوم به تاموکسیفن (T47D/TAMR-6). پایان‌نامه دکتری داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.
- Abdolmohammadi, M.H., Fouladdel, Sh., Shafiee, A., Amin, Gh., Ghaffari, S.M. and Azizi, E., 2006. Anticancer effects and cell cycle analysis on human breast cancer T47D cells treated with extracts of *Astrodaucus Persicus* (Boiss.) Drude in comparison to doxorubicin. Daru Journal of Pharmaceutical Sciences, 16(2): 112-118.
- Ansel, H.C., Allen, J.L.V. and Popovich, N.G., 1999. Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. Lippin Cott Williams & Wilkins, Philadelphia, 608p.
- Bezemer, J.M., Radersma, R., Grijpma, D.W., Dijkstra, P.J., van Blitterswijk, C.A. and Feijen, J., 2000. Microspheres for protein delivery prepared from amphiphilic multiblock copolymers: 2. Modulation of release rate. Journal of Controlled Release, 67(2-3): 249-260.
- Cecil, R.L., Lee Goldman, M.D. and Benett, J.C., 2000. Cecil Textbook of Medicine. Philadelphia: W.B. Saunders, 1673p.
- Derick, R.S. and Hodge, M., 2005. Stabilization of water-in-oil emulsions with continuous phase crystals. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 260: 229-237.
- Dziezak, D., 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. Food Technology, 42(4): 136-148.
- Fang, Y.Y., Wang, L.J., Li, D., Li, B.Z., Bhandari, B., Chen, X.D. and Mao, Z.H., 2008. Preparation of crosslinked starch microspheres and their drug loading and releasing properties. Carbohydrate Polymers, 74(3): 379-384.
- Garti, N. and Aserin, A., 1996a. Double emulsions stabilized by macromolecular surfactants. Advances in Colloid and Interface Science, 66: 37-69.
- Garti, N. and Aserin, A., 1996b. Pharmaceutical emulsions, double emulsions and microemulsions: 411-534. In: Benita, S., (Ed.). Microencapsulation: Methods and Industrial Application. Marcel Dekker, New York, 664p.
- Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G. and Rakesh, D.D., 2008. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. JCS Unido, Italy, 266p.
- Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D. and Perucho, M., 1993. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature, 363 (6429): 558-561.
- Katzung, B.G., 2001. Basis and Clinical Pharmacology. Appleton and Lange, 1217p.
- Kawashita, M., Tanaka, M., Kokubo, T., Inoue, Y., Yao, T., Hamada, S. and Shinjo, T., 2005. Preparation of ferromagnetic magnetite microspheres for in situ hyperthermic treatment of cancer. Biomaterials, 26(15): 2231-2238.
- Matsumoto, S., 1987. w/o/w-type multiple emulsions: 549-600. In: Schick, M.J., (Ed.). Nonionic Surfactants. Marcel Dekker, New York, 1187p.
- Matysik, G., Wójciak-Kosior, M. and Paduch, R., 2005. The influence of *Calendulae officinalis* flos extracts on cell cultures, and the chromatographic analysis of extracts. Journal of Phamaceutical and Biomedical Analysis, 38(12): 285-292.

Archive of SID

www.SID.ir

- Mendelsohn, J., Howley, P.M., Israel, M.A., Gray, J.W., Liotta, L.A. and Thompson, C.B., 2001. The Molecular Basis of Cancer. Saunders Company. U.S.A., 752p.
- Owlia, P., Sadeghzadeh, L., Orang, F., Rafienia, M. and Bonakdar, S., 2007. Evaluation of ceftriaxone releasing from microspheres based on starch against *Salmonella* spp. Biotechnology, 6(4): 597-600.
- Perry, M.C., 1996. The Chemotherapy Source Book. Williams and Wilkins, U.S.A., 1518p.
- Rafienia, M., Orang, F. and Emamy, S.H., 2006. Preparation and characterization of polyurethane microspheres containing theophylline. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 21(4): 341-349.
- Sadeghi, A.M., Dorkoosh, F.A., Avadi, M.R., Saadat, P., Rafiee-Tehrani, M. and Junginger, H.E., 2008. Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods. International Journal of Pharmaceutics, 355: 299-306.
- Sela, Y., Magdassi, S. and Garti, N., 1995. Release of markers from the inner water phase of W/O/W emulsions stabilized by silicone based polymeric surfactants. Journal of Controlled Release, 33: 1-12.
- Su, L., Ji, W.K., Lan, W.Z. and Dong, X.Q., 2003. Chemical modification of xanthan gum to increase dissolution rate. Carbohydrate Polymers, 53(4): 497-499.
- Yang, Y.Y., Chia, H.H. and Chung, T.S., 2000. Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. Journal of Controlled Release, 69: 81-96.
- Yang, Y.Y., Chung, T.S. and Ng, N.P., 2001. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. Biomaterials, 22(3): 231-241.
- Zhang, X.X., Fan, Y.F., Tao, X.M. and Yick, K.L., 2004. Fabrication and properties of microcapsules and nanocapsules containing n-octadecane. Materials Chemistry and Physics, 88(2-3): 300-307.

Archive of SID

www.SID.ir

Comparison of anticancer effects of nanocapsules of *Nasturtium officinalis* (L.) R. Br. extract with methanolic extract and its fractions

F. Sefidkon[1*], B. Torabi Sagvand[2], M. Naderi[3] and S.A. Ghooshegir[4]

1*- Corresponding author, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran, E-mail: Sefidkon@rifr-ac.ir
2- Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran
3- Medicinal Plants Research Division, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran
4- Research Institute for Islamic and Complementary Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: October 2012 Revised: November 2012 Accepted: November 2012

Abstract

Nasturtium officinalis (L.) R. Br. is a prennial and aquatic plant which grows in water flows of most regions of Iran. There are flavonoids in the leaves and flowers of *N. officinalis* with anticancer properties. In this research, to investigate anticancer effects, leaves and flowers of *N. officinalis* were used by maceration in methanol for preparation of extract and its fractions. Also, the extract was converted to nanocapsules. The fractions of dichloromethane, diethylether and methanol were prepared from the first extract. Nanocapsules were prepared by double emulsion method using poly-lactic-glycolic acid. Nanocapsules were dried and their dimensions and distribution coefficient were determined. To evaluate the inhibitory effects on the proliferation of breast cancer cells (T47D) and colon cancer cells (HT-29), effects of the first extract, fractions and nanocapsules were compared with Doxorubicin (500 nM) and RPMI as control treatment. Measuring the the average size of nanocapsules showed that the dimentions of 50% of nanocapsules were less than 10 nm and the other were between 50-900 nm. Results of anticancer properties of the extract and fractions of *N. officinalis* on both breast and colon cancer cells, for 1 to 3 days, showed that dichloromethane fraction had a stronger effect on inhibition of proliferation of cancer cells compared to the first extract and other fractions. In addition, nanocapsules in the same concentration and period of time killed more cells in comparison to the first extract. Meanwhile, the anticancer effect of *N. officinalis* extract on breast cancer cells was stronger than that on colon cancer cells. Consequently, the possibility of making medicines from this plant extract especially in nanocapsule form could be considered.

Key words: *Nasturtium officinalis* (L.) R. Br., extract, nanocapsule, colon cancer, breast cancer.

Archive of SID

www.SID.ir