



Evaluation of the Toxicity and Anti-Angiogenic Effects of Beta-Cyclodextrin Complex Loaded with Thymol in Melanoma Skin Cancer Cells (A2058)

Mohadese Feyzmohamadi Khoramabadi ¹, Ali Neamati ^{1*}, Masoud Homayouni Tabrizi ¹

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

*Corresponding author: Ali Neamati, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
Email: neamati.ali@gmail.com

Received: 2 September 2023 Revised: 24 July 2024 Accepted: 24 July 2024

Abstract

Background and Aim: In drug delivery, the formation of cyclodextrin complexes is a widely used strategy to overcome biopharmaceutical challenges associated with various active pharmaceutical ingredients, such as poor water solubility, initial instability, and low bioavailability. Given the anti-cancer properties of thymol, this study aimed to evaluate the effects of thymol-loaded nanoparticles in a beta-cyclodextrin complex and to assess their anti-cancer effects in melanoma skin cancer cells (A2058) by examining the expression of the VEGF and VEGFR genes.

Methods: The synthesized nanoparticles were characterized using various methods, including zeta potential analysis, ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), and scanning electron microscopy (SEM). To determine the cytotoxicity of the synthesized nanocomplex, the MTT assay was performed with β -CD-Thymol nanoparticle concentrations ranging from 62.5 to 500 μ g/ml. The Chorioallantoic Membrane (CAM) assay was conducted to evaluate the cytotoxicity of the synthesized β -CD-Thymol nanoparticles in the context of angiogenesis. Finally, the expression levels of genes involved in angiogenesis (VEGF and VEGFR) were analyzed using real-time PCR.

Results: Dynamic light scattering analysis revealed that the mean size of the nanoparticles was 116.20 nm, with a zeta potential of -21.64 mV. FTIR studies indicated the presence of several biologically active functional groups in the synthesized nanoparticles. Additionally, the anti-cancer effects and inhibitory role of the β -CD-Thymol complex were confirmed by a significant reduction in the expression of angiogenesis-related genes (VEGF and VEGFR) in A2058 cells treated with the β -CD-Thymol nanoparticle complex ($P < 0.001$). The results from the CAM assay further supported these findings.

Conclusion: The findings of this study demonstrated a significant decrease in the expression of genes involved in angiogenesis, specifically VEGF and VEGFR, indicating that the β -CD-Thymol complex effectively inhibits angiogenesis in the A2058 skin cancer cell line. Overall, in addition to inhibiting the formation of new blood vessels, the β -CD-Thymol nanostructure shows promise as an anti-angiogenic agent by modulating the expression of VEGF and VEGFR genes.

Keywords: Thymol, Beta-Cyclodextrin, Melanoma, VEGF, VEGFR



ارزیابی اثرات سمیت و ضد رگ‌زایی کمپلکس بتاسیکلودکسترین بارگذاری شده با تیمول در سلول‌های سرطان پوست ملانوما (A2058)

محدثه فیض محمدی خرم آبادی^۱، علی نعمتی^{۱*}، مسعود همایونی تبریزی^۱

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

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۶/۱۱ اصلاح مقاله: ۱۴۰۳/۰۵/۳ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۰۵/۳

چکیده

زمینه و هدف: در دارو رسانی، یکی از راه‌های پرکاربرد برای غلبه بر مشکلات بیودارویی موجود در چندین ماده دارویی فعال، مانند حلالیت ضعیف در آب، ناپایداری اولیه و فراهمی زیستی کم، تشکیل ترکیبات حاوی سیکلودکسترین‌ها است. با توجه به اثرات ضد سرطانی تیمول، این مطالعه با هدف تعیین تاثیر نانوذرات بارگذاری شده با تیمول در کمپلکس بتاسیکلودکسترین و تعیین اثرات ضد سرطانی آن در سلول‌های سرطان پوست ملانوما (A2058) از طریق بررسی بیان ژن‌های VEGF و VEGFR انجام شد.

روش‌ها: نانوذرات سنتز شده به روش‌های مختلفی مانند پتانسیل زتا، طیف مرئی ماوراء بنفش (UV-Vis)، طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR)، پراش اشعه ایکس (XRD) و تجزیه و تحلیل میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مشخصه‌یابی شدند. برای تعیین سمیت سلولی نانوکمپلکس سنتز شده، تست MTT با میزان غلظت نانوذرات β -CD-Thymol بین ۵۰۰-۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر انجام گرفت. تست CAM (Chorioallantoic Membrane) برای تعیین سمیت سلولی نانوذرات β -CD-Thymol سنتز شده در روند رگ‌زایی انجام شد. در نهایت میزان بیان ژن‌های دخیل در آنژیوژنز (VEGF و VEGFR) با استفاده از Real-time PCR بررسی گردید.

یافته‌ها: میانگین اندازه نانوذرات با استفاده از پراکندگی نور پویا nm ۱۱۶/۲۰ تعیین شد و پتانسیل زتا بدست آمده نانوذرات mV -۲۱/۶۴ ثبت شد. مطالعات FTIR نشان داد که چندین گروه عاملی فعال بیولوژیکی در نانوذرات سنتز شده وجود دارد. علاوه بر این، اثر ضد سرطانی و نقش مهاري β CD-thymol با کاهش بیان ژنهای دخیل در رگ‌زایی (VEGF و VEGFR) در سلول‌های A2058 تیمار شده با کمپلکس نانوذرات β CD-thymol تایید شد ($P < 0.001$) و نتایج حاصل از تست CAM نیز آن را تأیید نمود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار بیان ژنهای دخیل در رگ‌زایی از جمله ژن‌های VEGF و VEGFR بود و کمپلکس β -CD-thymol رگ‌زایی را در رده سلولی سرطان پوست A2058 مهار نمود. به طور کلی نانساختار β -CD-thymol علاوه بر مهار تشکیل رگ‌های خونی جدید، یک عامل ضد رگ‌زایی امیدوارکننده از طریق کنترل بیان ژن VEGF و VEGFR می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: تیمول، بتاسیکلودکسترین، ملانوما، VEGF، VEGFR

*نویسنده مسئول: علی نعمتی. پست الکترونیک: neamati.ali@gmail.com

آدرس: گروه زیست‌شناسی، د واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

ملانوما یکی از تهاجمی‌ترین انواع سرطان پوست است که به دلیل مقاومت چند دارویی و در نتیجه درصد بقای پایین برای بیماران، امکانات کمی برای رویکردهای درمانی دارد. بروز ملانوما در ۵۰ سال گذشته در حال افزایش بوده و هر سال به بیش از ۱۶۰ هزار مورد جدید در سراسر جهان رسیده است [۱،۲]. نانوتکنولوژی در اکثر درمان‌های مرسوم برای ملانوما به کار رفته است و نتایج مطالعات نشان داده که تحویل نانوداروها برای شیمی-درمانی، درمان هدفمند، ایمونوتراپی و درمان فتودینامیک تا حد زیادی اثربخشی درمان را افزایش می‌دهد. مقابله با سرطان در شرایط فعلی به شدت به شیمی‌درمانی بستگی دارد. از این رو، چندین سیستم دارورسانی جدید با ترکیب علم مواد، داروسازی و بیوتکنولوژی برای حمل عوامل ضد سرطانی مختلف توسعه یافتند [۱،۲].

آنژیوژنز را می‌توان به عنوان تشکیل رگ‌های خونی جدید تعریف کرد که در فرآیندهای فیزیولوژیکی نقش دارد. از سوی دیگر، از مواد شیمیایی ضد رگ‌زایی برای ایجاد هیپوکسی در درمان سرطان استفاده می‌شود. از طریق توسعه شریان‌های خونی جانی، بسیاری از عوامل رشد (مانند VEGF-A) جریان خون را در بافت‌های ایسکمیک بهبود می‌بخشد [۳]. در میان تمام روش‌هایی که منجر به تشکیل ملانوما می‌شود، رگ‌زایی نقش مهمی در پیشرفت و پیامدهای سرطان دارد. بنابراین، راهبردهای ضد رگ‌زایی مختلفی تاکنون برای افزایش اثربخشی درمان در انواع مختلف سرطان ایجاد شده است [۴].

تعامل پیچیده بین VEGF یا انواع آن با گیرنده‌های VEGF می‌تواند رگ‌زایی را تقویت کند و لذا رویکردهای دقیق‌تری برای برهم زدن این فعل و انفعالات به شیوه‌ای که مختص تومور است مورد نیاز است. یک رویکرد قابل قبول، هدف قرار دادن تنظیم‌کننده‌های مرتبط با پیوند VEGF و همچنین محصولات اتصال VEGF است که باعث افزایش فعال شدن گیرنده و گسترش عروق توموری می‌شود [۵]. درمان‌های هدفمند مرتبط با رگ‌زایی در ابتدا با این تصور توسعه یافتند که ترکیبات آنتی آنژیوژنیک رشد رگ‌های خونی جدید را مهار می‌کنند و در نتیجه تومورها با مهار رسیدن اکسیژن و مواد مغذی لازم، از بین می‌روند. به طور فزاینده‌ای مشخص شده که مزایای درمانی مرتبط با هدف *VEGF* پیچیده‌تر از این است و مکانیسم‌های متعددی را در بر می‌گیرد [۶].

سیکلودکسترین‌ها الیگومرهای کربوهیدرات محلول در آب هستند که از ۶ تا ۸ واحد گلوکز در یک ساختار حلقه تشکیل شده‌اند و برای اهداف متعدد در نانوتراپی سرطان مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۷]. تیمول یک ترکیب فنول طبیعی به فرمول شیمیایی $C_{10}H_{14}O$ است که از نظر شیمیایی به عنوان ۲-ایزوپروپیل-۵-متیل فنل شناخته می‌شود [۸]. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثرات سمیت و ضد رگ‌زایی کمپلکس بتاسیکلودکسترین بارگذاری شده

روش‌ها

سنتر نانوذرات بتاسیکلودکسترین بارگذاری شده با تیمول

در مطالعه تجربی حاضر، ۵۰۰ میکروگرم بتاسیکلودکسترین به مدت ۱ ساعت روی استیرر در دمای اتاق قرار داده شد تا به طور کامل حل شود. در مرحله بعد تیمول به بتاسیکلودکسترین اضافه و سونیکاسیون انجام شد. این محلول به مدت ۱ ساعت هموژنیزه شد و در دستگاه روتاری خشک گردید تا به صورت پودر درآید. سپس اندازه نانوذرات با دستگاه پارتیکل سایز سنجیده شد. در نهایت شکل و مورفولوژی توسط میکروسکوپ الکترونی بررسی گردید.

طیف سنجی مادون قرمز FTIR

به منظور بررسی گروه‌های عاملی و برهمکنش شیمیایی میان ذرات نانو از طیف FTIR استفاده شد. طیف سنجی مادون قرمز بر اساس جذب تابش و بررسی جهش‌های ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چند اتمی صورت می‌گیرد. هنگامی که مولکول‌ها اشعه مادون قرمز را جذب می‌کنند، به حالت انرژی بالاتر برانگیخته می‌شوند. جذب تابش مادون قرمز همانند دیگر فرایندهای جذب، فرایندی کوآنتایی است. به این صورت که فقط فرکانس‌های خاصی از تابش مادون قرمز توسط مولکول جذب و باعث ارتعاش کششی و خمشی پیوندهای کوالانسی می‌شود. انرژی جذب شده از نور مادون قرمز توسط پیوندهای شیمیایی یا گروه‌های عاملی خاص در طول موج مشخص، منجر به کاهش شدت عبور نور شده و معمولاً به عنوان تابعی از عدد موجی (برحسب Cm^{-1}) رسم می‌شود. توجه به این نکته مهم است که تمام پیوندهای مولکول قادر به جذب انرژی مادون قرمز نیستند، حتی اگر فرکانس اشعه با فرکانس حرکت تطبیق کند، فقط پیوندهایی که دارای گشتاور دو قطبی هستند قادر به جذب اشعه مادون قرمز می‌باشند. اگر تمام جذبها در طیف دو نمونه بر یکدیگر منطبق شوند، به احتمال قریب به یقین، دو ماده یکسان هستند.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM، یکی از ابزارهای مورد استفاده در فناوری نانو است که با کمک بمباران الکترونی تصاویر اجسامی به کوچکی 10 nm را برای مطالعه تهیه می‌کند. در این پژوهش، جهت تصویربرداری از نانوذرات $\beta\text{-CD}$ -Thymol مقدار $25\mu\text{l}$ از نمونه بر روی لام ریخته و محلول در مجاورت هوا خشک شد. نمونه‌ها چند ثانیه با طلا پوشش داده شده تا رسانا شوند. سپس مورفولوژی سطحی نانوحامل‌ها (زبری، شکل، صافی و توده‌های شدن) بررسی گردید. بار سطحی، پتانسیل زتای نانوذرات و محدوده توزیع اندازه ذرات، با استفاده از دستگاه زتا سائزر شرکت Brookhaven Instruments Corp اندازه‌گیری گردید. اندازه‌گیری DLS نانوذرات در زاویه 90° و تابش نور لیزر با طول موج 657 nm در دمای 25°C صورت گرفت. نمونه مورد استفاده

به صورت رقیق شده در غلظت 0.1 mg/ml آماده گردید و بلافاصله پس از آماده سازی اندازه گیری انجام شد.

اصول و اجزاء در پراش اشعه ایکس (XRD)

روش XRD یا پراش اشعه ایکس تکنیکی قدیمی و پرکاربرد در بررسی خصوصیات کریستال ها است. در این بررسی از روش XRD برای تعیین عموم کمیت ساختار کریستالی از قبیل ثابت شبکه، هندسه شبکه، تعیین کیفی، تعیین فاز کریستال ها، تعیین اندازه کریستال ها، جهت گیری تک کریستال، استرس، تنش، عیوب شبکه استفاده شد. در پراش اشعه ایکس توسط کریستال، مشاهده می شود که شدت اشعه ایکس باز تابیده از کریستال، که در هر اتم به صورت الاستیک پراکنده شده اند (بدون تغییر طول موج)، در زوایای خاصی ماکسیمم خواهد بود و در بقیه زوایا، شدت اشعه پراشیده شده مقدار قابل ملاحظه ای ندارد. منظور از پراش، همین رفتار اشعه ایکس است. برای یک نمونه کریستالی، قله های متعددی در زوایای متفاوت و با شدت های متفاوت وجود دارد. هر کدام از این قله ها مربوط به صفحه ای خاص از نمونه است، زاویه هر قله وابسته به فاصله بین صفحات و شدت قله مربوط به آرایش اتم ها در صفحات است.

اطلاعات به دست آمده از پراش یک کریستال شامل زاویه قله ماکسیمم، شدت نسبی ماکسیمم ها و همچنین پهنای هر قله است. این اطلاعات اساس XRD را تشکیل می دهند و با استفاده از همین اطلاعات، کاربردهای زیادی برای XRD وجود دارد.

کشت سلول های سرطان پوست (A2058)

سلول های A2058 از مرکز تحقیقات بوعلی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد و در محیط کشت RPMI1640 حاوی $10\% \text{ FBS}$ ، $1\% \text{ آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین (BIOTECH)}$ در فلاسک کشت سلولی 25Cm2 (Nunc) دانمارک و در شرایط مناسب در انکوباتور دمای 37°C و اتمسفر حاوی $5\% \text{ CO}_2$ و رطوبت 95% کشت داده شدند. ارزیابی ظاهر کلی سلول ها در زیر میکروسکوپ کنتراست فاز (Olympus CKX41) انجام شد.

سنجش میزان بقای سلول با روش MTT

آزمون MTT (دی متیل تiazول دی فنیل تترازولیم بروماید) برای بررسی تکثیر سلول های کشت داده شده و میزان زیست سازگاری نمونه ها انجام شد. برای انجام تست سمیت، 4×10^4 سلول از رده سلولی A2058 در چاهک های پلیت 96 خانه به مدت 24 ساعت کشت داده شد و در معرض کمپلکس نانوذرات $\beta\text{-CD-Thymol}$ در رقت های 0، $62/5$ ، 125 ، 250 و $500 \mu\text{g/ml}$ به مدت 24 ساعت انکوبه شدند (با در نظر گرفتن سه تکرار برای هر غلظت). پس از گذشت 24 ساعت زمان انکوباسیون و اطمینان از چسبندگی سلول ها به بستر پلیت، مواد رویی خارج شدند. سپس $50 \mu\text{l}$ DMEM تازه به هر چاهک اضافه شد و با اضافه کردن $50 \mu\text{l}$ ترکیب 3- (4-دی متیل تiazولیل) -5،2-دی فنیل تترازولیم برومید (MTT) $5 \mu\text{g/ml}$ به مدت 4 ساعت انکوبه شد.

پس از 4 ساعت انکوباسیون مجدد در دمای 37°C ، محیط تخلیه و کریستال های تشکیل شده در $150 \mu\text{l}$ دی متیل سولفوکسید حل و پس از انکوباسیون 24 ساعته جذب آن توسط میکروپلیت در طول موج 570 nm خوانده شد. نتایج به صورت میزان بقای سلولی گزارش شد. برای محاسبه درصد زنده ماندن سلول ها، جذب سلول های تیمار شده با دارو بر جذب سلول های گروه کنترل (بدون دارو) تقسیم و در عدد 100 ضرب شد.

بیان ژن های VEGF و VEGFR

سلول ها با غلظت های مختلف $\beta\text{-CD-Thymol}$ ($62/5$ ، 125 ، 250 و 500 میکروگرم در میلی لیتر) در فلاسک های T25، تیمار شد و بعد از گذشت 24 ساعت، سلول ها برای استخراج RNA از کف فلاسک جدا گردیدند. استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA طبق پروتکل انجام گرفت. غلظت RNA و خلوص آن با روش تعیین دانسیته نوری توسط دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ اندازه گیری شد که نسبت جذب نوری $260/280$ در تمامی نمونه های تیمار شده گزارش گردید و این عدد بالای 1.95 با حداقل غلظت $500 \text{ ng}/\mu\text{l}$ بود. پس از انجام بررسی های کمی و کیفی RNA، 500 ng از آن برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. برای سنتز cDNA از کیت iScript cDNA استفاده شد. از واکنش Real-time PCR به منظور تعیین بیان ژن های VEGF و VEGFR استفاده گردید. چرخه های تکثیری منحنی دمای ذوب برای اطمینان از اختصاصی بودن محصول رسم گردید. از روش $\Delta\Delta\text{Ct}$ برای بررسی تغییرات نسبی میزان بیان ژن های VEGF و VEGFR استفاده شد و تمامی تستها 3 بار تکرار گردید.

تست CAM

از تست CAM به منظور بررسی اثر ضد رگ زایی نانوذرات سنتز شده در غلظت های متفاوت استفاده شد. طبق پروتکل انجام شده در مطالعات قبلی ابتدا 40 عدد تخم مرغ نطفه دار نژاد ROSS از شرکت مرغداران طوس تهیه شد و بعد از الکل کشی به صورت افقی به دستگاه جوجه کشی منتقل شدند. شرایط دستگاه جوجه کشی شامل دمای 38 درجه سانتی گراد و رطوبت 55 تا 60% بود. پس از دو روز انکوباسیون، تخم مرغ ها را از دستگاه خارج کرده و به زیر هود منتقل شدند و در شرایط استریل به وسیله پنس در سمت پهن تخم مرغ، سوراخی کوچک و متعاقب آن در سمت پهلویی پنجره ایجاد شد و محل آن با چسب زخم و پارافین استریل پوشانده شد و تخم مرغ ها به دستگاه جوجه کشی بازگردانده شدند. تخم مرغ ها به طور تصادفی در 5 گروه 8 تایی شامل: گروه اول نمونه های کنترل (فاقد تیمار)، گروه دوم شاهد آزمایشگاهی (تیمار با سرم فیزیولوژی)، گروه سوم تیمار با $1000 \mu\text{g/mL}$ نانوذرات بتاسیکلودکسترین-تیمول، گروه چهارم تیمار با $500 \mu\text{g/mL}$ نانوذرات بتاسیکلودکسترین-تیمول، گروه پنجم تیمار با $250 \mu\text{g/mL}$ نانوذرات بتاسیکلودکسترین-تیمول تقسیم شدند. در

ملاحظات اخلاقی

برای انجام این تحقیق کد اخلاق IR.IAU.MSHD.REC.1402.079 از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی مشهد اخذ گردید.

نتایج

مشخصه‌یابی کمپلکس نانوذرات β -CD-Thymol

تعیین اندازه ذرات نانومولسیون

اندازه نانوذرات توسط DLS تعیین شد. مطابق شکل-۱،

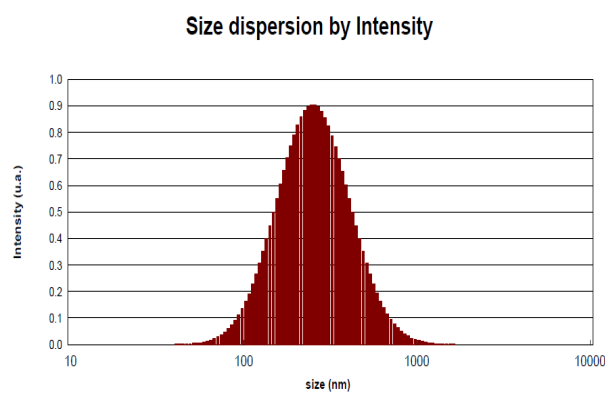
میانگین اندازه ذرات ۱۱۶/۲۰ nm به دست آمد.

نهایت، تخم‌ها مجدداً بسته و به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. تعداد و طول رگ‌های خونی CAM با استفاده از عکس‌های استریومیکروسکوپی و نرم افزار ImageJ اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری قد و وزن جنین از کولیس و ترازو استفاده شد [۹].

محاسبات آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) استفاده گردید و سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

Cumulants method			
		Zaverage (nm):	243.76
Dv10:	147.95	Dv50:	295.20
		Dv90:	513.00
		PDI:	0.2420
Dmean Intensity:	283.05	Dmean volume:	322.78
		Dmean number:	116.20

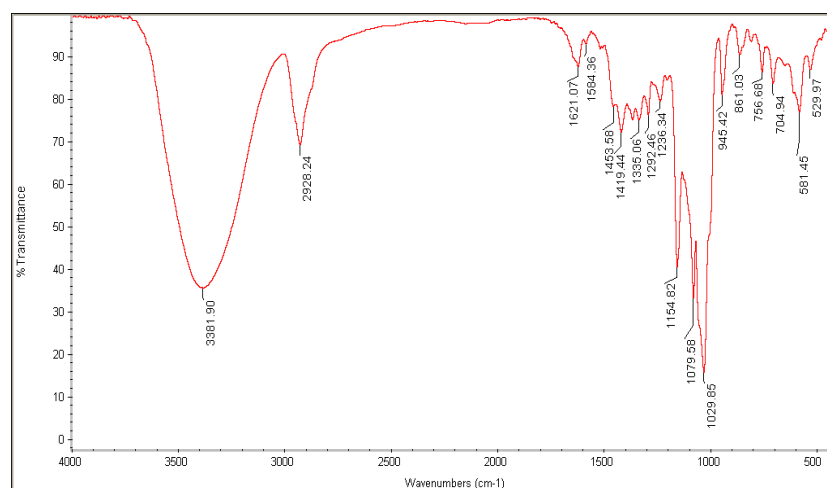


شکل-۱. نمودار توزیع کمپلکس نانوذرات-بتاسیکلودکسترین بارگذاری شده با تیمول

پیک نسبتاً پهن در ناحیه $3381/90 \text{ Cm}^{-1}$ می‌تواند مربوط به نانوذرات β -CD-Thymol و پیوند کششی C-O باشد و پیک در ناحیه $1029/85 \text{ Cm}^{-1}$ ناشی از پیوند H-O-C است. پیک موجود در محدوده $861/03 \text{ Cm}^{-1}$ مربوط به گروه‌های OH موجود در ترکیبات فنولی می‌باشد.

طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)

طیف FTIR کمپلکس نانوذره β -CD-Thymol در شکل-۲ نشان داده شده است. در طیف β -CD-Thymol، پیک ثبت شده در محدوده $3381/90 \text{ Cm}^{-1}$ و $529/97 \text{ Cm}^{-1}$ را می‌توان به لرزش کششی و ارتعاش خمش گروه OH اختصاص داد. در این طیف،

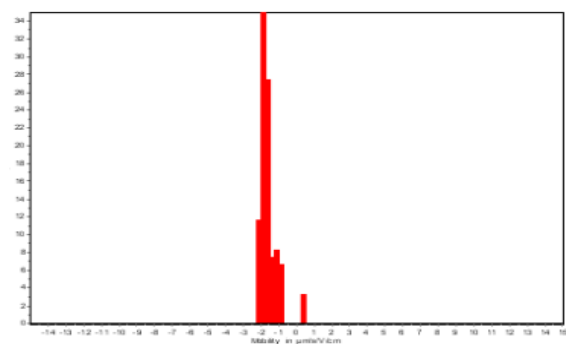


شکل ۲. طیف سنجی مادون قرمز کمپلکس نانوذره β -CD-Thymol

پتانسیل زتا

برای بررسی پتانسیل زتای نانوذرات از دستگاه particle size analyze استفاده شد. ثابت ذرات نانو سامانه با مقادیر پتانسیل زتا آن تایید می‌شود. اهمیت اندازه‌گیری پتانسیل زتا این است که مقدار آن نقش مهمی در پایداری نانوذرات در برابر تجمع، الحاق، و تداخل بین مواد باردار دارد. مطابق شکل-۳ پتانسیل زتا بدست آمده نانوذرات، $-21/64$ mV بود. برای ایجاد NPهایی با پایداری بالا از جهت الکترواستاتیکی، حداقل پتانسیل زتا ± 30 mV مورد نیاز است و این نشان دهنده حضور نانوذراتی پایدار می‌باشد.

Experiment Parameters	
Dielectric constant:	79.38
Electric Field:	8.50 V/cm
Conductivity:	0.048 mS/cm
Temperature:	21.76 °C
pH:	0.00
Viscosity:	0.9605 mPas
Statistics	
Mobiles:	Zeta Potential:
Mean:	-1.59 $\mu\text{m}^2/\text{Vcm}$
Standard Deviation:	0.47
Number of Trackings:	120
	Mean:
	-21.64 mV
	Standard Deviation:
	6.46
	Coefficient:
	13.63



شکل-۳. اندازه‌گیری پتانسیل زتا نانوذرات-بتاسیکلودکسترین بارگذاری شده با تیمول

مورفولوژی کمپلکس نانوذرات β -CD-Thymol

شکل-۴ نمای حاصل از بررسی نانوذرات با میکروسکوپ SEM را نشان می‌دهد که نانوذرات β -CD-Thymol طبق تصویر دارای ساختار کروی یکنواخت بوده و سطح نانوذرات همگن به نظر می‌رسد.

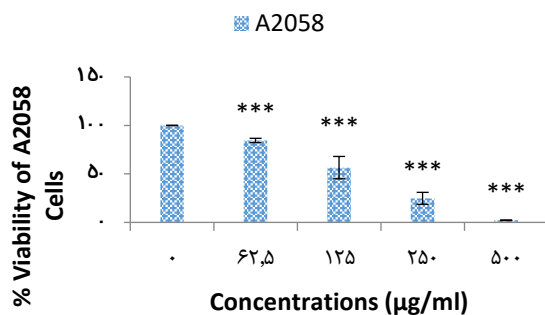


شکل ۴. تصویر SEM از کمپلکس نانوذرات β -CD-Thymol

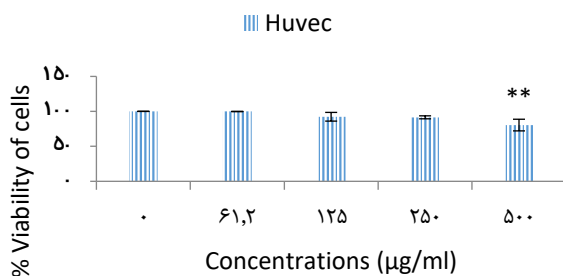
آزمون سمیت سلولی MTT نانوذرات β -CD-

Thymol

آزمون سمیت سلولی به صورت کمی توسط روش رنگ سنجی MTT برای نانوذرات β -CD-Thymol انجام شد. این بررسی در بازه زمانی ۲۴ ساعت انجام و نتایج مربوطه ثبت شد. میزان غلظت نانوذرات β -CD-Thymol بین $500-62/5$ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. زنده‌مانی سلول‌های A2058 در غیاب نانوذرات β -CD-Thymol صد در صد بود (نمودار ۱). در مقابل زنده‌مانی سلول‌های A2058 در نانوذرات β -CD-Thymol با غلظت‌های $62/5$ ، 125 ، 250 و 500 میکروگرم/ میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.001$). این امر وجود سمیت نانوذرات سنتز شده در غلظت‌های بین $500-62/5$ میکروگرم/ میلی‌لیتر را تایید نمود. نتایج این تحقیق بیانگر آن بود که اثرات سمیت سلولی نانوذرات β -CD-Thymol وابسته به دوز می‌باشد و با افزایش غلظت نانوذرات β -CD-Thymol اثرات سمیت سلولی نیز افزایش می‌یابد. نانوذرات β -CD-Thymol بر روی سلول‌های Huvec به عنوان سلول‌های کنترل، تا غلظت 1250 g/ml فاقد سمیت بود و تنها در غلظت 500 g/ml سمیت معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.01$).



نمودار ۱. اثر سمیت سلولی نانوذرات β -CD-Thymol علیه سلول‌های A2058 طی ۲۴ ساعت انکوباسیون. داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM ($n=3$) است. *** تفاوت معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌ها بین گروه کنترل و گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های متفاوت نانوذرات β -CD-Thymol ($P < 0.001$)



نمودار ۲. اثر سمیت سلولی نانوذرات β -CD-Thymol علیه سلول‌های Huvec طی ۲۴ ساعت انکوباسیون. داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM ($n=3$) است. ** تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه با غلظت 500 ($P < 0.01$).

تست CAM

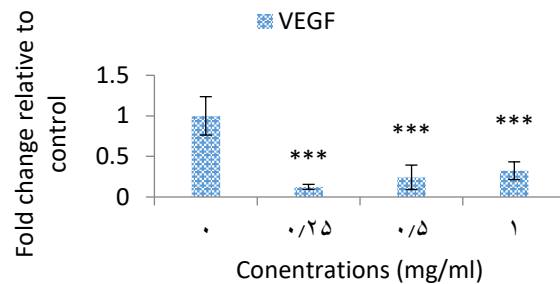
بر اساس نمودار ۵-A می‌توان گفت که میزان وزن جنین در غلظت ۲۵۰g/ml از بتاسیکلودکسترین بارگذاری شده با تیمول معادل ۴,۷۷ و در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ به ترتیب ۴,۸۱g و ۴,۷۴g بوده است که این اختلاف وزن معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). همانطور که در نمودار ۵-C نشان داده شده تعداد عروق ایجاد شده در غلظت ۲۵۰μg/ml از بتاسیکلودکسترین بارگذاری شده با تیمول بیشتر از غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. این افزایش برای غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر معنی‌دار ($P < 0.01$) می‌باشد و به صورت وابسته به دوز کاهش داشته است.

نمودار ۵-B نشان می‌دهد میزان رشد قد جنین در غلظت ۲۵۰μg/ml از بتاسیکلودکسترین بارگذاری شده با تیمول بیشتر از غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. این افزایش با $P < 0.05$ معنی‌دار می‌باشد و به صورت وابسته به دوز کاهش داشته است.

طول عروق ایجاد شده در غلظت ۱۰۰۰μg/ml از بتاسیکلودکسترین بارگذاری شده با تیمول کمتر از غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. این کاهش با $P < 0.05$ معنی‌دار می‌باشد و به صورت وابسته به دوز کاهش داشته است (نمودار ۵-D). تعداد عروق ایجاد شده در غلظت ۲۵۰μg/ml از بتاسیکلودکسترین بارگذاری شده با تیمول بیشتر از غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. این افزایش با $P < 0.05$ معنی‌دار می‌باشد و به صورت وابسته به دوز کاهش داشته است (نمودار ۵-D). مقایسه میانگین وزن جنین، طول جنین، تعداد عروق و طول عروق در ۵ گروه مختلف بعد از تیمار با نانوذرات بتاسیکلودکسترین بارگذاری شده با تیمول در جدول ۱- آمده است. میکروگراف استریومیکروسکوپی CAM به دنبال تیمار با دوزهای مختلف نانوذرات بتاسیکلودکسترین بارگذاری شده با تیمول در شکل-۵ نشان داده شده است.

بیان ژن VEGF به روش Real-time PCR

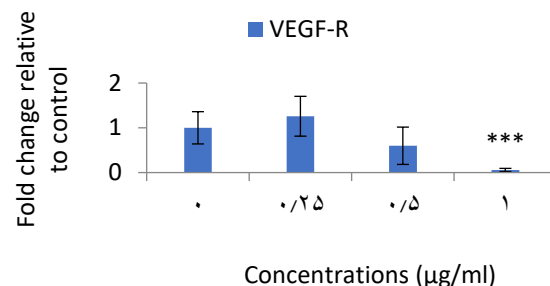
نمودار ۳ بیانگر میزان بیان نسبی ژن VEGF در مقایسه با ژن GAPDH در سلول‌های A2058 در مواجهه با غلظت‌های ۰,۲۵، ۰,۵ و ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر نانوذرات β-CD-Thymol می‌باشد. در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات β-CD-Thymol بیان ژن VEGF بطور معناداری کاهش یافته است که نشان‌دهنده تاثیر بالای نانوذرات سنتز شده در سلول‌های تیمار شده می‌باشد.



نمودار ۳. تغییرات بیان ژن VEGF در مقایسه با ژن GAPDH در سلول‌های A2058 در مواجهه با غلظت‌های ۰,۲۵، ۰,۵ و ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر β-CD-Thymol

بیان ژن VEGFR به روش RT-PCR

نمودار ۴ بیانگر میزان بیان نسبی ژن VEGFR در مقایسه با ژن GAPDH در سلول‌های A2058 در مواجهه با غلظت‌های ۰,۲۵، ۰,۵ و ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر نانوذرات β-CD-Thymol می‌باشد. در سلول‌های تیمار شده با β-CD-Thymol به میزان ۱ میلیگرم/ میلی‌لیتر بیان ژن VEGFR به شدت کاهش یافته است.



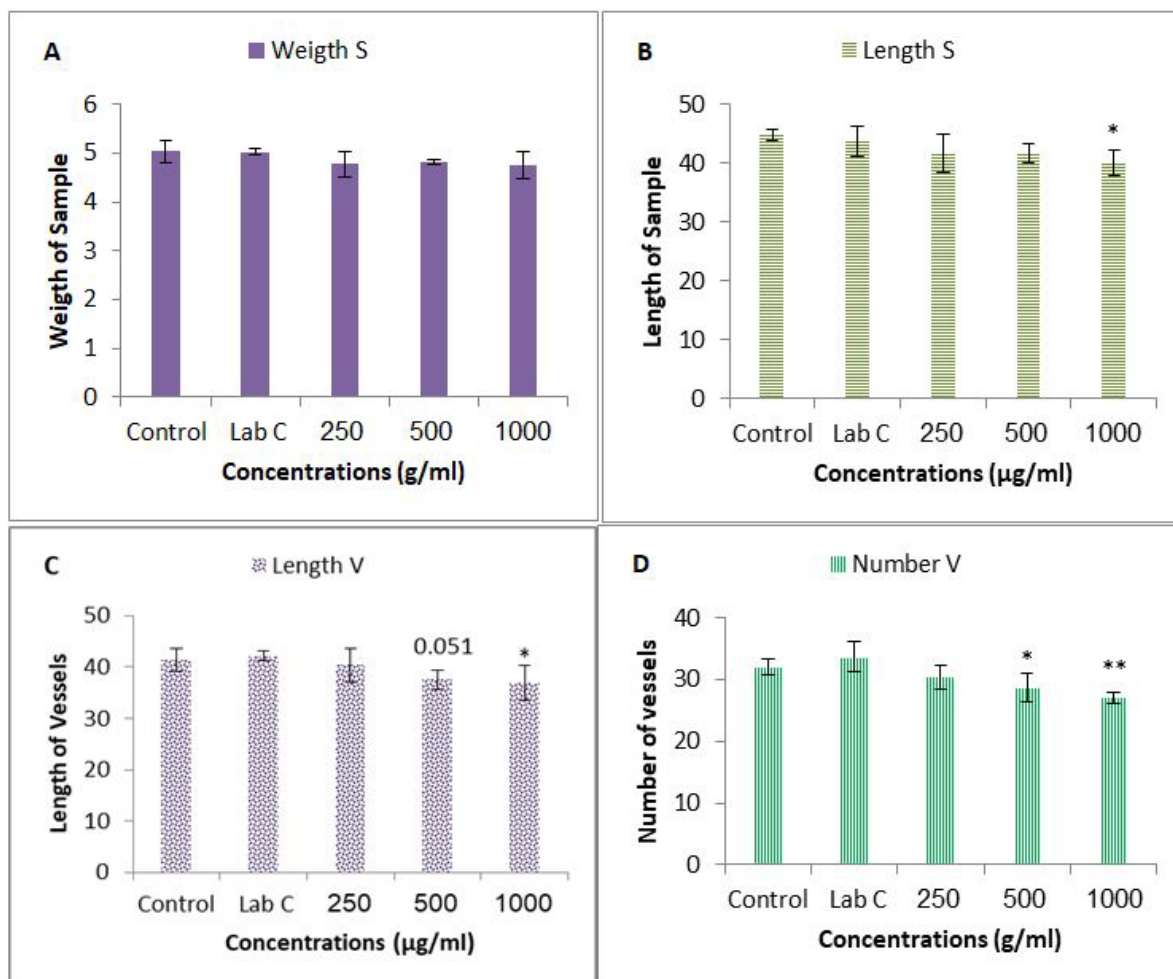
نمودار ۴. تغییرات بیان ژن VEGFR در مقایسه با ژن GAPDH در سلول‌های A2058 در مواجهه با غلظت‌های ۰,۲۵، ۰,۵ و ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر β-CD-Thymol

جدول ۱. مقایسه میانگین وزن جنین، طول جنین، تعداد عروق و طول عروق در گروه‌های مختلف بعد از تیمار با نانوذرات بتاسیکلودکسترین بارگذاری شده با تیمول

گروه‌ها	میانگین وزن جنین	P	میانگین طول جنین	P	میانگین تعداد عروق	P	میانگین طول عروق	P
کنترل	۵/۰۳۲۵	-	۴۴/۷۷۲۵	-	۳۰/۱۷۵	-	۴۱/۲۸۲۵	-
کنترل آزمایشگاهی	۵/۰۲۵	$P < 0.01$	۴۲/۶۶۷۵	$P < 0.05$	۳۳/۶۶۷۵	$P < 0.05$	۴۲/۱۰۷۵	$P < 0.05$
۲۵۰μg/ml	۴/۷۷	$P < 0.01$	۴۱/۷۴۲۵	$P < 0.05$	۳۰/۴۸	$P < 0.05$	۴۰/۲۷۵	$P < 0.05$
۵۰۰μg/ml	۴/۸۱	$P < 0.01$	۴۱/۶۱۷۵	$P < 0.05$	۲۸/۷۱۵	$P < 0.05$	۳۷/۵۲۷۵	$P < 0.05$
۱۰۰۰μg/ml	۴/۷۴۷	$P < 0.01$	۴۰/۱۴۵	$P < 0.05$	۲۷/۱۰۵	$P < 0.05$	۳۶/۸۵	$P < 0.05$



شکل ۵. میکروگراف استریومیکروسکوپی CAM به دنبال تیمار با دوزهای مختلف نانوذرات بتاسیکلودکسترین بارگذاری شده با تیمول



نمودار ۵. مقایسه وزن جنین (A)، طول جنین (B)، طول عروق (C) و تعداد عروق ایجاد شده در جنین (D)

بتاسیکلودکسترین و تعیین اثرات ضد سرطانی آن از طریق بررسی بیان ژن‌های VEGF و VEGFR پرداخته شد. در مطالعه حاضر اندازه متوسط نانوذرات سنتز شده با استفاده از $116,20 \text{ nm DLS}$ تعیین شد. پتانسیل زتا برای CD-thymol $-21,64 \text{ mV}$ بود، که نشان دهنده این است که نانومواد سنتز شده تا حدی پایدار هستند. تجزیه و تحلیل XRD برای مطالعه ماهیت یکپارچگی کریستالی CD-thymol انجام شد که ساختار کریستالی در نانوذرات سنتز شده از بتاسیکلودکسترین بارگذاری شده با تیمول را تایید کرد. برای تعیین ساختار و مورفولوژی نانوذرات سنتز شده از آنالیزهای SEM استفاده گردید و مشخص شد که ساختار این ذرات کروی است. نتایج مطالعات پیشین نشان داده که سطح سرمی VEGF در

بحث

سیستم‌های جدید تحویل نانودارویی دارای کالیبر برای بهبود حلالیت و زیست سازگاری ترکیبات شیمیایی مختلف در شیمی درمانی هستند. در این راستا، سیکلودکسترین‌ها گروهی از نانوالیگوساکاریدهای طبیعی، دارای ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد هستند، و برای دارورسانی و سایر اهداف دارویی به شدت مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند [۱۰]. افزودن فناوری نانو تنها می‌تواند کارایی و اثربخشی چنین ساختارهایی را بهبود بخشد. نانوذرات را می‌توان برای اطمینان از تحویل هدفمند انواع مواد از ترکیبات شیمیایی کوچک تا مولکول‌های زیستی بزرگ، طراحی و کاربردی کرد. با توجه به اثرات ضد سرطانی تیمول، در این مطالعه به تعیین تاثیر نانوذرات بارگذاری شده با تیمول در کمپلکس

β -thymol در رده سلولی ملانوما A2058 پس از ۲۴ ساعت تعیین شد. نتایج نشان داد که رده سلولی A2058 نسبت به رده سلولی نرمال Huvec نسبت به β -CD-thymol حساس است و کمپلکس β -CD-thymol بر روی رده سلولی نرمال فاقد اثر کشندگی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار بیان ژنهای موثر در رگ‌زایی از جمله ژنهای VEGF و VEGFR بود و بر اساس نتایج تست CAM کمپلکس β -CD-thymol رگ‌زایی را در رده سلولی سرطان پوست A2058 مهار نمود. به طور کلی نانوساختار β -CD-thymol علاوه بر مهار تشکیل رگ‌های خونی جدید، یک عامل ضد رگ‌زایی امیدوارکننده از طریق کنترل بیان ژن VEGF و VEGFR بود. اگرچه نتایج حاکی از سمیت CD- β -thymol برای سلول‌های سرطانی می‌باشد، اما، تحقیقات بیشتر و مطالعات *in vivo* در غلظت‌های مختلف یا حتی مشابه، ضروری است.

ملاحظات اخلاقی

برای انجام این تحقیق کد اخلاق IR.IAU.MSHD.REC.1402.079 از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی مشهد اخذ گردید.

تشکر و قدردانی: از همه اساتیدی که در غنای مطالب

حاضر یاری‌رسان بودند، نهایت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

نقش نویسندگان: همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله

یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ گونه تضاد

منافی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

- Kim JE, Chung BY, Sim CY, Park AY, Lee JS, Whang KU, et al. Clinicopathologic features and prognostic factors of primary cutaneous melanoma: A multicenter study in Korea. *J Korean Med Sci.* 2019; 34(16): e126. doi:10.3346/jkms.2019.34.e126 PMID:31020815 PMCID:PMC6484177
- Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OJ. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(1):20-37. doi:10.1038/nrc.2016.108 PMID:27834398 PMCID:PMC5575742
- Tahergorabi Z, Khazaei MJ. A review on angiogenesis and its assays. *Iran J Basic Med Sci.* 2012; 15(6):1110-26.
- Bando H. Vascular endothelial growth factor and bevacitumab in breast cancer. *Breast cancer (Tokyo,*

بیماران مبتلا به ملانوم در مقایسه با افراد سالم بالاتر است [۱۱]. در یک مطالعه، تیمول با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر، تکثیر سلولی را در سلول‌های نوروبلاستوما کشت شده (سلول‌های N2a) کاهش داد. علاوه بر این، غلظت‌های ۱۹، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را در نورون‌های موش افزایش داد، اما در سلول‌های N2a کاهش یافت. این گزارش به وضوح نشان داد که تیمول یک عامل ضد سرطان و ضد تکثیر قوی است [۱۲]. در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که بیان ژن‌های VEGF و VEGFR در مقایسه با ژن مرجع، در رده‌های سلولی ملانوما به طور قابل توجهی در گروه تیمار شده با کمپلکس β -CD-thymol به مدت ۲۴ ساعت، کاهش معنی‌دار دارند.

سنجش‌های *in vivo* معتبرترین اطلاعات را در مورد اینکه چگونه یک مولکول زیستی ممکن است بر فرآیند رگ‌زایی در یک ارگانیسم دست‌نخورده تأثیر بگذارد، ارائه می‌کند. در این مطالعه از تست CAM به عنوان رایج‌ترین روش *in vivo* مورد استفاده برای مطالعه رگ‌زایی به عنوان تأیید نهایی فرآیند رگ‌زایی استفاده شد [۱۳]. نتایج بررسی فعالیت ضد رگ‌زایی و میزان رشد و وزن جنین بر روی پرده کوریوآلانتوییک جوجه نشان داد که تیمار با غلظت ۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$ نسبت به غلظت‌های ۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و ۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از β -CD-thymol باعث کاهش معنی‌داری بیشتری در رگ‌زایی نسبت به گروه کنترل بر روی پرده آلانتوییک جوجه شده است. بر اساس نتایج مطالعات قبلی، تیمول با غلظت (۳۰، ۵-۳۴۴ نانوگرم در میلی‌لیتر) در رده سلولی سرطان رحم، با مهار رشد به شیوه‌ای وابسته به غلظت، سمیت سلولی را القا می‌کند. تیمول دارای فعالیت ضد توموری قوی با القای سمیت سلولی و کاهش شاخص میتوزی در غلظت‌های بالاتر در رده‌های سلولی A2058 است [۱۴]. در این مطالعه نیز سمیت سلولی تیمول و مشتقات آن را با روش MTT تعیین گردید. این روش برای اندازه‌گیری فعالیت متابولیک سلولی به عنوان شاخص زنده ماندن سلولی و/یا سمیت سلولی مناسب است. سنجش MTT نشان داد که β -CD-thymol اثر بازدارندگی بر روی زنده‌مانی سلول‌های سرطانی ملانوما دارد. علاوه بر فعالیت سیتوتوکسیک، فعالیت تکثیر نیز برای CD-

- Japan). *Breast Cancer.* 2007; 14(2):163-73. doi:10.2325/jbcs.968 PMID:17485901
- Nakatsu MN, Sainson RC, Pérez-del-Pulgar S, Aoto JN, Aitkenhead M, Taylor KL, et al. VEGF121 and VEGF165 regulate blood vessel diameter through vascular endothelial growth factor receptor 2 in an in vitro angiogenesis model. *Lab Invest.* 2003; 83(12):1873-85. doi:10.1097/01.LAB.0000107160.81875.33 PMID:14691306
- Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(8): 579-91. doi:10.1038/nrc2403 PMID:18596824
- Karthic A, Roy A, Lakkakula J, Alghamdi S, Shakoori A, Babalghith AO, et al. Cyclodextrin nanoparticles for diagnosis and potential cancer therapy: A systematic review. *Front Cell Dev Biol.* 2022; 10: 984311.

- doi:10.3389/fcell.2022.984311 PMID:36158215
PMCID:PMC9494816
8. Elbe H, Yigitturk G, Cavusoglu T, Uyanikgil Y, Ozturk F. Apoptotic effects of thymol, a novel monoterpene phenol, on different types of cancer. Bratisl lek listy. 2020; 121(2): 122-8. doi:10.4149/BLL_2020_016 PMID:32115964
9. Shabestarian H, Homayouni M, Movahedi M, Neamati A, Sharifnia F. Green Synthesis and Comparison of Biological Properties of Ag-NPs as a Metal Nanoparticle with ZnO-NPs as a Metal Oxide Nanoparticle and their Applications2022. doi:10.21203/rs.3.rs-1324734/v1 PMID:34844492
10. McDonald ES, Clark AS, Tchou J, Zhang P, Freedman GM. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. J Nucl Med. 2016; 57 Suppl 1:9s-16s. doi:10.2967/jnumed.115.157834 PMID:26834110
11. Viac J, Schmitt D, Claudy AJCI. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) is not a prognostic indicator in malignant melanoma. Cancer Lett. 1998; 125(1-2): 35-8. doi:10.1016/S0304-3835(97)00499-0 PMID:9566693
12. Aydın E, Turkez H, Tasdemir S, Hacimuftuoglu FJCNsAiMC. Anticancer, antioxidant and cytotoxic potential of thymol in vitro brain tumor cell model. Cent Nerv Syst Agents Med Chem. 2017; 17(2): 116-22. doi:10.2174/1871524916666160823121854 PMID:27554922
13. Stryker ZI, Rajabi M, Davis PJ, Mousa SA. Evaluation of Angiogenesis Assays. Biomedicines. 2019; 7(2): 37. doi:10.3390/biomedicines7020037 PMID:31100863 PMCID:PMC6631830
14. Abed RM. Cytotoxic, cytogenetics and immunomodulatory effects of thymol from Thymus vulgaris on cancer and normal cell lines in vitro and in vivo. Al-Mustansiriyah J Sci. 2011; 22(4): 41-53.

How to Cite this Article:

Feyzmohamadi Khoramabadi M, Nemati A, Homayouni Tabrizi M. Evaluation of the toxicity and anti-angiogenic effects of beta-cyclodextrin complex loaded with thymol in melanoma skin cancer cells (A2058). Feyz Med Sci J 2024; 28 (3): 261-270. doi: 10.48307/FMSJ.2024.28.3.261