

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

مرسده برارپور<sup>۱</sup>، مهیار گرامی<sup>۱</sup>، مهدی عارف راد<sup>۲</sup>، علی پاکدین پاریزی<sup>۲\*</sup>

۱- موسسه آموزش عالی غیرانتفاعی سنا، ساری، ایران

۲- 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 می دهد. استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات موثره آنها یک راهکار جایگزین برای جلوگیری و درمان سرطان می باشد. در تحقیق حاضر اثرات هم افزایی عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه و نانوذره گرافن بر سلول های سرطانی دهانه رحم مورد بررسی قرار گرفت. از عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه، رقت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر ترکیبات فنولی کل معادل اسید گالیک تهیه شد. تاثیر این غلظت های عصاره در ترکیب با نانوذره گرافن (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) بر زنده ماندن سلول های 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 سلول های سرطانی داشت ( $p < 0.05$ ). افزودن نانوذره گرافن به عصاره گیاه تنها در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر سبب کاهش قابل توجه سلول ها 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 سلول های HeLa می باشد. از طرفی اثرات هم افزایی ضدسلولی در تیمار عصاره گیاه و نانوذره مشاهده شد که می تواند راهکاری جهت افزایش کارایی گیاهان دارویی برای مقابله با سلول های سرطانی باشد.

واژه های کلیدی: گرافن، خواص ضدسرطانی، بادرنجبویه، رده سلولی HeLa

## مقدمه

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

گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) از خانواده نعناعیان (*Lamiaceae*) می باشد. این گیاه از دیرباز در درمان و کنترل بیماری های سیستم عصبی مرکزی، سردرد و درمان تشنج، هیستری، سرگیجه و اثرات ضداسپاسم، ضعف قلب، بیماری های تنفسی و برخی از موارد آسم کاربرد داشته است (Moradkhani et al., 2010). قسمت مورد استفاده بادرنجبویه برگ و سرشاخه های جوان آن است. اسانس بدست آمده از این بخش های گیاه حاوی سیترال، اوژنول، ژرانیول، سیترونلال، لینالول، پلی فنل ها، کافئیک اسید، تانن، متیل سیترونلالت، جنرال استات، سسکوئی ترپن ها، رزمارینیک اسید، فرولیک اسید و گالیک اسید می باشد (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 روش های بیولوژیکی مختلف مانند ممانعت از تکثیر، آنتی آنژیوژنیک، آنتی آپوپتوتیک، ممانعت از چرخه سلولی و خواص آنتی اکسیدانی سلول های سرطانی را مهار می کنند (Jahanban-Esfahlan et al., 2015). فعالیت ضدالتهابی این گیاه نیز به رزمارینیک اسید موجود در عصاره نسبت داده می شود که از فعالیت C3 کانورتاز جلوگیری می کند (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 می دهند. اندازه کوچک ذرات امکان

عبور از غشاء سلولی در اندامک هایی همچون میتوکندری را فراهم می کند (Zielińska et al., 2020). گرافن از گرافیت کریستالی جداسازی شده و در مقایسه با سایر نانوذرات کروی یا تک بعدی دارای یک ساختار دوبعدی می باشد. به دلیل ساختار منحصر به فرد، سطح ویژه و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی استثنایی گرافن، این ترکیب بطور گسترده در زمینه های 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 می تواند 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 ویژگی های جالب توجه گرافن، در تحقیق حاضر اثرات هم افزایی ضد سرطانی این ترکیب همراه با عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه بر رده سلولی Hela (سلول های 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 روش ها

### تهیه عصاره گیاه بادرنجبویه

گیاهان بادرنجبویه مورد استفاده در این تحقیق از عطاری تهیه شد. پس از پودر کردن گیاه، ۱۰۰ گرم نمونه پودر شده با ۴۰۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط شد و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر در دمای اتاق قرار گرفت. محلول حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد. به نمونه گیاهی مجدداً ۴۰۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر در دمای اتاق قرار داده شد. پس از فیلتر کردن، عصاره ها با هم مخلوط شده و برای حذف حلال به دستگاه روتاری در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و با چرخش ۷۰ درصد منتقل گردید. عصاره بدست آمده برای آزمایشات بعدی در ظرف تیره و در یخچال نگهداری شد.

### تعیین محتوای ترکیبات فنلی کل

پس از ۲۴ 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 آسیب زا 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 ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

#### سنجش MTT

محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در یک میلی‌لیتر بافر PBS حل شد و ۲۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد. چاهک‌ها با فویل آلومینیومی پوشانده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه نگهداری شدند. چاهک‌ها خالی شده و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. پلیت برای حل شدن فورمازان تشکیل شده تکان داده شد و جذب در ۵۵۰ 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) × ۱۰۰

#### 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 ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی، ۱۰۰ میکرولیتر محلول تیوباربیتریک اسید (HCl ۰/۵ نرمال، TCA ۱۵ درصد و TBA ۰/۳ درصد) اضافه شده و به خوبی مخلوط و سپس در حمام آب گرم به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. پس از سرد شدن به آن ۲۰۰ میکرولیتر ان-بوتانل اضافه شد و به خوبی تکان داده شد. مخلوط حاصل در ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد (Jain, 1989).

محتوای کل ترکیبات فنولی با استفاده از روش فولین-سیوکالتو اندازه‌گیری شد (Sánchez-Rangel et al., 2013). برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی با ۲۰۰ میکرولیتر محلول فولین ۱۰ درصد مخلوط و به خوبی تکان داده شد. ۸۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷۰۰ میلی مولار به مخلوط اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد. جذب نمونه‌ها در ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. از اسید گالیک (۰ تا ۱۰۰ 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 ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ۰/۲ میلی‌گرم در میلی لیتر L-glutamine و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پنج درصد دی‌اکسیدکربن و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد نگهداری شدند.

#### تیمار سلول‌های Hela

سلول‌های Hela با حداقل ۷۰ درصد رشد با تیمار تریپسین از ته فلاسک جدا شده و در ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سوسپانسیون سلولی با محیط کشت جدید تهیه و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون با استفاده از تریپان بلو بررسی شد. تعداد ۱۰۴ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و به مدت ۲۴ 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 (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر معادل اسیدگالیک) در سه تکرار تیمار شدند. از غلظت آسیب‌زای سیس پلاتین (۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۳ 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

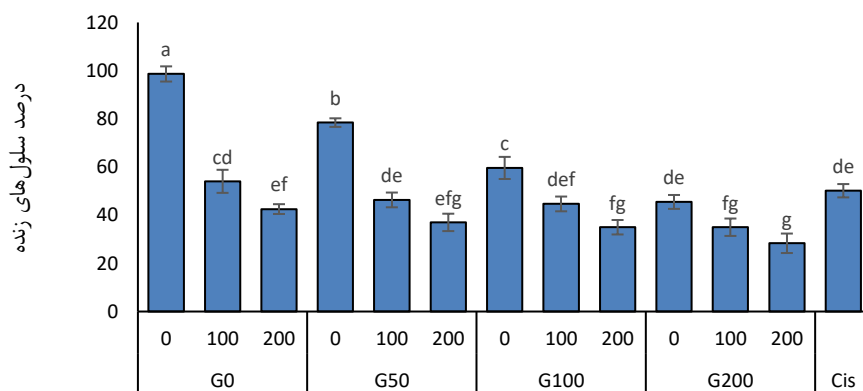
بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس اثرات متقابل گرافن و عصاره گیاه و نیز اثرات منفرد این تیمارها بر زنده ماندن سلول‌های Hela معنی دار بود (جدول ۱).

جدول ۱- 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	۳۹۸۴/۸۲	۳	۱۳۲۸/۲۷	< ۰/۰۰۰۱
PE	۷۸۰۳/۱۵	۲	۳۹۰۱/۵۷	< ۰/۰۰۰۱
Graphen*PE	۱۶۶۷/۷۵	۶	۲۷۷/۹۶	< ۰/۰۰۰۱
Error	۲۷۸/۹۸	۲۴	۱۱/۶۲	
CV%	۶/۷۶			

Hela مشاهده نشد. به طور کلی غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره بادرنجبویه در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ 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 ۱).

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 ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره بادرنجبویه بر درصد سلول‌های زنده



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

شکل ۱- درصد سلول‌های زنده رده سلولی Hela تیمار شده با ترکیب غلظت‌های مختلف گرافن (۰ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) و غلظت‌های مختلف ترکیبات فنولی کل معادل اسید گالیک (۰ تا ۲۰۰ 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 ( $p \leq 0.05$ ).

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، ۱۳۸۳). 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

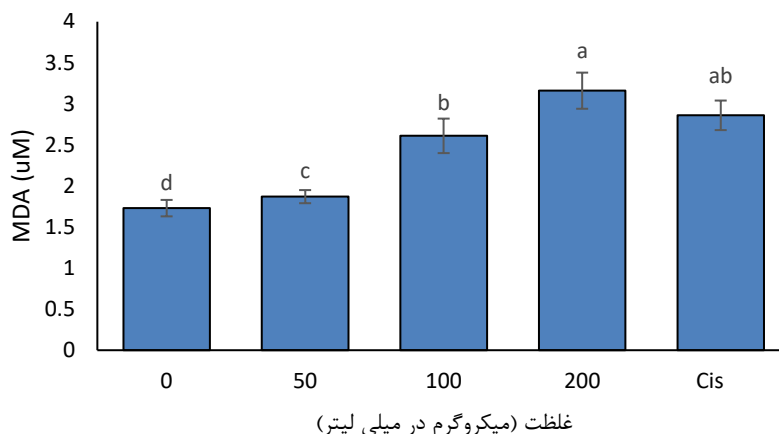
بر اساس نتایج تجزیه واریانس تیمارهای گرافن و عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه تاثیر معنی‌داری بر محتوای مالون دی‌آلدهید داشتند. در حالیکه تاثیر استفاده همزمان این تیمارها معنی دار نبود (جدول ۲). بر اساس نتایج بدست آمده میزان پراکسیداسیون چربی وابسته به غلظت گرافن استفاده شده در تیمار بود و با افزایش مقدار گرافن مقدار مالون دی‌آلدهید (پراکسیداسیون چربی) افزایش یافت (شکل ۲). نتایج مشابه در تیمارهای عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه مشاهده شد. به نحویکه بیشترین میزان پراکسیداسیون چربی در تیمار ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره مشاهده شد که از نظر آماری با تیمار کنترل مثبت (سیس پلاتین، ۱۵ میکروگرم در میلی لیتر) تفاوت معنی دار نداشت (شکل ۳).

بسیاری از گیاهان حاوی ترکیباتی برای جلوگیری از سرطان هستند که می‌توانند 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).

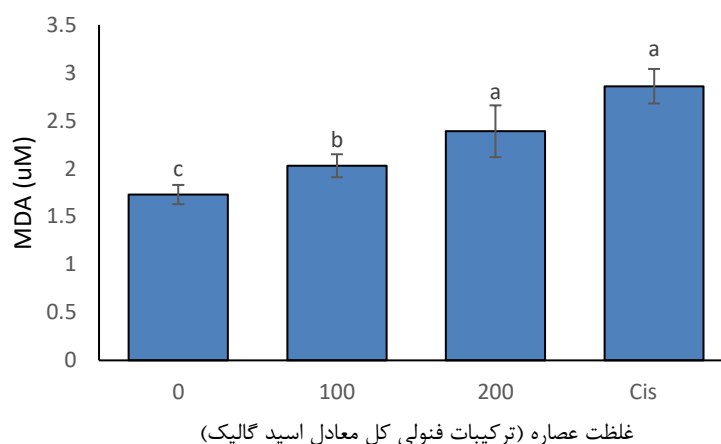
بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر، با افزایش غلظت ذرات گرافن درصد زنده‌مانی سلول‌های HeLa کاهش یافت. بر اساس مطالعات انجام شده اندازه ذرات، غلظت و زمان تیمار بر میزان سمیت نانوذرات تأثیر می‌گذارد (Jeyaraj et al., 2013). از طرفی سمیت سلولی بیشتر گرافن در غلظت‌های بالا بر سلول‌های سرطانی کبد نیز گزارش شده 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، ۱۳۹۸).

جدول ۲- 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	۱۰/۶۵	۳	۳/۵۵	< ۰/۰۰۰۱
PE	۳/۴۳	۲	۱/۷۱	< ۰/۰۰۰۱
Graphen*PE	۰/۳۴	۶	۰/۰۶	۰/۲۱۳۴
Error	۰/۹	۲۴	۰/۰۴	
CV%	۷/۰۵			



شکل ۲- 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 ۳- 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
۱. احمدی شادمهری، ا؛ نامور، ف، میری، ح؛ یغمایی، پ، نخعی مقدم، م. (۱۳۹۸). مروری بر مکانیسم‌های سمیت سلولی و فعالیت ضدباکتریایی گرافن، مجله مطالعات علوم پزشکی، ۳۰(۱۱): ۸۹۵-۹۰۴.
  ۲. سجادی، ا؛ نادری، غ؛ ضیایی، ر. (۱۳۸۳). تاثیرات آنتی اکسیدانی منتخبی از گیاهان دارویی خانواده نعناع، مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ۸(۲): ۱۲-۱.
  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 Bararpour<sup>1</sup>, Mahyar Gerami<sup>1</sup>, Mehdi Arefrad<sup>2</sup>, Ali Pakdin-Parizi<sup>2\*</sup>

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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  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  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  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