

بررسی اثرات هم افزایی ضد سرطانی عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) و نانوذره گرافن بر رده سلول سرطانی HeLa

مرسده برارپور¹، مهیار گرامی¹، مهدی عارف راد²، علی پاکدین پاریزی^{2*}

1- موسسه آموزش عالی غیرانتفاعی سنا، ساری، ایران

2- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبهرستان، ساری، ایران

*نویسنده مسئول: a.pakdin@sanru.ac.ir

چکیده

سرطان یکی از مسائل مهمی است که سلامت عمومی در سراسر جهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات موثره آنها یک راهکار جایگزین برای جلوگیری و درمان سرطان می‌باشد. در تحقیق حاضر اثرات هم‌افزایی عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه و نانوذره گرافن بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم مورد بررسی قرار گرفت. از عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه، رقت‌های 100 و 200 میکروگرم در میلی‌لیتر ترکیبات فنولی کل معادل اسید گالیک تهیه شد. تاثیر این غلظت‌های عصاره در ترکیب با نانوذره گرافن (0، 50، 100 و 200 میکروگرم در میلی‌لیتر) بر زنده ماندن سلول‌های سرطانی HeLa با استفاده از آزمون MTT ارزیابی شد. بر اساس نتایج بدست آمده تیمار با عصاره گیاه بادرنجبویه تاثیر معنی داری بر کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطانی داشت ($p < 0.05$). افزودن نانوذره گرافن به عصاره گیاه تنها در غلظت 200 میکروگرم در میلی‌لیتر سبب کاهش قابل توجه سلول‌ها در هر دو غلظت مورد بررسی عصاره نسبت به تیمار عدم حضور نانوذره گردید. به طور کلی بر اساس نتایج بدست آمده عصاره هیدروالکلی نرمال شده بر اساس محتوای کل ترکیبات فنولی گیاه بادرنجبویه قادر به جلوگیری از رشد سلول‌های HeLa می‌باشد. از طرفی اثرات هم‌افزایی ضدسلولی در تیمار عصاره گیاه و نانوذره مشاهده شد که می‌تواند راهکاری جهت افزایش کارایی گیاهان دارویی برای مقابله با سلول‌های سرطانی باشد.

واژه‌های کلیدی: گرافن، خواص ضدسرطانی، بادرنجبویه، رده سلولی HeLa

سرطان دهانه رحم (cervical cancer) چهارمین سرطان شایع بین زنان و سومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان بین زنان می‌باشد (Buskwofie et al., 2020). شیوع بالای سرطان، هزینه بالای درمان و مؤثر نبودن درمان‌های شیمیایی، ضرورت دستیابی به ترکیبات دارویی جدید و طبیعی که عوارض جانبی کمتری داشته باشند را نشان می‌دهد (DeVita and Rosenberg, 2012).

گیاه بادرنجبویه (*Mellisa officinalis L.*) از خانواده نعناعیان (*Lamiaceae*) می‌باشد. این گیاه از دیرباز در درمان و کنترل بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی، سردرد و درمان تشنج، هیستری، سرگیجه و اثرات ضداسپاسم، ضعف قلب، بیماری‌های تنفسی و برخی از موارد آسم کاربرد داشته است (Moradkhani et al., 2010). قسمت مورد استفاده بادرنجبویه برگ و سرشاخه‌های جوان آن است. اسانس بدست آمده از این بخش‌های گیاه حاوی سیترال، اوژنول، ژرانیول، سیترونلال، لینالول، پلی‌فنل‌ها، کافئیک اسید، تانن، متیل سیترونات، جنرال استات، سسکوئتریپن‌ها، رزمارینیک اسید، فرولیک اسید و گالیک اسید می‌باشد (Rădulescu et al., 2021). اثرات ضدتوموری عصاره بادرنجبویه بر انواع مختلف سرطان به ویژه شش (Magalhães et al., 2018)، سینه (Ghiulai et al., 2020)، کلون (Weidner et al., 2015) و دهانه رحم (Cenić-Milošević et al., 2013) نشان داده شده است. ترکیبات مؤثره موجود در عصاره گیاه بادرنجبویه به روش‌های بیولوژیکی مختلف مانند ممانعت از تکثیر، آنتی‌آنژیوژنیک، آنتی‌آپوپتوتیک، ممانعت از چرخه سلولی و خواص آنتی‌اکسیدانی سلول‌های سرطانی را مهار می‌کنند (Jahanban-Esfahlan et al., 2015). فعالیت ضدالتهابی این گیاه نیز به رزمارینیک اسید موجود در عصاره نسبت داده می‌شود که از فعالیت C3 کانورتاز جلوگیری می‌کند (Allahverdiyev et al., 2004).

نانوذرات با توجه به اندازه، شکل، ساختار (یک بعدی یا چند بعدی) بر عملکردهای زیستی تاثیر گذاشته و اثرات سمیت مختلفی نشان می‌دهند. اندازه کوچک ذرات امکان

عبور از غشاء سلولی در اندامک‌هایی همچون میتوکندری را فراهم می‌کند (Zielińska et al., 2020). گرافن از گرافیت کریستالی جداسازی شده و در مقایسه با سایر نانوذرات کروی یا تک بعدی دارای یک ساختار دوبعدی می‌باشد. به دلیل ساختار منحصر به فرد، سطح ویژه و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی استثنایی گرافن، این ترکیب بطور گسترده در زمینه‌های مختلف مانند ذخیره انرژی، وسایل نانو الکترونیک، کاربردهای پزشکی از جمله ترکیبات ضد میکروبی، بیوسنسورها، تصویربرداری سلولی، درمان و تشخیص سرطان، ارسال هدفمند دارو و مهندسی بافت کاربرد دارد (Ou et al., 2016). مواد نانو مبتنی بر گرافن می‌تواند به عنوان حامل دارو در فوتوترمال تراپی بکار گرفته شوند و همچنین در درمان سرطان به صورت نانودارو استفاده شوند (Zuchowska et al., 2017).

با توجه به ویژگی‌های جالب توجه گرافن، در تحقیق حاضر اثرات هم‌افزایی ضدسرطانی این ترکیب همراه با عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه بر رده سلولی Hela (سلول‌های سرطانی دهانه رحم) به منظور یافتن راهکار بالقوه برای ممانعت از تشکیل تومور و به تعویق انداختن فرایند سرطان مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره گیاه بادرنجبویه

گیاهان بادرنجبویه مورد استفاده در این تحقیق از عطاری تهیه شد. پس از پودر کردن گیاه، 100 گرم نمونه پودر شده با 400 میلی لیتر اتانول 70 درصد مخلوط شد و به مدت 24 ساعت روی شیکر در دمای اتاق قرار گرفت. محلول حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد. به نمونه گیاهی مجدداً 400 میلی لیتر اتانول 70 درصد اضافه شده و به مدت 24 ساعت روی شیکر در دمای اتاق قرار داده شد. پس از فیلتر کردن، عصاره‌ها با هم مخلوط شده و برای حذف حلال به دستگاه روتاری در دمای 60 درجه سانتی‌گراد و با چرخش 70 درصد منتقل گردید. عصاره بدست آمده برای آزمایشات بعدی در ظرف تیره و در یخچال نگهداری شد.

تعیین محتوای ترکیبات فنلی کل

محتوای کل ترکیبات فنولی با استفاده از روش فولین-سیوکالتو اندازه گیری شد (Sánchez-Rangel et al., 2013). برای این منظور 100 میکرولیتر از عصاره گیاهی با 200 میکرولیتر محلول فولین 10 درصد مخلوط و به خوبی تکان داده شد. 800 میکرولیتر کربنات سدیم 700 میلی مولار به مخلوط اضافه شد و به مدت 2 ساعت در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد. جذب نمونه‌ها در 765 نانومتر اندازه گیری شد. از اسید گالیک (0 تا 100 میکروگرم در میلی لیتر) برای رسم منحنی استاندارد و به دست آوردن معادله خط استفاده شد.

کشت رده سلول Hela

رده سلولی Hela از بانک سلولی پاستور تهران خریداری گردید، سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) حاوی 10 درصد سرم جنین گاوی (FBS)، 0/2 میلی گرم در میلی لیتر L-glutamine و 1 درصد آنتی بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند و در انکوباتور در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، پنج درصد دی‌اکسیدکربن و رطوبت نسبی 100 درصد نگهداری شدند.

تیمار سلول‌های Hela

سلول‌های Hela با حداقل 70 درصد رشد با تیمار تریپسین از ته فلاسک جدا شده و در 1500 دور در دقیقه به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شدند. سوسپانسیون سلولی با محیط کشت جدید تهیه و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون با استفاده از تریپان بلو بررسی شد. تعداد 104 سلول به هر چاهک پلیت 96 خانه اضافه شد و به مدت 24 ساعت سلول‌ها در شرایط مناسب برای رشد قبل از تیمار با غلظت‌های مختلف گرافن و عصاره گیاه قرار داده شدند. سلول‌های Hela با ترکیبات غلظت‌های مختلف گرافن (0، 50، 100 و 200 میکروگرم در میلی‌لیتر) و عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه (0، 100 و 200 میکروگرم در میلی‌لیتر معادل اسیدگالیک) در سه تکرار تیمار شدند. از غلظت آسیب‌زای سیس پلاتین (15 میکروگرم در میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

پس از 24 ساعت میزان زنده‌مانی سلولی با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT تعیین شد.

گروه کنترل منفی گروهی که هیچ گونه محرکی دریافت نکردند، گروه کنترل مثبت گروهی که تحت تیمار با دوز آسیب‌زا سیس پلاتین قرار گرفته و گروه درمانی تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانو ذره گرافن و عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه قرار گرفت. در این پژوهش برای هر تیمار 3 تکرار در نظر گرفته شد.

سنجش MTT

محلول MTT (5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در یک میلی‌لیتر بافر PBS حل شد و 200 میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد. چاهک‌ها با فویل آلومینیومی پوشانده شدند و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 90 دقیقه نگهداری شدند. چاهک‌ها خالی شده و 100 میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. پلیت برای حل شدن فورمازان تشکیل شده تکان داده شد و جذب در 550 نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان جذب اندازه‌گیری شده با استفاده از فرمول زیر به درصد زنده‌مانی سلول تبدیل شد (Kumar et al., 2018).

زنده‌مانی سلول (درصد) = (جذب نمونه / جذب کنترل) × 100

ارزیابی پراکسیداسیون چربی

میزان مالون‌دی‌آلدهید به عنوان نشانگر زیستی تنش اکسیداتیو و شاخص پراکسیداسیون چربی با استفاده از روش رنگ‌سنجی واکنش تیوباربیتریک اسید (TBA) در سلول‌های تیمار شده با گرافن و عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه اندازه‌گیری شد. برای این منظور به 200 میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی، 100 میکرولیتر محلول تیوباربیتریک اسید (0/5 HCl نرمال، 15 TCA درصد و 0/3 TBA درصد) اضافه شده و به خوبی مخلوط و سپس در حمام آب گرم به مدت 30 دقیقه انکوبه گردید. پس از سرد شدن به آن 200 میکرولیتر ان-بوتانل اضافه شد و به خوبی تکان داده شد. مخلوط حاصل در 3500 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد و میزان جذب در طول موج 532 نانومتر اندازه‌گیری شد (Jain, 1989).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه 9/3 انجام شد. مقایسه میانگین با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) انجام شد ($p \leq 0.05$) و نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد سه تکرار گزارش شد.

نتایج و بحث

تاثیر تیمار گرافن و عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه بر رده سلولی Hela

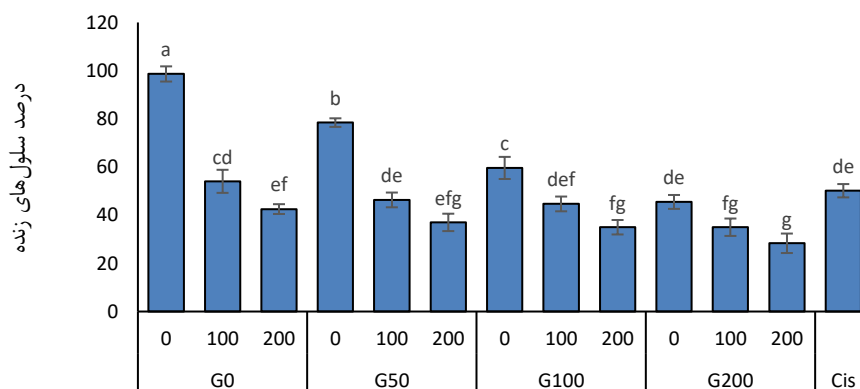
بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس اثرات متقابل گرافن و عصاره گیاه و نیز اثرات منفرد این تیمارها بر زنده ماندن سلول‌های Hela معنی دار بود (جدول 1).

جدول 1- تجزیه واریانس اثرات متقابل گرافن، عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه و ترکیب آنها بر زنده ماندن رده سلولی Hela

S.V.	SS	df	MS	p-value
Graphen	3984/82	3	1328/27	< 0/0001
PE	7803/15	2	3901/57	< 0/0001
Graphen*PE	1667/75	6	277/96	< 0/0001
Error	278/98	24	11/62	
CV%	6/76			

Hela مشاهده نشد. به طور کلی غلظت 200 میکروگرم در میلی لیتر عصاره بادرنجبویه در غلظت‌های 50، 100 و 200 میکروگرم در میلی لیتر گرافن به طور قابل توجهی سبب کاهش تعداد سلول‌های زنده رده سلولی Hela شد. براساس نتایج بدست آمده تیمار ترکیبی گرافن و عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه در مقایسه با هر کدام از تیمارها به تنهایی تاثیر بیشتری داشت (شکل 1).

در همه غلظت‌های گرافن مورد بررسی با افزایش غلظت عصاره بادرنجبویه در تیمار میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی کاهش نشان داد. تفاوت میان غلظت صفر عصاره و سایر غلظت‌ها در همه تیمارهای گرافن معنی دار بود ($p < 0.05$). اما در همه تیمارهای با حضور گرافن تفاوت معنی داری میان غلظت‌های 100 و 200 میکروگرم در میلی لیتر عصاره بادرنجبویه بر درصد سلول‌های زنده



غلظت عصاره (ترکیبات فنولی کل معادل اسید گالیک) غلظت گرافن (میکروگرم در میلی لیتر)

شکل 1- درصد سلول‌های زنده رده سلولی Hela تیمار شده با ترکیب غلظت‌های مختلف گرافن (0 تا 200 میکروگرم در میلی لیتر) و غلظت‌های مختلف ترکیبات فنولی کل معادل اسید گالیک (0 تا 200 میکروگرم در میلی لیتر). هر ستون میانگین سه تکرار \pm خطای استاندارد می‌باشد. میانگین‌های با حرف مشترک بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی دار ندارند ($p \leq 0.05$).

بسیاری از گیاهان حاوی ترکیباتی برای جلوگیری از سرطان هستند که می توانند اثرات خود را در مراحل مختلف شروع رشد سلول‌های سرطانی اعمال کنند (Abdullaev, 2001). اسانس گیاه بادرنجبویه با دارا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به‌عنوان یک عامل ضدتومور برای درمان یا پیشگیری از سرطان مورد استفاده قرار گیرد. یکی از روش‌های جدید در درمان سرطان، استفاده از نانوذرات می‌باشد. اندازه کوچک ذرات باعث برهم کنش بیشتر بین سلول‌ها و مولکول‌های زیستی می‌شود (Zielińska et al., 2020).

بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر، با افزایش غلظت ذرات گرافن درصد زنده‌مانی سلول‌های HeLa کاهش یافت. بر اساس مطالعات انجام شده اندازه ذرات، غلظت و زمان تیمار بر میزان سمیت نانوذرات تأثیر می‌گذارد (Jeyaraj et al., 2013). از طرفی سمیت سلولی بیشتر گرافن در غلظت‌های بالا بر سلول‌های سرطانی کبد نیز گزارش شده است (Yuan et al., 2017). گرافن به روش‌های مختلفی مانند تخریب غشاء و DNA، التهاب، آپوپتوز، نکروز و اختلالات میتوکندریایی به سلول آسیب می‌زند (Ou et al., 2016). تأثیر گرافن بر رده سلولی MCF-7 به صورت وابسته به غلظت گزارش شده است (Gurunathan et al., 2019). تماس لبه‌های بسیار تیز گرافن با غشای سلول به عنوان یکی از مکانیسم‌های اصلی درگیر در سمیت سلولی گرافن گزارش شده است (احمدی شادمهری و همکاران، 1398).

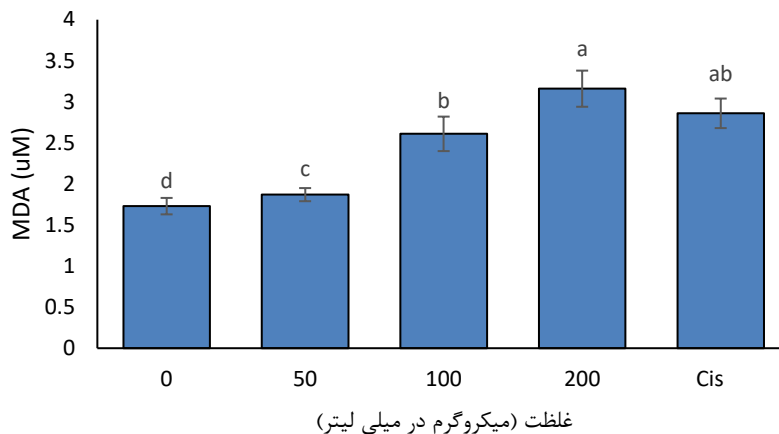
اعتقاد بر این است که فعالیت ضدسرطانی گیاهان با مهار آنزیم‌های تحریک کننده سرطان و تحریک تولید آنزیم‌های ضدتومور در سلول، اثرات آنتی‌اکسیدانی را القا و موجب افزایش ایمنی بدن می‌گردد (Kowalczyk et al., 2019). سجادی و همکاران در مطالعه ای اثرات آنتی‌اکسیدانی قابل توجه عصاره بادرنجبویه را گزارش کردند (سجادی و همکاران، 1383). در تحقیق دیگر Cenic-Milosevic و همکاران نشان دادند که *M. officinalis* دارای فعالیت سیتوتوکسیک بر روی سلول‌های HeLa می‌باشد (Cenic-Milosevic et al., 2013).

ارزیابی پراکسیداسیون چربی

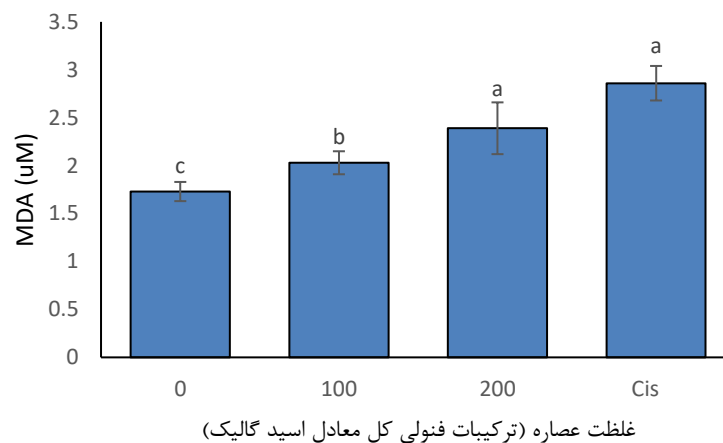
بر اساس نتایج تجزیه واریانس تیمارهای گرافن و عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه تأثیر معنی‌داری بر محتوای مالون دی‌آلدهید داشتند. در حالیکه تأثیر استفاده همزمان این تیمارها معنی دار نبود (جدول 2). بر اساس نتایج بدست آمده میزان پراکسیداسیون چربی وابسته به غلظت گرافن استفاده شده در تیمار بود و با افزایش مقدار گرافن مقدار مالون دی‌آلدهید (پراکسیداسیون چربی) افزایش یافت (شکل 2). نتایج مشابه در تیمارهای عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه مشاهده شد. به نحویکه بیشترین میزان پراکسیداسیون چربی در تیمار 200 میکروگرم در میلی لیتر عصاره مشاهده شد که از نظر آماری با تیمار کنترل مثبت (سیس پلاتین، 15 میکروگرم در میلی لیتر) تفاوت معنی دار نداشت (شکل 3).

جدول 2- تجزیه واریانس اثرات گرافن، عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه و ترکیب آنها بر پراکسیداسیون چربی در رده سلولی HeLa

S.V.	SS	df	MS	p-value
Graphen	10/65	3	3/55	< 0/0001
PE	3/43	2	1/71	< 0/0001
Graphen*PE	0/34	6	0/06	0/2134
Error	0/9	24	0/04	
CV%	7/05			



شکل 2- تاثیر غلظت‌های مختلف گرافن بر میزان پراکسیداسیون چربی در رده سلولی Hela. هر ستون میانگین سه تکرار \pm خطای استاندارد می‌باشد. میانگین‌های با حرف مشترک بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی دار ندارند ($p \leq 0.05$).



شکل 3- تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه (0، 100 و 200 میکروگرم در میلی لیتر) بر میزان پراکسیداسیون چربی در رده سلولی Hela. هر ستون میانگین سه تکرار \pm خطای استاندارد می‌باشد. میانگین‌های با حرف مشترک بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی دار ندارند ($p \leq 0.05$).

مانند کتون‌ها، اترها و آلدئیدها می‌شوند (Fenercioglu et al., 2010). اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع منجر به کاهش سیالیت غشا و از بین رفتن ساختمان و عملکرد آن می‌شود (Haraguchi et al., 1996). بر اساس نتایج بدست آمده، میزان پراکسیداسیون چربی وابسته به غلظت گرافن مورد استفاده در تیمار بود و با افزایش غلظت گرافن مقدار مالون دی آلدئید

پراکسیداسیون چربی یک فرایند وابسته به رادیکال‌های آزاد است که باعث ایجاد اختلالاتی در چربی‌های غشا و دیگر اجزای سلول می‌شود. در این فرایند رادیکال‌های آزاد الکترون‌ها را از زنجیره ی هیدروکربنی غیراشباع چربی‌ها بیرون کشیده، و باعث تخریب چربی و تولید ترکیبات فعال می‌شوند. این ترکیبات فعال پس از تخریب باندهای کربنی، سبب تولید طیف وسیعی از مواد

- disparities. *Journal of the National Medical Association*, 112(2), 229-232.
4. Rădulescu, M., Jianu, C., Lukinich-Gruia, A. T., Mioc, M., Mioc, A., Şoica, C., and Stana, L. G. (2021). Chemical composition, in vitro and in silico antioxidant potential of *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* essential oil. *Antioxidants*, 10(7), 1081.
 5. Ghiulai, R., Avram, S., Stoian, D., Pavel, I. Z., Coricovac, D., Oprean, C., ... and Sima, L. (2020). Lemon balm extracts prevent breast cancer progression in vitro and in ovo on chorioallantoic membrane assay. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020.
 6. Magalhães, D. B., Castro, I., Lopes-Rodrigues, V., Pereira, J. M., Barros, L., Ferreira, I. C., ... and Vasconcelos, M. H. (2018). *Melissa officinalis* L. ethanolic extract inhibits the growth of a lung cancer cell line by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis. *Food and function*, 9(6), 3134-3142.
 7. Weidner, C., Rousseau, M., Plauth, A., Wowro, S. J., Fischer, C., Abdel-Aziz, H., and Sauer, S. (2015). *Melissa officinalis* extract induces apoptosis and inhibits proliferation in colon cancer cells through formation of reactive oxygen species. *Phytomedicine*, 22(2), 262-270.
 8. Cenić-Milošević, D., Tambur, Z., Bokonjić, D., Ivančajić, S., Stanojković, T., Grozdanić, N., and Juranić, Z. (2013). Antiproliferative effects of some medicinal plants on HeLa cells. *Archives of Biological Sciences*, 65(1), 65-70.
 9. Jahanban-Esfahlan, A., Modaeinama, S., Abasi, M., Abbasi, M. M., and Jahanban-Esfahlan, R. (2015). Anti proliferative properties of *Melissa officinalis* in different human cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(14), 5703-5707.
 10. Ou, L., Song, B., Liang, H., Liu, J., Feng, X., Deng, B., ... and Shao, L. (2016). Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms. *Particle and fibre toxicology*, 13(1), 1-24.
 11. Zuchowska, A., Chudy, M., Dybko, A., and Brzozka, Z. (2017). Graphene as a new material in anticancer therapy-in vitro studies. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 243, 152-165.
 12. Li, Y., Liu, Y., Fu, Y., Wei, T., Le Guyader, L., Gao, G., ... and Chen, C. (2012). The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. *Biomaterials*, 33(2), 402-411.

(پراکسیداسیون چربی) افزایش یافت. نتایج مشابه در تیمار با عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه نیز مشاهده گردید. Li و همکاران نشان دادند که گرافن می‌تواند باعث آسیب فیزیکی غشای سلولی، افزایش نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری و تغییر پتانسیل غشای میتوکندری شود. از آنجاکه آپوپتوز ناشی از گرافن با از دست دادن پتانسیل غشای میتوکندری و افزایش سطح ROS سلولی همراه است، مسیر میتوکندری ممکن است مکانیسم غالب زمینه ساز آپوپتوز ناشی از گرافن باشد (Li et al., 2012). به نظر می‌رسد قرارگیری سلول‌های HeLa در معرض نانوذرات گرافن و عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه سبب افزایش مقدار رادیکال‌های آزاد در این سلول‌ها شده که پراکسیداسیون لیپید را به همراه دارد.

به طور کلی بر اساس نتایج بدست آمده عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه قادر به جلوگیری از رشد سلول‌های HeLa بود. از طرفی اثرات هم‌افزایی ضدسلولی وابسته به غلظت در تیمار عصاره گیاه بادرنجبویه و گرافن مشاهده شد که می‌تواند راهکاری جهت افزایش کارایی گیاهان دارویی برای مقابله با سلول‌های سرطانی باشد.

سپاسگزاری

از پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. احمدی شادمهری، ا؛ نامور، ف، میری، ح؛ یغمایی، پ، نخعی مقدم، م. (1398). مروری بر مکانیسم‌های سمیت سلولی و فعالیت ضدباکتریایی گرافن، مجله مطالعات علوم پزشکی، 30(11): 895-904.
2. سجادی، ا؛ نادری، غ؛ ضیایی، ر. (1383). تاثیرات آنتی اکسیدانی منتخبی از گیاهان دارویی خانواده نعناع، مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، 8(2): 1-12.
3. Buskwofie, A., David-West, G., and Clare, C. A. (2020). A review of cervical cancer: incidence and

- carcinoma cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 708-717.
21. Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., ... and Souto, E. B. (2020). Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules*, 25(16), 3731.
 22. Abdullaev, F. I. (2001). Plant-derived agents against cancer. In *Pharmacology and therapeutics in the new millennium* (pp. 345-354). Narosa Publishing House, New Delhi, India.
 23. Jain, S. K. (1989). Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *Journal of Biological Chemistry*, 264(35), 21340-21345.
 24. Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., and Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990-5999.
 25. DeVita Jr, V. T., and Rosenberg, S. A. (2012). Two hundred years of cancer research. *New England Journal of Medicine*, 366(23), 2207-2214.
 26. Moradkhani, H., Sargsyan, E., Bibak, H., Naseri, B., Sadat-Hosseini, M., Fayazi-Barjin, A., and Meftahizade, H. (2010). *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant. *J. Med. Plants Res*, 4, 2753-2759.
 27. Allahverdiyev, A., Duran, N., Ozguven, M. E. N. Ş. U. R. E., and Koltas, S. (2004). Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. *Phytomedicine*, 11(7-8), 657-661.
 28. Kumar, P., Nagarajan, A., and Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold spring harbor protocols*, 2018(6), pdb-prot095505.
 13. Haraguchi, H., Saito, T., Ishikawa, H., Date, H., Kataoka, S., Tamura, Y., and Mizutani, K. (1996). Antiperoxidative components in *Thymus vulgaris*. *Planta medica*, 62(03), 217-221.
 14. Kutan Fenercioglu, A., Saler, T., Genc, E., Sabuncu, H., and Altuntas, Y. (2010). The effects of polyphenol-containing antioxidants on oxidative stress and lipid peroxidation in Type 2 diabetes mellitus without complications. *Journal of endocrinological investigation*, 33, 118-124.
 15. Cenić-Milošević, D., Tambur, Z., Bokonjić, D., Ivančajić, S., Stanojković, T., Grozdanić, N., and Juranić, Z. (2013). Antiproliferative effects of some medicinal plants on HeLa cells. *Archives of Biological Sciences*, 65(1), 65-70.
 16. Kowalczyk, T., Sitarek, P., Skała, E., Toma, M., Wielanek, M., Pytel, D., ... and Śliwiński, T. (2019). Induction of apoptosis by in vitro and in vivo plant extracts derived from *Menyanthes trifoliata* L. in human cancer cells. *Cytotechnology*, 71, 165-180.
 17. Gurunathan, S., Kang, M. H., Jeyaraj, M., and Kim, J. H. (2019). Differential cytotoxicity of different sizes of graphene oxide nanoparticles in leydig (TM3) and sertoli (TM4) cells. *Nanomaterials*, 9(2), 139.
 18. Ou, L., Song, B., Liang, H., Liu, J., Feng, X., Deng, B., ... and Shao, L. (2016). Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms. *Particle and fibre toxicology*, 13(1), 1-24.
 19. Yuan, Y. G., Wang, Y. H., Xing, H. H., and Gurunathan, S. (2017). Quercetin-mediated synthesis of graphene oxide–silver nanoparticle nanocomposites: A suitable alternative nanotherapy for neuroblastoma. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 5819.
 20. Jeyaraj, M., Rajesh, M., Arun, R., MubarakAli, D., Sathishkumar, G., Sivanandhan, G., ... and Ganapathi, A. (2013). An investigation on the cytotoxicity and caspase-mediated apoptotic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using *Podophyllum hexandrum* on human cervical

Synergistic anticancer properties of hydro-alcoholic extract of lemon balm (*Melissa officinalis*) and graphene nanoparticle on HeLa cell line

Mersedeh Bararpour¹, Mahyar Gerami¹, Mehdi Arefrad², Ali Pakdin-Parizi^{2*}

1-SANA institute of higher education, Sari, Iran.

2-Sari agricultural sciences and natural resources university, Genetics and agricultural biotechnology institute of Tabarestan, Sari, Iran.

* Corresponding author: a.pakdin@sanru.ac.ir

Abstract

Cancer is one of the important problems affecting public health worldwide. The use of medicinal plants and their effective compounds is an alternative solution to prevent and treat cancer. In the present research, the synergistic effects of lemon balm hydro-alcoholic extract and graphene nanoparticles on cervical cancer cells were investigated. Dilutions of 100 and 200 µg/ml total phenolic compounds equivalent to gallic acid were prepared and the effect of these extract concentrations in combination with graphene nanoparticles (0, 50, 100 and 200 µg/ml) on the survival of HeLa cancer cells was evaluated using the MTT assay. Based on the results, the treatment with lemon balm extract had a significant effect on reducing the cell survival ($p \leq 0.05$). Addition of graphene nanoparticles to the plant extract only at a concentration of 200 µg/ml caused a significant reduction of cells in both concentrations of the extract compared to the treatment without graphene nanoparticles. In general, the hydro-alcoholic extract of lemon balm is able to prevent the growth of HeLa cells. On the other hand, synergistic anticancer effects were observed in the combination of plant extract and graphene nanoparticles, which can be a solution to increase the efficiency of medicinal plants to fight cancer cells.

Keywords: graphene, anti-cancer properties, lemon balm, HeLa cell line