

خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریال و ضد سرطانی نانوامولسیون سنتز شده از روغن مازو

محمد مهدی عبادی^۱، مسعود همایونی تبریزی^۲، علی اسحاقی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: این مطالعه به منظور بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریالی و ضدسرطانی روغن مازو به عنوان یک گیاه دارویی مهم در طب سنتی صورت گرفته که به روش نانوامولسیونی به‌عنوان یک روش نوین در داورسانی سنتز شده است.

روش‌ها: فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون روغن مازو با روش سنجش فعالیت مهاري رادیکال‌های ۲ و ۲ دی فنیل - ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) و خواص ضد میکروبی آن بر روی چهار باکتری پاتوژن فرصت طلب شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *میکروکوکوس لوتوس* و باکتری‌های گرم منفی *اشرشیاکلی* و *کلیسیلاپنومونیه* به روش انتشار دیسک بررسی شد. برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده و کشنده رشد از روش میکروبراث دایلوژن استفاده شد. همچنین، خواص ضد سرطانی نانوامولسیون روغن مازو بر روی سلول‌های سرطان پروستات رده‌ی PC3 به روش MTT مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن با سلول‌های نرمال فیبروبلاست پوست رده‌ی HFF مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها: بر اساس نتایج دیسک دیفیوژن، نانوامولسیون روغن مازو تنها علیه پاتوژن‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتوس* قدرت مهاري دارد. در حالیکه باکتری‌های گرم منفی به این ترکیب مقاوم بودند. نانوامولسیون روغن مازو خواص آنتی‌اکسیدانی قابل قبولی دارد و میزان مهار رادیکال‌های آزاد (IC₅₀) با روش DPPH حدود ۵۸/۹۰۵ میکروگرم / میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. تست تعیین سمیت نیز بیانگر تأثیر معنی‌دار نانوامولسیون روغن مازو در از بین بردن سلول‌های سرطانی پروستات در مقایسه با سلول‌های نرمال فیبروبلاست پوست می‌باشد.

نتیجه‌گیری: مطالعه‌ی حاضر نشان داد که نانوامولسیون روغن مازو در شرایط برون‌تنی دارای درجاتی نسبی از خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و آنتی‌باکتریال علیه پاتوژن‌های گرم مثبت است که وجود آن‌ها می‌تواند در محصولات غذایی کمک‌کننده باشد.

واژگان کلیدی: عصاره‌ی گیاهی؛ نانو امولسیون؛ آنتی‌اکسیدان؛ آنتی‌باکتریال؛ سرطان پروستات

ارجاع: عبادی محمد مهدی، همایونی تبریزی مسعود، اسحاقی علی. **خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریال و ضد سرطانی نانوامولسیون سنتز شده**

از روغن مازو. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۲۴): ۴۷۹-۴۸۷

مقدمه

به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع برای گسترش گزینه‌های جدید درمانی در نظر گرفته می‌شود (۲). یکی از این گیاهان دارویی، مازو می‌باشد. مازو، میوه‌ی کروی شکلی است که از تخم‌گذاری نوعی حشره بر روی شاخه‌های تازه درختان، به ویژه درخت بلوط بوجود می‌آید. این گیاه عمدتاً در یونان، آسیای صغیر، سوریه و ایران یافت می‌شود. مازو، در آسیای مرکزی یکی از محبوب‌ترین گیاهان در طب سنتی بوده است و بیشتر برای درمان اختلال حرکت روده، اسهال خونی و پوسیدگی دندان از آن استفاده می‌شود (۳). امروزه نیز در طب مدرن، این دارو را دارای خواص ضد باکتری، ضد ویروسی، ضد قارچی و دارای آنتی‌اکسیدان و خواص ضد التهابی می‌دانند. وجود

از زمان‌های بسیار قدیم، مردمان تمدن‌های مختلف از گیاهان دارویی برای پیشگیری و درمان گستره‌ی زیادی از بیماری‌ها استفاده می‌کردند که یادمان‌های به‌جا مانده از آن‌ها مؤید این مطلب است (۱). قدیمی‌ترین اشکال درمان پزشکی در تاریخ بشر، گیاهان دارویی بوده‌اند که امروزه نیز و با وجود تمامی پیشرفت‌های طب مدرن، بیش از ۷۰ درصد مردمان کشورهای در حال توسعه برای برآورد نیازهای مراقبتی اولیه خود از این نوع داروها استفاده می‌کنند که این آمارها حاکی از اهمیت بالای این داروها می‌باشد. همچنین، گیاهان دارویی به دلیل تولید ارزان، سازگاری با محیط زیست و آثار جانبی محدود

۱- کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: علی اسحاقی، دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

بین دو جداری استوانه، حفظ گردید. به منظور سنتز نانوامولسیون از توئین ۸۰ به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر و از توئین ۲۰ هم به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به عنوان سورفکتانت را با ۱۰ میلی لیتر روغن مازو و از پلی اتیلن گلیکول (PEG 400) به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر به منظور کوسورفکتانت حلال کمکی استفاده شد. در ادامه با آب دیونیز به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانیده شد. سپس به مدت ۶۰ دقیقه در هات پلیت استیرر قرار داده شد (۸).

مشخصه یابی نانوامولسیون های سنتز شده: روش پراکندگی نور پویا (DLS (Dynamic light scattering)) برای اندازه گیری ویژگی های اندازه و سطح انجام شد. همچنین در جهت شناسایی و مشخصه یابی مورفولوژی نانوذره از آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد. همچنین در جهت تعیین بار سطحی نانوذره از آنالیز پتانسیل زتا استفاده گردید.

بررسی خاصیت ضد باکتریایی نانوامولسیون روغن مازو

انتشار دیسک: در این مطالعه، برای ارزیابی اثر ضد باکتریایی نانوامولسیون روغن مازو از روش انتشار از دیسک (دیسک دیفیوژن) استفاده شد (۹). در این آزمایش، اثر ضد باکتریایی نانوامولسیون روغن مازو جهت مهار رشد باکتری های گرم مثبت /استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC ۲۹۲۱۳)، میکروکوکوس لوتوس (ATCC ۱۰۲۴۰) و همچنین باکتری های گرم منفی از قبیل /شریشیالکی (ATCC ۲۵۹۲۲) و کلبسیلا پنومونیه (ATCC ۷۰۰۶۰۳) بهره برده شد. طی این مراحل، جهت تهیه دیسک آنتی بیوتیکی از دیسک بلانک استفاده شد و هر آزمایش سه بار تکرار گردید و به منظور انجام محاسبات از میانگین آن ها استفاده شد. برای این منظور، هر دیسک بلانک به نانوامولسیون روغن مازو با غلظت ۱ میلی گرم/میلی لیتر آغشته شد. از باکتری های رشد کرده، سوپانسیون معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه و روی محیط مولر هیتون آگار به صورت کشت سفراهی، کشت داده شد. پلیت ها به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند و پس از آن، با پنس استریل در سطح محیط قرار گرفتند، به طوری که فاصله دیسک ها از لبه پلیت ۱/۵ سانتی متر و نسبت به هم ۲/۵ سانتی متر بود. سپس پلیت به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از این مدت، قطر هاله عدم رشد هر آنتی بیوتیک بر حسب میلی متر با استفاده از خط کش اندازه گیری شد (۱۰).

تعیین حداقل غلظت مهارتی و حداقل غلظت کشندگی به روش

میکروداپلوشن: روش میکروداپلوشن جهت بررسی اثر عوامل ضد میکروبی از میکروپلیت های ۹۶ چاهکی استفاده می شود که هر یک از این چاهک ها با ترکیبی از محیط کشت، ماده ی ضد میکروبی و سوپانسیون میکروبی پر می شوند. در این آزمایش اثر مهارکنندگی

همین خواص نیز باعث شده که توجه محققین به سمت این میوه برای تولید داروهای جدیدی به منظور غلبه بر افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی و اثرات نامطلوب آن بر سلامت انسان جلب شود (۴).

امروزه با پیشرفت در علم و فناوری، مصرف دوزهای دارویی از ترکیبات و قرص های ساده به سیستم های بسیار پیشرفته که به عنوان سیستم های جدید انتقال دارو شناخته می شوند، تکامل یافته است. در سیستم های دارورسانی، هدف، افزایش اثر درمانی و کاهش سمیت دارو است (۵). نانوامولسیون ها از سیستم های جدید این نوع دارورسانی هستند که همانند امولسیون، مخلوطی از دو یا چند نوع مایع غیر قابل امتزاج بوده که یکی از آن ها به شکل قطراتی کوچک در دیگری توزیع شده است. با این حال، اندازه ی قطره نانوامولسیون ها یکنواخت تر و بسیار کوچک در محدوده ی ۱۰-۱۰۰۰ نانومتر می باشد و از نظر سینتیکی هم پایدارتر از آن ها است (۶). این مواد می توانند در حل یکی از مشکل بزرگ اکثریت داروها به نام آبرگری کمک کننده باشند. این مشکل منجر به کاهش حلالیت دارو و افت مقدار در دسترس بودن در بدن و در نهایت کاهش اثرات درمانی می شود. تمامی این خواص منحصر به فرد نانوامولسیون ها باعث شده که این روش یکی از امیدبخش ترین ساختارها برای بهبود حلالیت و افزایش ارزش زیستی و عملکردی ترکیبات، بخصوص ترکیبات آب گریز شوند (۷).

بنابراین با توجه به ضرورت یافتن داروهای جدید برای غلبه بر محدودیت های داروهای موجود و همچنین، اثبات اثرگذاری و اقبال گسترده ی مردم به داروهای گیاهی و لزوم استفاده از علوم جدید برای افزایش کارایی و بهره بروری آن ها در درمان ها، این مطالعه به منظور تولید نانوامولسیون هایی از روغن مازو به عنوان یکی از داروهای گیاهی مفید و بررسی آثار آنتی اکسیدانی، آنتی باکتریالی و ضدسرطانی برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفته است.

روش ها

سنتز نانوامولسیون از روغن مازو: روغن مازو به صورت تجاری (از شرکت کیمیاگر توس، مشهد، ایران) و توئین ۸۰ (از شرکت DNAbiotech، مشهد، ایران) تهیه گردید. در این بررسی به منظور سنتز نانوامولسیون، روش امولسیون سازی با انرژی بالا با استفاده از دستگاه اولتراسونیک بود. آزمایش در سلول مخصوص التراسونیک ۲۰ کیلوهرتز و با توان ۷۵۰ وات برای ۳۰ دقیقه هموژنایز گردید که با جریان آب، دما ثابت نگه داشته می شد. برای اعمال امواج فراصوت و تولید نانوامولسیون، از دستگاه مولد امواج فراصوت استفاده شد. زمان صوت دهی متغیر است، که با استفاده از کرومومتر اندازه گیری شد. دمای مخلوط در طول مدت صوت دهی با جریان مداوم آب سرد در

۵۰۰ میکرولیتر از آن را با ۵۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH مخلوط و در نهایت سوسپانسیون‌های مذکور ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. در نهایت، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد؛ جهت تعیین درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی و توان مهار رادیکال‌های آزاد نانوذرات از رابطه‌ی ۲ استفاده شد (۱۳).

$$(۲) \quad \text{نمونه جذب DPPH} - \text{جذب DPPH} = \frac{\text{درصد جذب رادیکال}}{\text{جذب DPPH}} \times ۱۰۰$$

بررسی اثرات سمیت نانوامولسیون روغن مازو بر علیه سلول‌های

سرطانی: برای این کار، ابتدا در هر یک از چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه‌ای، 5×10^3 سلول سرطانی پروستات رده‌ی PC3 و سلول فیبروبلاست پوست رده‌ی HFF کشت داده شد. محیط کشت مورد استفاده برای این سلول‌ها نیز به ترتیب RPMI1640 و DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنیسیلین/استرپتومایسین بوده است. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها، محیط رویی با محیط جدید حاوی غلظت‌های مختلف نانوامولسیون سنتز شده از روغن مازو جایگزین و در سه پلیت مجزا، برای ۲۴ ساعت در شرایط کشت دوباره نگهداری شدند. هر غلظت از نانوامولسیون سنتز شده نیز در سه چاهک برای تکرار انجام شد. بعد از گذشت این زمان، پلیت‌ها از انکوباتور خارج و به هر چاهک ۲۵ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۴ میکروگرم/میلی‌لیتر افزوده شد. سپس پلیت‌ها مجدداً به انکوباتور بازگردانده شدند و بعد از چهار ساعت با تخلیه‌ی محیط و افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO میزان رنگ تولیدی که بیانگر میزان بقای سلولی است، توسط دستگاه الیزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. میزان بقای سلول‌ها نیز از رابطه ۳ به دست می‌آید (۱۴).

$$(۳) \quad \text{میانگین جذب نوری خانه های هر غلظت} \times 100 = \frac{\text{درصد بقای سلولی}}{\text{میانگین جذب نوری خانه های کنترل}}$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها: نتایج بقای سلولی وارد نرم‌افزار SPSS

نسخه‌ی ۲۶ (version 26, IBM Corporation, Armonk, NY) شد و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه برای سنجش آن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. سطح اطمینان ۵ درصد برای این محاسبات در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مشخصه‌یابی نانوامولسیون روغن مازو: بر اساس نتایج حاصل از آنالیز پراکندگی نور پویا، اندازه‌ی متوسط نانوامولسیون روغن مازو بر اساس تعداد ۵۸ نانومتر اندازه‌گیری شد (شکل ۱).

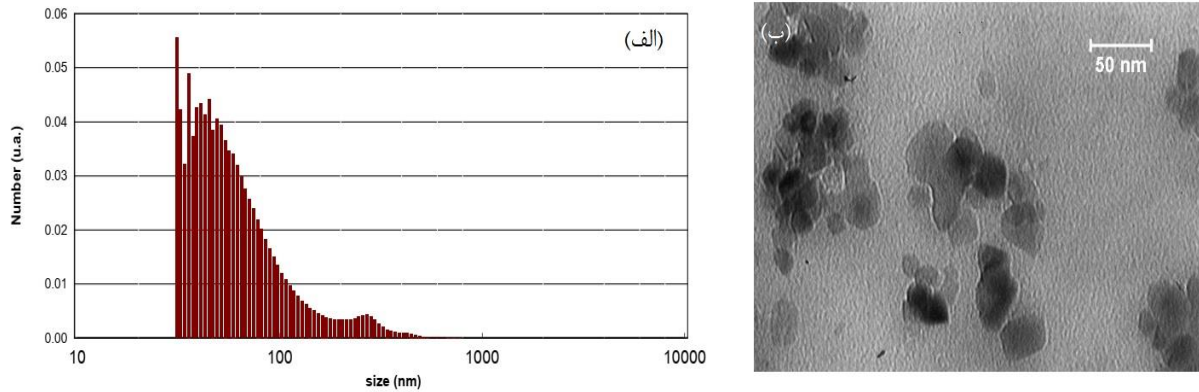
غلظت‌های مختلف نانوامولسیون روغن مازو بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و میکروکوکوس لوتوس در زمان صفر و ۲۴ ساعت به کمک روش میکرودیالوژن و در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی بعد از گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد برای هر دو باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۱). برای این کار، از کشت تازه‌ی پاتوژن‌های کوکسی گرم مثبت در محیط آبگوشت تریپتوز سوی برات کدورتی معادل نیم مک‌فارلند تهیه گردید و به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد (تا کدورتی معادل 10^6 باکتری به دست آید). از نانوامولسیون روغن مازو در غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محیط برات استفاده شد. نهایتاً، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف نانوامولسیون روغن مازو که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری است، ریخته شد و میکروپلیت‌ها بعد از تلفیح میکروبی در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. همچنین چاهک‌هایی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط برات به عنوان کنترل منفی و چاهک‌هایی حاوی محیط کشت و باکتری به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. پس از انکوباسیون، اولین چاهکی که در آن رشدی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکننده رشد در نظر گرفته شد. از این رقت و رقت‌های بالاتر، ۱۰ میکرولیتر روی محیط کشت نوترینت آگار برده شد، رقتی که در آن رشدی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشنده رشد در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که هر آزمایش سه بار تکرار گردید و به منظور انجام محاسبات از میانگین آن‌ها استفاده شد.

جذب و خوانش میکروپلیت‌ها قبل از گرماگذاری و ۲۴ ساعت بعد از گرماگذاری توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر انجام شد. بعد از تعیین جذب چاهک‌ها درصد مهار رشد باکتری‌های مورد آزمایش در این تحقیق توسط نانوامولسیون روغن مازو مورد آزمایش به کمک رابطه‌ی ۱ محاسبه شد (۱۲) که در این رابطه O جذب کنترل مثبت در ساعت ۲۴ منهای E جذب در قبل از گرماگذاری و جذب نمونه حاوی ماده‌ی سنتزی و باکتری در ساعت ۲۴ منهای جذب در ساعت صفر می‌باشد.

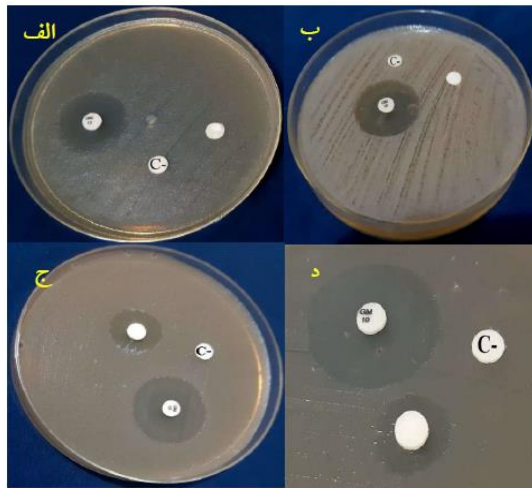
$$(۱) \quad \text{رشد درصد مهار} = \frac{O-E}{O} \times 100$$

بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون روغن مازو به روش

DPPH: به منظور بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال آزاد DPPH توسط نانوامولسیون روغن مازو سنتز شده، در این آزمایش از BHA به عنوان یک آنتی‌اکسیدان استاندارد (کنترل مثبت) استفاده شد؛ برای این منظور، ابتدا یک میلی‌گرم DPPH را در ۹/۱۶ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد حل شد. سپس غلظت‌های متفاوت ۵، ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوامولسیون تهیه و میزان



شکل ۱. شناسایی خصوصیات نانوامولسیون روغن مازو تهیه شده؛ الف: نتایج حاصل از اندازه گیری اندازه نانوذرات سنتز شده با استفاده از آنالیز پراکندگی نور پویا، ب: نمایی از مورفولوژی نانوذرات سنتز شده با استفاده از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی



شکل ۲. قطر هاله عدم رشد در حضور نانوامولسیون روغن مازو: الف) اشرشیا کلی (ب) کلبسیلا پنومونیه (ج) استافیلوکوکوس ارتوس (د) میکروکوکوس لوتئوس. نانوامولسیون روغن مازو در غلظت ۱ میلی گرم / میلی لیتر می تواند رشد پاتوژن های گرم مثبت استافیلوکوکوس ارتوس و میکروکوکوس لوتئوس را مهار کند ولی علیه باکتری های گرم منفی اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه فاقد خاصیت مهارکنندگی می باشد.

تست حداقل غلظت مهارکننده رشد نیز به روش میکروداپلوشن انجام گرفت که براین اساس، حداقل غلظت مهارکننده رشد برای دو سویه استافیلوکوکوس ارتوس و میکروکوکوس لوتئوس به ترتیب ۰/۵ و ۱ میلی گرم / میلی لیتر و حداقل غلظت کشنده نیز به ترتیب ۱ و ۱/۵ میلی گرم / میلی لیتر است. با توجه به اینکه نانوامولسیون روغن مازو علیه سویه های اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه فاقد خاصیت مهارکنندگی رشد است، بنابراین حداقل میزان مهارکنندگی برای این دو سویه گرم منفی تعیین نشد.

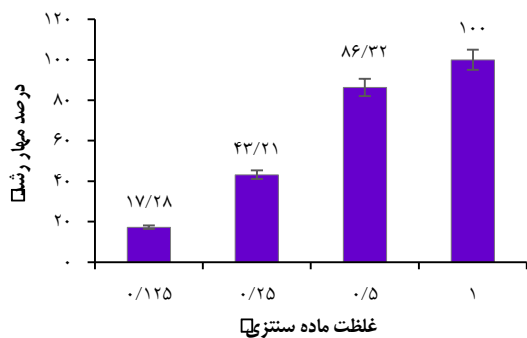
پتانسیل زتا که به عنوان یک مؤلفه ی مهم جهت پیش بینی پایداری نانوذرات به کار گرفته شده نیز برای نانوامولسیون روغن مازو حدود ۳۳/۵۸- میلی ولت ارزیابی شد که نمایانگر پایداری نانوامولسیون است. بطور کلی اغلب نانوامولسیون ها دارای اندازه های کمتر از ۳۰۰ نانومتر هستند، که اندازه ی مناسبی جهت انجام مطالعات زیستی می باشند. با توجه به این که میزان PDI کم تر از ۰/۵- نشان دهنده ی پراکندگی تک فاز می باشد به این ترتیب می توان به پراکندگی یکنواخت نانوامولسیون سنتز شده اشاره نمود. پتانسیل زتا سطح نانوامولسیون روغن مازو ۳۳- گزارش گردید. طبق گفته های Salopek و همکاران قرارگیری پتانسیل زتا نانوامولسیون در محدوده ی ۳۰- تا ۱۶- منعکس کننده ی ثبات نانوامولسیون می باشد (۱۵). بنابراین می توان گفت نانوامولسیون تهیه شده از روغن مازو در نزدیک به محدوده ی پایداری قرار دارد. طبق تصاویر آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری گرفته شده، مورفولوژی نانوامولسیون روغن مازو یکنواخت و تقریباً کروی می باشد (شکل ۲).

بررسی خاصیت آنتی باکتریایی نانوامولسیون روغن مازو: برای ارزیابی خصوصیات آنتی باکتریال نانوامولسیون روغن مازو به روش کربی-بائر عمل شد؛ بنابر نتایج حاصله مشخص شد که نانوامولسیون روغن مازو در غلظت ۱ میلی گرم / میلی لیتر می تواند رشد پاتوژن های گرم مثبت استافیلوکوکوس ارتوس و میکروکوکوس لوتئوس را مهار کند ولی علیه باکتری های گرم منفی اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه فاقد خاصیت مهارکنندگی می باشد. قطر هاله های عدم رشد برای باکتری های استافیلوکوکوس ارتوس و میکروکوکوس لوتئوس به ترتیب ۱۹ و ۱۵ میلی متر اندازه گیری شد. همچنین دیسک جنتامایسین (کنترل مثبت) استفاده شده نیز موجب مهار هر ۴ پاتوژن شده که نشان دهنده ی صحت انجام تست دیسک دیفیوژن می باشد.

جدول ۱. نتایج حاصل از دیسک دیفیوژن، و مقادیر MIC و MBC

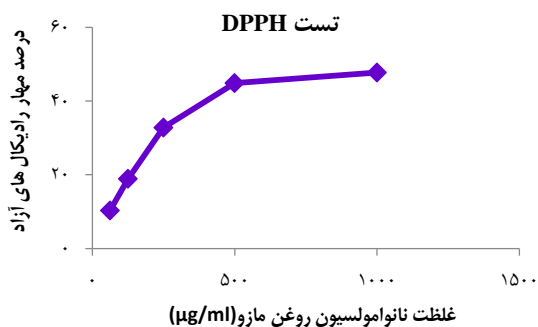
آزمایش	ماده	اشرشیاکلی	کلبسیلا پنومونه	استافیلوک ائوروس	میکروکوس لوتنوس
قطر هاله‌ی عدم رشد در روش دیسک دیفیوژن (میلی‌متر)	نانوامولسیون جنتامایسین	غیر قابل تشخیص ۲۴ ± ۰/۱	غیر قابل تشخیص ۲۵ ± ۰/۱	۱۹ ± ۰/۱	۱۵ ± ۰/۱
MIC	نانوامولسیون (میلی‌گرم/میلی‌لیتر) کلرامفنیکل (میکروگرم/میلی‌لیتر)	غیر قابل تشخیص ۱۰۰ ± ۰/۰	غیر قابل تشخیص ۱۰۰ ± ۰/۰	۰/۵ ± ۰/۰	۱ ± ۰/۰
MBC	نانوامولسیون (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)	غیر قابل تشخیص	غیر قابل تشخیص	۰/۵ ± ۰/۰	۲ ± ۰/۰

شد که حدود ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد در این غلظت مهار شده‌اند.



شکل ۴. درصد مهار رشد میکروکوکوس لوتنوس توسط نانوامولسیون سنتز شده با روش میکروداپلوشن

نتایج آنالیز واریانس نیز بیانگر این نکته است که نانوامولسیون روغن مازو به طرز معنی‌داری تولید رادیکال‌های آزاد DPPH را مهار می‌کند.



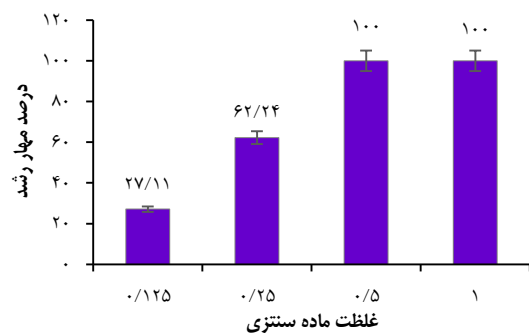
شکل ۵. تعیین میزان مهار رادیکال‌های آزاد توسط نانوامولسیون‌های روغن مازو در غلظت‌های مختلف

سمیت سلولی نانوامولسیون روغن مازو علیه سلول‌های سرطانی:

نتایج ارزیابی تست MTT بر روی سلول‌های سرطانی و سالم نشان می‌دهد که افزایش غلظت نانوامولسیون روغن مازو موجب کاهش بقای رده‌های سلول سرطانی پروستات و فیبروبلاست پوستی می‌شود. با این حال، نانوامولسیون روغن مازو در غلظت‌های ۱۰۰ و

نتایج تعیین حداقل غلظت کشنده‌ی نانوامولسیون روغن مازو برای دو سویه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس و میکروکوکوس لوتنوس به ترتیب ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد (جدول ۱).

شکل ۳، درصد مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس و میکروکوکوس لوتنوس توسط نانوامولسیون روغن مازو با روش میکروداپلوشن را نشان می‌دهد. نانوامولسیون روغن مازو در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و ۱ رشد استافیلوکوکوس اورئوس را ۱۰۰ درصد مهار کرده است. درحالی‌که نانوامولسیون روغن مازو در غلظت ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر رشد میکروکوکوس را ۱۰۰ درصد مهار کرده است. در شکل ۴ نیز می‌توان دریافت که آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و ۰/۳ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به ترتیب رشد استافیلوکوکوس اورئوس و میکروکوکوس لوتنوس را ۱۰۰ درصد مهار کرد.



شکل ۳. درصد مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس توسط نانوامولسیون سنتز شده با روش میکروداپلوشن

بررسی قدرت نانوامولسیون روغن مازو در مهار رادیکال

DPPH نتایج این مطالعه نشان‌دهنده‌ی مهار رادیکال DPPH توسط نانوامولسیون روغن مازو است. مهار رادیکال DPPH توسط نانوامولسیون روغن مازو به صورت وابسته به غلظت می‌باشد؛ به طوری که با افزایش غلظت نانوامولسیون، مهار رادیکال DPPH نیز افزایش می‌یابد (شکل ۵). میزان مهار رادیکال‌های آزاد (IC_{50}) نانوامولسیون روغن مازو تقریباً ۵۸ میکروگرم/میلی‌لیتر اندازه‌گیری

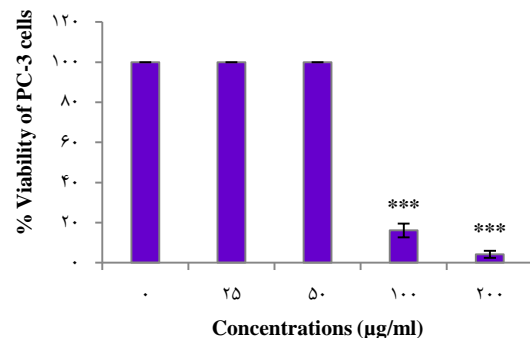
با کمترین اندازه‌ی ذرات، و در عین حال بیشترین شاخص پایداری امولسیون می‌شود (۱۸). در همین راستا، در مطالعه‌ی مشابه، نجفی و همکاران با استفاده از توئین ۸۰ و امواج فراصوت نانوامولسیون آب در روغن عصاره‌ی زعفران را تولید کردند که پایداری بالایی را از خود نشان داد (۱۹). متوسط سایز نانوامولسیون روغن مازو تولید شده در مطالعه‌ی ما حدود ۵۸ نانومتر با شارژ الکتریکی منفی بود؛ بر اساس نتایج آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری مشخص شد که این مورفولوژی این نانوذرات به صورت کروی، همگن و یکنواخت بود. بنابراین می‌توان اینچنین ارزیابی کرد که روش تولید نانوامولسیون به کار گرفته شده در این مطالعه یکی از بهترین روش‌ها برای تولید نانوذرات با کمترین اندازه و پایداری بالا می‌باشد.

بر اساس مطالعات موجود، تانیک اسید، یکی از مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌باکتریال موجود در روغن مازو می‌باشد؛ تانیک اسید از طریق لیز غشای سلول و اتصال و ایجاد کمپلکس با دیواره‌ی باکتری و همچنین غیر فعال‌سازی آنزیم‌های باکتریایی می‌توانند منجر به کاهش رشد باکتری‌ها شوند (۲۰).

فاتحی و همکاران نشان دادند که حداقل میزان مهارکنندگی رشد روغن مازو برای سویه‌های بالینی *S. aureus* حدود ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر می‌باشد (۲۱). نتایج ارزیابی خصوصیات آنتی‌باکتریال نانوامولسیون روغن مازو در مطالعه‌ی حاضر بیانگر این بود که این ماده دارای خاصیت ضد باکتریایی بوده و توانایی محدود کردن رشد باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Micrococcus luteus* را دارد؛ به هر حال، نانوامولسیون روغن مازو نتوانست رشد دو پاتوژن گرم منفی باکتری *Shigella flexneri* و *Escherichia coli* را مهار کند. زارعی یزدلی و همکاران در مطالعه‌ی مشابه در رابطه با اثرات ضد باکتریایی روغن مازو متوجه شدند که روغن گال مازو مهار رشد باکتری *Staphylococcus aureus* در روش انتشار از دیسک و براث میکرودیالوژن می‌شود (۲۲). بر اساس مطالعه‌ی ما، میزان (MIC) Minimal inhibitory concentration و (MBC) Minimal bactericidal concentration برای دو باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Micrococcus luteus* به ترتیب برابر با ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. این میزان نسبت به مطالعات مشابه قبلی که حداقل میزان مهارکنندگی رشد عصاره‌ی مازو علیه طیفی از پاتوژن‌های گرم مثبت و منفی به خصوص *Staphylococcus aureus* را بیش از ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کرده بودند، بسیار امیدوارکننده‌تر بود (۲۲، ۲۳).

از دلایل عدم تأثیر نانوامولسیون روغن مازو بر کاهش رشد دو باکتری *Shigella flexneri* و *Escherichia coli* می‌توان به دلیل تفاوت حساسیت باکتری‌های گوناگون به مواد ضد میکروبی به علت ساختار

۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر موجب کاهش معنی‌داری در رشد سلول‌های سرطانی پروستات می‌شوند (شکل ۶)؛ در حالیکه نانوامولسیون ما در غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر قادر است به طرز معنی‌داری رشد فیروبلاست پستی را مهار کند. بنابراین می‌توان انتظار داشت، نانوامولسیون روغن مازو علاوه بر خاصیت ضد سرطانی در عین حال میزان کشندگی ناچیزی بر روی رده‌های سلولی نرمال داشته باشد.



شکل ۶. تعیین اثر سمیت نانوامولسیون‌های روغن مازو در غلظت‌های مختلف بر علیه سلول‌های سرطانی پروستات رده PC-۳

بحث

گیاه مازو به دلیل میزان بالایی ترکیبات فنولیک، تانن و فلاونوئید دارای خواص درمانی از قبیل ضد حساسیت، ضد التهاب، ضد میکروبی و ضد سرطان می‌باشد (۱۶). به هر حال، این ترکیبات هیدروفوب بوده و به دلیل کاهش حلالیت و پایین بودن سطح فراهمی زیستی (Bioavailability) استفاده‌ی بالینی محدودی دارند (۱۷). نانوامولسیون‌ها به دلیل اندازه‌ی ذرات و ویژگی‌های منحصر به فرد، موجب افزایش حلالیت و پایداری این ترکیبات می‌شوند (۵). در مطالعه‌ی حاضر، خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد سرطانی نانوامولسیون روغن مازو مورد ارزیابی قرار گرفت. در مطالعه‌ی حاضر، نانوامولسیون روغن مازو به روش اولتراسونیکاسیون مخلوط روغن مازو با توئین ۸۰ و آب مقطر سنتز شد. مطالعات محدودی خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد سرطانی ترکیبات موجود در روغن مازو مورد ارزیابی قرار داده‌اند؛ بنابراین، ما برای اولین بار، در مطالعه‌ی حاضر نشان دادیم که نانوامولسیون روغن مازو در شرایط آزمایشگاهی، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی قابل قبولی دارد؛ همچنین، این نانوامولسیون قادر است رشد پاتوژن‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و *Micrococcus luteus* را مهار کند. مطالعه‌ی قادرمزی و همکاران نشان داد که استفاده از سورفاکتانت مناسب و حمام اولتراسونیک منجر به تولید نانوامولسیون

نشان داده شده بود (۲۳). روغن مازو بدلیل در برداشتن ترکیباتی از قبیل تانن ها، آلکالوئیدها، گلیکوزید، ساپونین، تریپنئید، فلاونوئید و ترکیبات فلونیک خواص ضد سرطانی دارد (۴، ۲۹). نکته‌ی قابل توجه در مطالعه‌ی ما این بود که میزان IC_{50} نانوامولسیون روغن مازو برای فیروبلاست‌های نرمال پوست به طرز معنی‌داری بیشتر از سلول‌های سرطان پروستات بود؛ در این رابطه Abdullah و Yusof نشان دادند که عطرمایه‌ی مازو، خاصیت سایتوتوکسیسیته‌ی انتخابی دارند و میزان سمیت آن بر سلول سرطانی کبد بیشتر از فیروبلاست‌های نرمال است (۳۰).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر بیانگر وجود درجاتی از خواص آنتی‌اکسیدانتی، آنتی‌باکتریال علیه باکتری‌های گرم مثبت و ضد سرطانی نانوامولسیون روغن مازو می‌باشد. این مطالعه به عنوان نقطه‌ی شروعی برای تحقیقات بیشتر در رابطه با تأثیر نانوامولسیون روغن مازو و سایر گیاهان مشابه دارای ترکیبات زیستی سودمند، برای اهداف درمانی در نظر گرفته شود. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشانگر پتانسیل بالقوه‌ی نانوامولسیون روغن مازو برای تبدیل شدن به یک استراتژی درمانی برای بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو و همچنین سرطان در آینده می‌باشد؛ همچنین پیشنهاد می‌شود به منظور بررسی سمیت مؤثر، اثر نانوامولسیون روغن مازو بر روی سایر رده‌های سلول‌های سرطانی و نیز مطالعات حیوانی مورد پژوهش و ارزیابی بیشتر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی / پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۱۶۲۴۷۳۹۱۸ رشته بیوشیمی می‌باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد به تصویب رسیده و با حمایت مالی معاونت پژوهشی به انجام رسیده است. بدینوسیله از زحمات معاونت پژوهشی و کارکنان آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد تقدیر و تشکر می‌شود.

متفاوت دیواره‌ی سلولی میکروارگانیسم‌ها نام برد (۲۴). باکتری‌های گرم منفی از قبیل *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* دارای غشای خارجی بوده که به مانند سدی از نفوذ مولکول‌ها آب‌گریز خارجی می‌تواند جلوگیری کند؛ همچنین این باکتری‌های گرم منفی دارای آنزیم‌هایی در فضای پری پلاسمیک بوده قادرند مولکول‌های خارجی را تجزیه کنند (۲۴). مشابه یافته‌های ما، Basri و Fan نیز متوجه شدند که عطرمایه‌ی مازو، بیشترین تأثیر را بر باکتری گرم مثبت *اسافیلوکوکوس اورئوس* داشته در حالیکه هیچ ناحیه‌ی مهار رشدی برای باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* طی آزمایش انتشار از دیسک مشاهده نکردند (۲۵). با توجه به مطالب گفته شده، به نظر می‌رسد نانوامولسیون روغن مازو علیه باکتری‌های گرم مثبت درجاتی از خواص ضد میکروبی داشته باشد ولی برای تأیید قطعی، نیازمند طراحی مطالعات بیشتر و بهتری هستیم.

بر اساس مطالعات پیشین، عصاره‌ی مازو دارای ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد؛ اثرات آنتی‌اکسیدانتی نانوامولسیون روغن مازو می‌تواند به دلیل حضور ترکیبات زیاد پلی‌فنول‌هایی از قبیل تانیک اسید و گالیک اسید باشند. ترکیبات پلی‌فنولی، توانایی خنثی کردن رادیکال آزاد DPPH، ABTS، هیدروژن پروکساید و رادیکال هیدروکسیل را دارند (۲۶، ۲۷). نتایج بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانتی نانوامولسیون روغن مازو در مطالعه‌ی ما نشان داد که این نانوامولسیون، توانایی خنثی کردن رادیکال‌های آزاد شده از DPPH را دارا می‌باشد. بنابر شواهد موجود، نانوامولسیفایر کردن ترکیبات گیاهی موجب حفظ پایداری و قدرت آنتی‌اکسیدانتی این ترکیبات خواهد شد؛ در همین راستا مطالعات اخیر نشان دادند که نانوامولسیون‌های روغن کرچک و روغن دانه‌ی آلبالو، قدرت آنتی‌اکسیدانتی این ترکیبات را در مقایسه با فرم طبیعی‌شان به طرز معنی‌داری افزایش می‌دهد (۲۶، ۲۸).

در مطالعه‌ی حاضر نشان دادیم که نانوامولسیون روغن مازو توانسته با موفقیت، میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی پروستات را کاهش دهد؛ در مطالعات پیشین نیز خواص ضد سرطانی عصاره‌ی مازو برای کاهش بقای رده‌های سلولی سرطان سرویکس و کولون

References

1. Baydoun S, Chalak L, Dalleh H, Arnold N. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in traditional medicine by the communities of Mount Hermon, Lebanon. *J Ethnopharmacol* 2015; 173: 139-56.
2. Lavari N, Ghasemi M, Nabipour I. Ethnopharmacology of medicinal plants in the Southwest of Mond Mountain [in Persian]. *Iran South Med J* 2017; 20(4): 380-98.
3. Naim M, Begum W, Shakoor F. *Quercus infectoria* (Mazu): a review. *World J Pharm Res* 2017; 6: 176-85.
4. Elham A, Arken M, Kalimanjan G, Arkin A, Iminjan M. A review of the phytochemical, pharmacological, pharmacokinetic, and toxicological evaluation of *Quercus Infectoria* galls. *J Ethnopharmacol* 2021; 273: 113592.
5. Kumar M, Bishnoi RS, Shukla AK, Jain CP. Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: a review. *Prev Nutr food Sci* 2019; 24(3): 225-34.
6. Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*

- 2015; 5(2): 123-7.
7. Rehman FU, Shah KU, Shah SU, Khan IU, Khan GM, Khan A. From nanoemulsions to self-nanoemulsions, with recent advances in self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS). *Expert Opin Drug Deliv* 2017; 14(11): 1325-40.
 8. Osanloo M, Amani A, Sereshti H, Abai MR, Esmaeili F, Sedaghat MM. Preparation and optimization nanoemulsion of Tarragon (*Artemisia dracunculus*) essential oil as effective herbal larvicide against *Anopheles stephensi*. *Ind Crops Prod* 2017; 109: 214-9.
 9. Weinstein MP, Lewis JS, Bobenchik AM, Campeau S, Cullen SK, Galas MF, et al. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-Fourth Informational Supplement, CLSI document M100-S24. CLSI Wayne; 2014.
 10. Seibert JB, Bautista-Silva JP, Amparo TR, Petit A, Pervier P, dos Santos Almeida JC, et al. Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. *Food Chem* 2019; 287: 61-7.
 11. Shanmugapriya K, Kim H, Saravana PS, Chun BS, Kang HW. Astaxanthin-alpha tocopherol nanoemulsion formulation by emulsification methods: Investigation on anticancer, wound healing, and antibacterial effects. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2018; 172: 170-9.
 12. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40(2): 175-9.
 13. Tomankova K, Kolarova H, Kolar P, Kejlova K, Jirova D. Study of cytotoxic effect of photodynamically and sonodynamically activated sensitizers in vitro. *Toxicol In Vitro* 2009; 23(8): 1465-71.
 14. Shanei A, Akbari-Zadeh H, Attaran N, Salamat MR, Baradaran-Ghahfarokhi M. Effect of targeted gold nanoparticles size on acoustic cavitation: An in vitro study on melanoma cells. *Ultrasonics* 2019; 102: 106061.
 15. Salopek B, Krasic D, Filipovic S. Measurement and application of zeta-potential. *Rud Geolosko Naft Zb* 1992; 4(1): 147-51.
 16. Popović BM, Štajner D, Ždero R, Orlović S, Galić Z. Antioxidant characterization of oak extracts combining spectrophotometric assays and chemometrics. *ScientificWorldJournal* 2013; 2013: 34656.
 17. Tan CP, Nakajima M. β -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chem* 2005; 92(4): 661-71.
 18. Ghadermazi R, Khosrowshahi Asl A, Azizi MH, Tamjidi F. Investigation of ultrasonic bath, surfactant to oil ratio and quince seed mucilage concentration effect on spontaneous nanoemulsion properties [in Persian]. *Innov Food Technol* 2019; 6(4): 533-47.
 19. Najaf Najafi M, Nemati S, Mohammadi Sani A, Kakhodaee R. Evaluation of physical properties and stability of water-in-oil-nanoemulsions containing saffron extract [in Persian]. *Technol Med Aromat Plants Iran* 2020; 2(2): 12-24.
 20. Farha AK, Yang QQ, Kim G, Li HB, Zhu F, Liu HY, et al. Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Biosci* 2020; 38: 100751.
 21. Fatehi S, Mohammadi Sichani M, Tavakoli M. Evaluation of antimicrobial and anti-quorum sensing activity of Mazouj and Ghalghaf galls extracts of oak against *Pseudomonas aeruginosa* [in Persian]. *Qom Univ Med Sci J*. 2018; 12(10): 36-45.
 22. Zarei-Yazdeli M, Seyed Ebrahimi SA, Alipanah H, Noori M. Evaluation of antibacterial activity of ethanoloic and methanoloic extracts of *Dracocephalum kotschy* and Mazouj galls [in Persian]. *Feyz* 2020; 24(3): 293-301.
 23. Darogha SN. Antibacterial activity of *Quercus infectoria* extracts against bacterial isolated from wound infection. *J Kirkuk Univ Sci Stud* 2009; 4(1): 20-30.
 24. Schleifer KH, Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* 1972; 36(4): 407-77.
 25. Basri DF, Fan SH. The potential of aqueous and acetone extracts of galls of *Quercus infectoria* as antibacterial agents. *Indian J Pharmacol* 2005; 37(1): 26-9.
 26. Kaur G, Athar M, Alam MS. *Quercus infectoria* galls possess antioxidant activity and abrogates oxidative stress-induced functional alterations in murine macrophages. *Chem Biol Interact* 2008; 171(3): 272-82.
 27. Hasmida MN, Nur Syukriah AR, Liza MS, Mohd Azizi CY. Effect of different extraction techniques on total phenolic content and antioxidant activity of *Quercus infectoria* galls. *Int Food Res J*. 2014; 21(3): 1075-9.
 28. Homayouni Tabrizi M, Darchin Maragheh A, Karimi E. Evaluation of antioxidant and cytotoxic effects of nanoemulsion of sour cherry kernel oil on A549 lung cancer and HUVEC normal cells [in Persian]. *Jundishapur Sci Med J*. 2019; 18(1): 71-9.
 29. Ohiagu FO, Chikezie PC, Chikezie CM, Enyoh CE. Anticancer activity of Nigerian medicinal plants: a review. *Futur J Pharm Sci* 2021; 7(1): 1-21.
 30. Yusof WNSW, Abdullah H. Phytochemicals and cytotoxicity of *Quercus infectoria* ethyl acetate extracts on human cancer cells. *Trop life Sci Res* 2020; 31(1): 69-84.

The Antioxidant, Antibacterial, and Anti-Cancer Properties of Nanoemulsions Synthesized from Mazu Oil

Mohammadmahdi Ebadi¹, Masoud Homayouni Tabrizi², Ali Es-haghi²

Original Article

Abstract

Background: This study was conducted to investigate the antioxidant, antibacterial, and anticancer effects of Mazu oil as an important medicinal plant in traditional medicine, which was synthesized by the nanoemulsion method as a new method in medicine.

Methods: The antioxidant activity of Mazu oil nanoemulsion was investigated by DPPH radical inhibitory activity assay and its antimicrobial properties on four Gram-positive pathogenic bacteria, including *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, and Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* were assed by disk diffusion method. To determine the minimum growth inhibitory and growth killer concentration the microbroth dilution method was used. In addition, the anticancer properties of Mazu oil nanoemulsion on prostate cancer cells were investigated by MTT method and the results were compared with normal skin fibroblast cells.

Findings: Based on the disc diffusion results, the nanoemulsion of Mazu oil has inhibitory power only against gram-positive pathogens *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*, while gram-negative bacteria were resistant to this compound. Mazu oil nanoemulsion has acceptable antioxidant properties and the free radical inhibition rate (IC₅₀) was measured by the DPPH method to be about 58.905 µg/ml. The toxicity test also shows the significant effect of Mazu oil nanoemulsion in destroying prostate cancer cells compared to normal skin fibroblast cells.

Conclusion: The present study shows that the nanoemulsion of Mazu oil in vitro has relative degrees of antioxidant, anticancer, and antibacterial properties against Gram-positive pathogens, which can be helpful in food products.

Keywords: Plant extract; Nanoparticles; Antioxidant; Anti-bacterial agents; Prostate cancer

Citation: Ebadi M, Homayouni Tabrizi M, Es-haghi A. **The Antioxidant, Antibacterial, and Anti-Cancer Properties of Nanoemulsions Synthesized from Mazu Oil.** J Isfahan Med Sch 2023; 41(724): 479-87.

1- MSc, Department of Biology, School of Basic Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

2- Associate Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Corresponding Author: Ali Es-haghi, Associate Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran; Email: ashaghi@gmail.com