

بررسی اثرات ضد میکروبی و برآورد پتانسیل ضد سرطانی نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصاره زوفا بر روی رده‌های سلولی مختلف (MCF-7، A549، و Hela)

ریحانه سزازی همانکوه^۱، شبنم شمعی^{۲*}

۱- کارشناسی ارشد، گروه شیمی، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران.
۲- استادیار، گروه شیمی، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران.

E-mail: shabnamshamaie@gmail.com-09168596860

چکیده

روش‌های نوین متعددی در حال توسعه یا بهبود هستند تا خصوصیات فیزیکی-شیمیایی نانوذرات را افزایش دهند. در برخی روش‌ها فرآیند سنتز به نحوی اصلاح شده تا خصوصیات نوری، مکانیکی، فیزیکی، شیمیایی و زیستی آنها افزایش یابد. بیوسنتز نانوذرات فلزی با استفاده از ترکیبات زیستی از دستاوردهای مهمی است که در تولید انواع مختلفی از نانوذرات فلزی با ساختار و اندازه مختلف بسیار موفق بوده است. گیاهان دارویی از جمله پیش‌سازهای سازگار با محیط زیست بوده که در تولید نانوذرات کاربرد فراوانی پیدا کرده‌اند (شارما و همکاران، ۲۰۱۵). سنتز نانوذرات فلزی با استفاده از ترکیبات زیستی موجود در عصاره گیاهان دارویی، روش قابل اعتماد و دوستدار محیط زیست محسوب می‌گردد. در بین نانوذرات فلزی سنتز شده، نانوذرات نقره به دلیل دارا بودن خواص ضد میکروبی از توجه بیشتری برخوردار هستند. بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاهان، روشی سریع و مقرون به صرفه است که در این روش متابولیت‌های موجود در عصاره سبب اکسیداسیون و احیاء یون‌های نقره شده و در نهایت انواع مختلفی از نانوذرات نقره با اشکال و اندازه‌های متفاوت تولید می‌شوند (اختر و همکاران، ۲۰۱۳). کشور ایران به دلیل شرایط آب و هوایی یکی از مراکز تنوع و رشد بسیاری از گیاهان دارویی ارزشمند است. به دلیل شیوع بالای بیماری سرطان و هزینه‌های بالای درمان بیماران، استفاده از روش‌های کم هزینه و ایمن در کشور ضرور است. هدف مطالعه حاضر سنتز نانوذرات نقره به روش زیستی با استفاده از عصاره دو گیاه دارویی زوفا و بررسی اثرات ضد میکروبی و سمیت نانوذرات نقره سنتز شده بر روی سلول‌های سرطانی است

نانوذرات فلزی سنتز شده با استفاده از گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن خصوصیات فیزیکی-شیمیایی منحصر به فرد، ایمنی بالا و هزینه اندک، در مطالعات ضد سرطانی و ضد میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرند. نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه دارویی زوفا سنتز شد. پس از بررسی خصوصیات نانوذرات سنتز شده، به منظور بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده، از دو باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* و گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد. در نهایت اثر ضد سرطانی نانوذرات نقره سنتز شده بر روی ۳ ده سلول سرطانی به روش MTT ارزیابی شد. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده، کروی شکل و میانگین اندازه آنها بین ۱۵ تا ۲۶ نانومتر بود. آزمون پراش اشعه ایکس نیز سنتز موفقیت‌آمیز نانوذرات را تأیید نمود. نتایج آزمون ضد میکروبی نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده بر روی هر دو باکتری مورد مطالعه اثر ضد میکروبی معنی‌داری داشتند. اثر ضد سرطانی نانوذرات سنتز شده بر روی هر ۳ رده سلولی مشابه بود با این وجود با افزایش غلظت نانوذرات بر میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کاسته شد که نشان دهنده اثر متقابل مستقیم دوز بر میزان مهارت نانوذرات نقره بود. گیاهان دارویی می‌توانند در سنتز نانوذرات نقره مورد استفاده قرار گیرند. نانوذرات سنتز شده به دلیل دارا بودن پوششی از متابولیت‌های ثانویه و آزاد سازی یون‌های نقره (Ag^+)، می‌توانند به عنوان عوامل درمانی موثر در درمان انواع سرطان مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: نانوذره، سرطان، آنتی‌بیوتیک، متابولیت

مقدمه

در سال‌های اخیر نانوذرات به عنوان ابزار قدرتمند و پیشرفته‌ای در شناسایی و درمان بسیاری از بیماری‌های خطرناک از جمله سرطان کاربردهای فراوانی پیدا کرده است (بهار یعقوب و همکاران، ۲۰۲۰). سرطان یکی از علل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان بوده و به دلیل شیوع بالا، تحقیقات در رابطه با درمان سرطان بسیار مورد توجه است. در حال حاضر جراحی، پرتودرمانی، شیمی درمانی، ایمونوتراپی و همچنین رژیم‌های ترکیبی، اصلی‌ترین استراتژی‌های درمانی این بیماری محسوب می‌شوند. بر همین اساس توسعه روش‌های نوین درمانی و سازگار با محیط زیست، ضروری به نظر می‌رسد ضمن اینکه بایستی هزینه درمان در این روش‌های کاهش یابد (مو و همکاران، ۲۰۲۰). نانوذرات فلزی از جمله نانوذرات نقره در درمان سرطان کاربرد فراوانی پیدا کرده‌اند. نانوذرات با مهار سلول‌های سرطانی از طریق خاموش کردن ژن‌های درگیر، می‌توانند از گسترش بیماری جلوگیری نموده و در بهبود آن بسیار موثر باشند. علاوه بر این از این نانوذرات می‌توان به عنوان حامل داروهای موثر نیز استفاده نمود (شارما و همکاران، ۲۰۱۸). نانوذرات نقره می‌توانند با تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، استرس اکسیداتیو و جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های حیاتی، سبب مرگ برنامه‌ریزی شده (apoptosis) سلول‌های سرطانی شوند (اقبال و همکاران، ۲۰۲۰). در دهه گذشته پیشرفت‌های قابل توجهی در سنتز نانوذرات فلزی با ساختار و خصوصیات منحصر به فرد صورت گرفته است. اندازه و ساختارهای فضایی معین و همچنین شکل بلوری نانوذرات سنتز شده از جمله مهمترین اهداف شیمی نانوذرات است. این ویژگی‌ها سبب شده که این ذرات کاربردهای بالقوه‌ای در پزشکی پیدا کنند به طوری که از نانوذرات به عنوان حسگرهای زیستی در شناسایی و درمان بیماری‌ها مختلف مورد استفاده قرار گیرند (ین و همکاران، ۲۰۲۰). استفاده بی‌رویه و غیر اصولی از آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی، سبب شده که انواع مختلفی از پاتوژن‌های مقاوم ایجاد شوند (وانگ و همکاران، ۲۰۱۷). بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاوم شده‌اند و بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های موجود، کارایی خود را از دست داده‌اند. ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، در حال تبدیل شدن به بزرگترین چالش سلامتی بشر در دنیا است (بارانوال و همکاران، ۲۰۱۸). برای مقابله با این موضوع، مطالعات متعددی در زمینه سنتز و فرمولاسیون نانوذرات فلزی برای مقابله با انواع مختلفی از باکتری‌های بیماری‌زا انجام گرفته و یا در حال اجرا است (فرناندو و همکاران، ۲۰۱۸). در بین نانوذرات فلزی، نانوذرات نقره از خواص ضد میکروبی بسیار مناسبی برخوردار هستند. این نانوذرات با مکانیسم‌های متعدد و اثرگذاری بر دیواره سلولی و فرایندهای متابولیتی باکتری، سبب مهار آنها می‌شوند (لی و جون، ۲۰۱۹)..

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره آبی گیاه دارویی مورد مطالعه

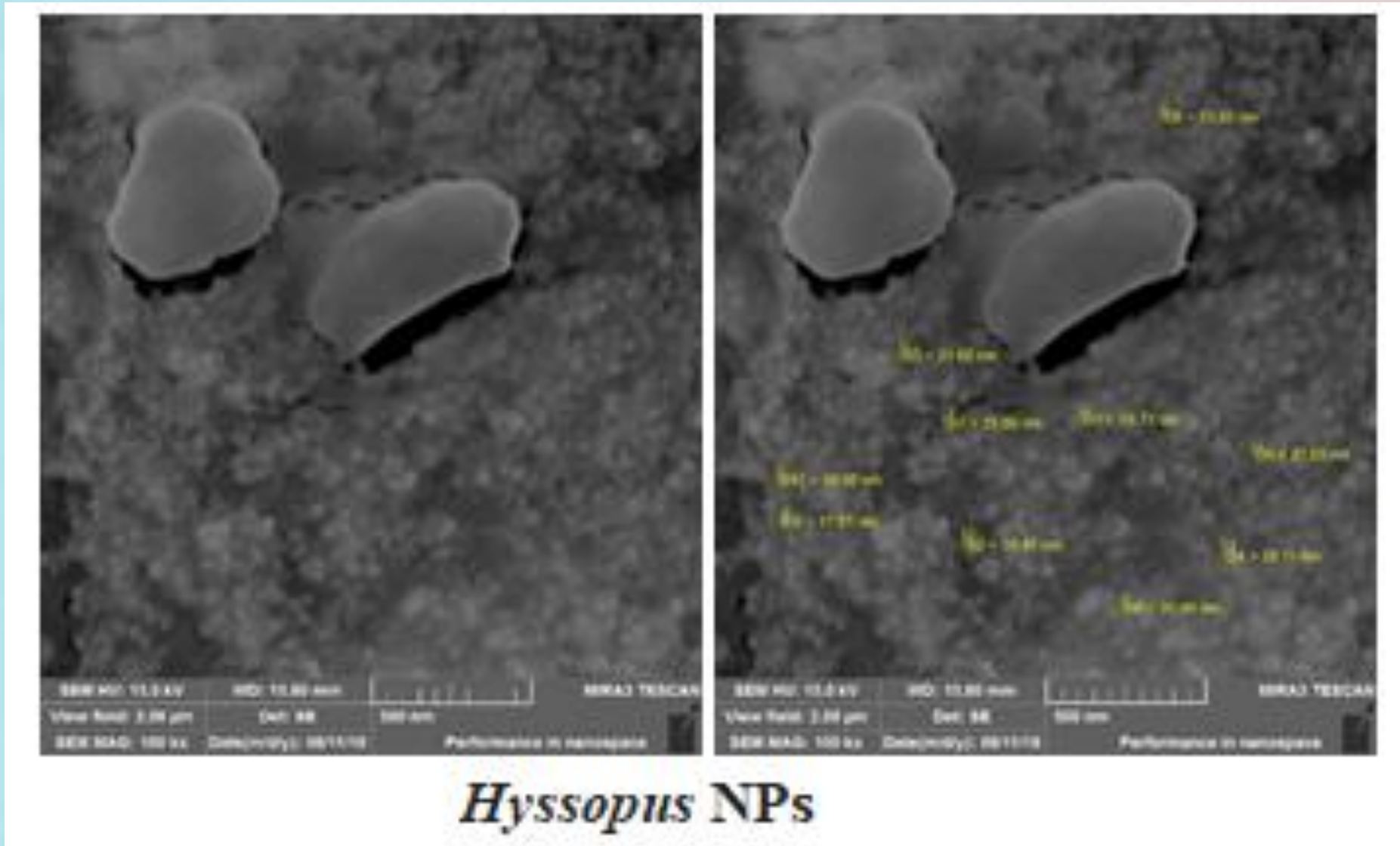
نمونه‌ی گیاهی مورد مطالعه گیاه دارویی زوفا (*Hyssopus officinalis*) از مزارع شهرستان خرم‌آباد جمع‌آوری و پس از تأیید گیاه‌شناسی مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از شستشو توسط آب مقطر در آون با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک و سپس توسط آسیاب به قطعات ریز خرد شدند. مقدار ۱۰ گرم از نمونه‌های خشک شده به ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه و به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرار داده شد. مخلوط مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. عصاره‌ی تهیه شده توسط کاغذ صافی واتمن (شماره ۲۴) دو مرتبه فیلتر و به فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و در سانتریفیوژ با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. سپس به منظور استریل نمودن عصاره تهیه شده، محلول روئی از فیلتر سرنگی (۲۲/۰ میکرونی) عبور داده شد.

بیوسنتز نانوذرات نقره

به منظور سنتز نانوذرات نقره، ابتدا مقدار ۵ میلی‌لیتر از عصاره آبی از گیاه دارویی مورد مطالعه به طور جداگانه به ۹۵ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره ۱ میلی‌مولار منتقل شد. محلول مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) بر روی شیکر قرار داده شد. سپس محلول حاوی نانوذرات نقره سنتز شده به فالکون‌های استریل ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و در سانتریفیوژ با ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. رسوب تشکیل شده با استفاده از آب مقطر دیونیزه استریل شستشو داده شد. جهت تهیه نانوذرات با غلظت معین، ابتدا محلول نانوذرات نقره سنتز شده به پتری‌دیش‌های استریل منتقل و سپس به آون با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت منتقل شد. رسوب به دست آمده با تیغ جراحی استریل از سطح پتری‌دیش جداسازی و با وزن نمودن نانوذرات نقره به دست آمده و حل نمودن آن در مقدار معینی آب مقطر استریل دیونیزه، نانوذرات با غلظت معین تهیه گردید.

ارزیابی نانوذرات سنتز شده

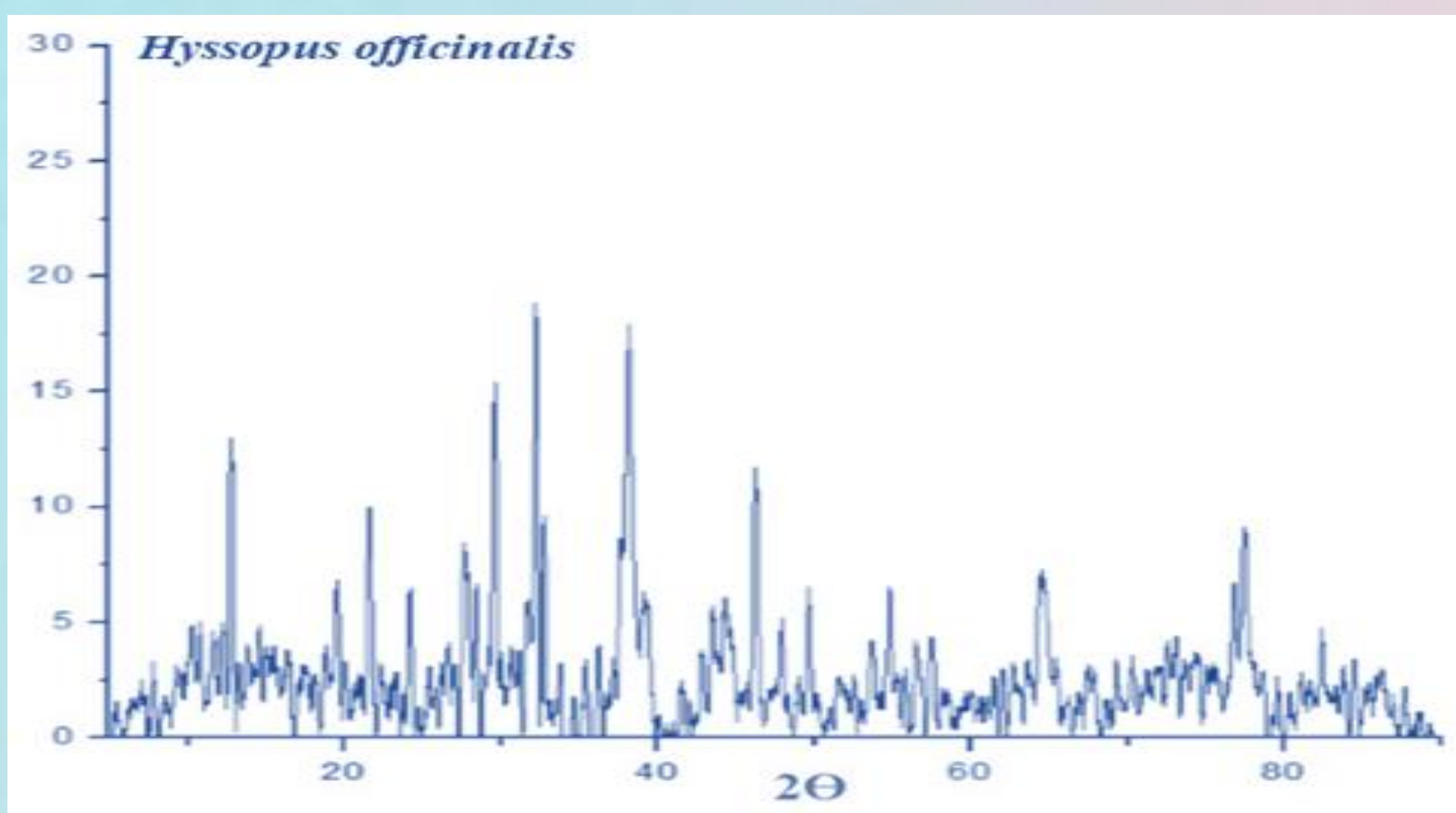
تغییر رنگ مخلوط عصاره و نیترات نقره به عنوان اولین نشانه در بیوسنتز نانوذرات نقره در نظر گرفته شد. محلول حاوی نانوذرات نقره سنتز شده ابتدا توسط اسپکتروفتومتری در طول موج‌هایی با دامنه ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس میزان جذب، طول موجی که در آن نانوذرات نقره بیشترین جذب را نشان دادند، تعیین شد. به منظور بررسی ماهیت، ساختار و اندازه نانوذرات نقره سنتز شده، نمونه‌ای از هر یک از نانوذرات نقره با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) و طیف‌سنجی پراش اشعه ایکس (XRD) مورد ارزیابی قرار گرفت.



Hyssopus NPs

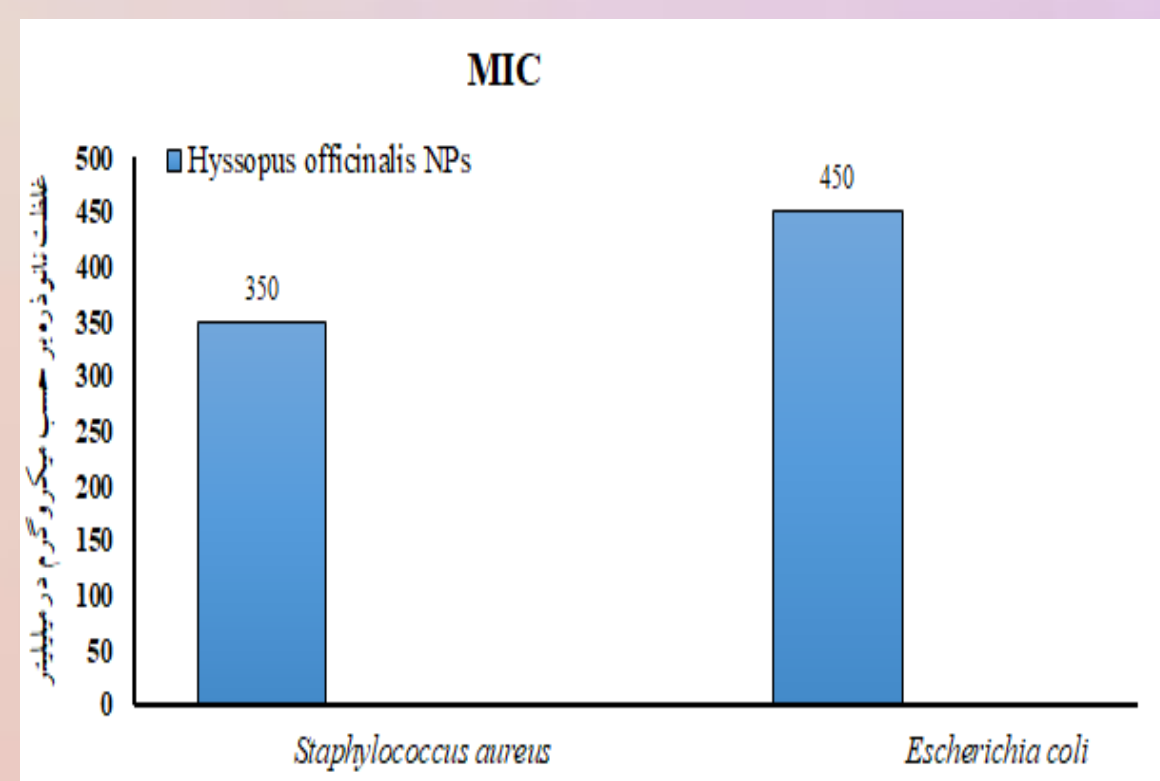
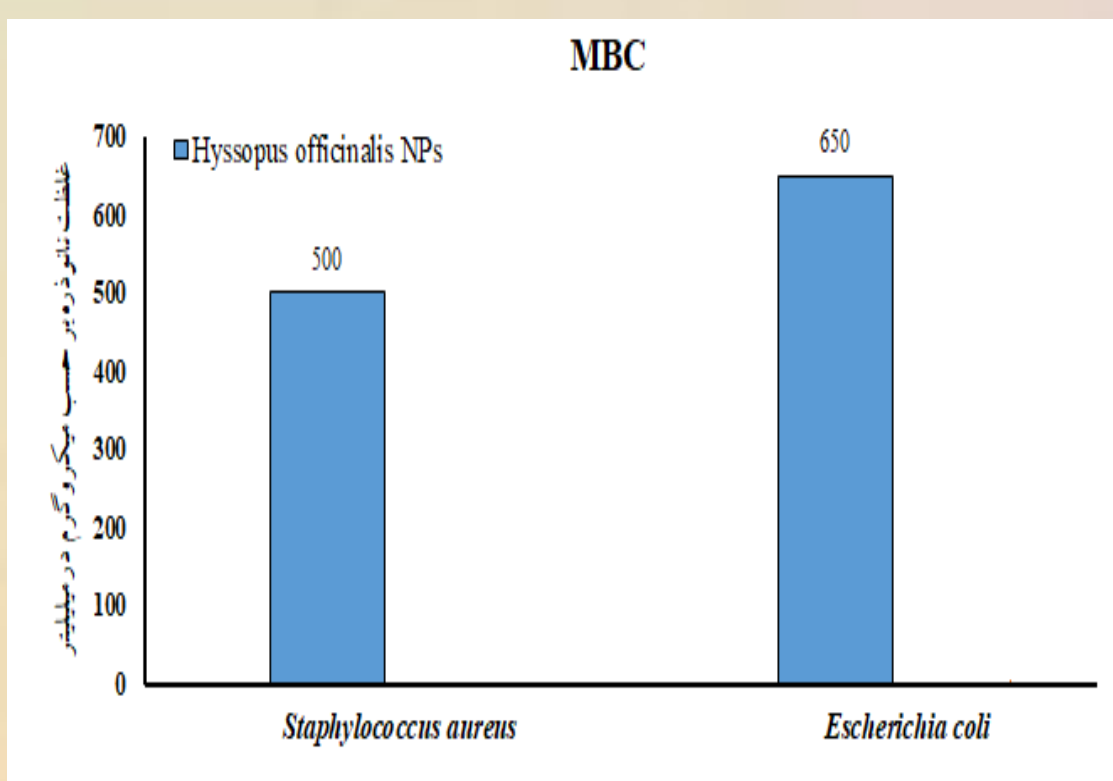
شکل شماره ۲: نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) به منظور تعیین اندازه و شکل نانوذرات نقره.

به منظور تأیید نتایج به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی، از طیف سنجی پراش اشعه ایکس (XRD) استفاده شد. نتایج آزمون XRD پیک‌های در زوایای $15/38$ ، $18/44$ ، $21/49$ ، $24/57$ و $26/77$ درجه در نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره زوفا نشان داد که منطبق بر طیف استاندارد تجمع نقره بودند. (شکل ۳).



شکل شماره ۳: نتایج آزمون پراش اشعه ایکس (XRD) به منظور تأیید سنتز نانوذرات نقره.

پس از تأیید سنتز نانوذرات و بررسی خصوصیات فیزیکی آنها، اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمون حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) برای تعیین اثرات ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که نانوذرات سنتز شده توسط عصاره زوفا سبب مهار باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت شده بود (شکل ۴). در رابطه با اثر نانوذرات بر روی باکتری‌های مختلف، نتایج نشان داد که نانوذرات سنتز شده اثر مهاری و کشندگی بیشتری بر روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* داشتند. به طوریکه حداقل غلظت کشندگی برای باکتری *اشرشیا کلی* 650 میکروگرم در میلی‌لیتر و برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* این میزان 500 میکروگرم در میلی‌لیتر برای نانوذرات سنتز شده توسط عصاره زوفا بود (شکل ۴).



شکل شماره ۴: نتایج آزمون حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانوذرات نقره بر روی باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*.

نتایج آزمون انتشار دیسک نشان داد که نانوذرات سنتز شده توسط عصاره گیاه دارویی زوفا با میانگین قطر هاله میلی‌متر بر روی هر دو باکتری *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر ضد باکتری داشتند. براساس نتایج به دست آمده باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* حساسیت بیشتری نسبت به نانوذرات نقره سنتز شده نشان داد (شکل ۵).

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره و نانوذرات نقره سنتز شده

به منظور بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده، از دو باکتری گرم منفی *اشرشیا کولی* (PTCC 1330) و گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112) استفاده شد. ابتدا جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) نانوذرات نقره سنتز شده، از روش میکروداپلوشن و معرف تترازولیوم کلراید استفاده شد. پس از تعیین حداقل غلظت بازدارنده، حداقل غلظت کشندگی (MBC) تعیین شد. برای این منظور سوسپانسیون سلولی باکتری‌های *اشرشیا کولی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در آزمون MIC بر روی پتری دیش‌هایی حاوی محیط کشت LB کشت داده شد. سپس جهت ارزیابی اثر کشندگی نانوذرات نقره سنتز شده، از آزمون انتشار دیسک (Disk Diffusion) استفاده شد.

بررسی اثرات ضد سرطانی نانوذرات نقره سنتز شده

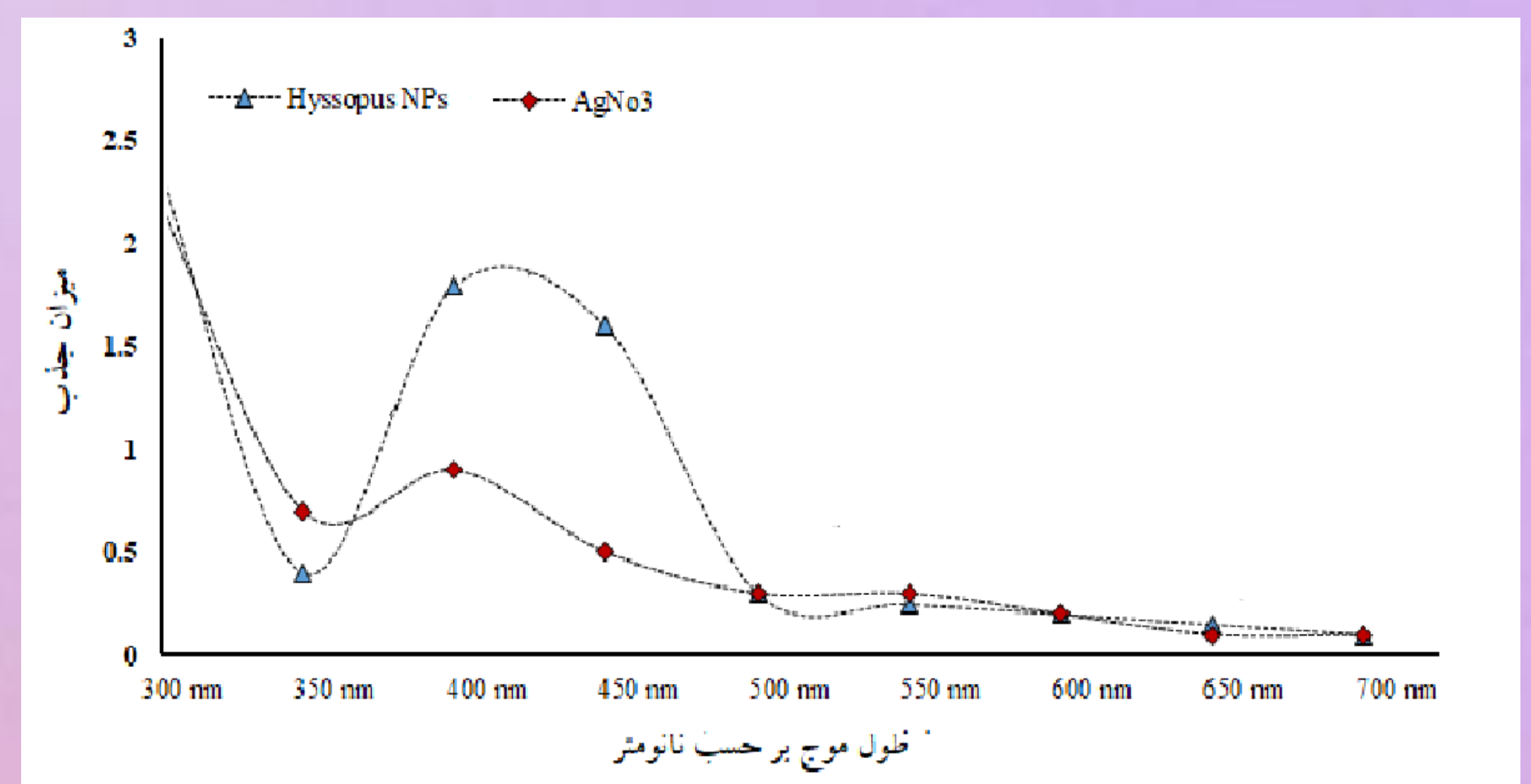
به منظور بررسی اثرات ضد سرطانی نانوذرات نقره سنتز شده از تکنیک MTT استفاده شد. سه رده سلول سرطانی (MCF-7، A549، HeLa) از بانک انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت مناسب (RPMI) به همراه 10% درصد سرم جنین گاوی (FBS) و 1% درصد آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد و غلظت 5% درصد CO_2 کشت داده شد. نمونه‌هایی از هر یک از سلول‌های سرطانی با غلظت معین تهیه شد به نحوی که مقدار غلظت در هر یک از چاهک‌های پلیت 96 تائی حدود 5×10^4 سلول بود. سپس سلول‌های سرطانی با غلظت‌های مختلف نانوذره نقره (100 ، 50 ، 25 ، 12.5 ، 6.25 و 1 میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت 72 ساعت در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد، تیمار شدند.

سپس جهت ارزیابی اثر سمیت نانوذرات بر روی سلول‌های سرطانی، از معرف MTT با غلظت 5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شد. به هر یک از چاهک‌ها مقدار 20 میکرولیتر از محول MTT اضافه شد و به مدت 4 ساعت در دمای 37°C درجه‌سانتی‌گراد و تاریکی گرماگذاری شدند. سپس به منظور حل نمودن کریستال‌های فورمازان، مقدار 100 میکرولیتر DMSO به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. پس از گذشت 10 دقیقه، میزان جذب هر چاهک با استفاده از اسپکتروفتومتر و طول موج 570 نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظتی که سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی به میزان 50% درصد شده بود به عنوان غلظت مهاری نانوذرات (IC_{50}) در نظر گرفته شد. علاوه بر این به منظور تعیین درصد بقای سلولی، نسبت میزان جذب نمونه تیمار شده توسط نانوذره بر روی میزان جذب نمونه کنترل تعیین شد و با ضرب نمودن مقدار به دست آمده در عدد 100 ، درصد بقا برای هر نمونه سلول سرطانی به دست آمد (گرلیر و توماس، ۱۹۸۶).

Gerlier, Thomasset

یافته‌ها

اولین نشانه به عنوان سنتز موفق نانوذرات نقره، تغییر رنگ مخلوط عصاره و محلول نیترات نقره به رنگ تیره در نظر گرفته شد. در بسیاری از مقالات، تغییر رنگ را به عنوان نشانه سنتز نانوذرات گزارش شده داده‌اند. تیره شدن محلول نیترات نقره در مجاورت عصاره گیاهی را می‌توان ناشی از پلاسمون سطحی دانست. متابولیت‌های ثانویه موجود در عصاره گیاهان دارویی با فرایند اکسیداسیون و احیاء به تشکیل یون‌های بدون بار نقره (Ag^0) کمک کرده که در نهایت منجر به سنتز نانوذرات نقره خواهد شد (سفیانی و همکاران، ۲۰۱۹). براساس نتایج اسپکتروفتومتری، نانوذرات سنتز شده توسط عصاره زوفا و عصاره مرزنجوش به ترتیب در طول موج 430 و 450 نانومتر بیشترین جذب را نشان دادند (شکل ۱).



شکل شماره ۱: نتایج جذب نانوذرات و محلول نیترات نقره با استفاده از تکنیک اسپکتروفتومتری (UV-Vis).

به منظور بررسی خصوصیات نانوذرات نقره سنتز شده، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) استفاده گردید. نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان داد که میانگین نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره زوفا اندازه‌ای بین 24 تا 19 نانومتر داشتند. دامنه اندازه نانوذرات سنتز شده توسط عصاره زوفا بین 18 و 30 نانومتر بودند. نانوذرات سنتز شده توسط عصاره دارویی کروی شکل بودند (شکل ۲).

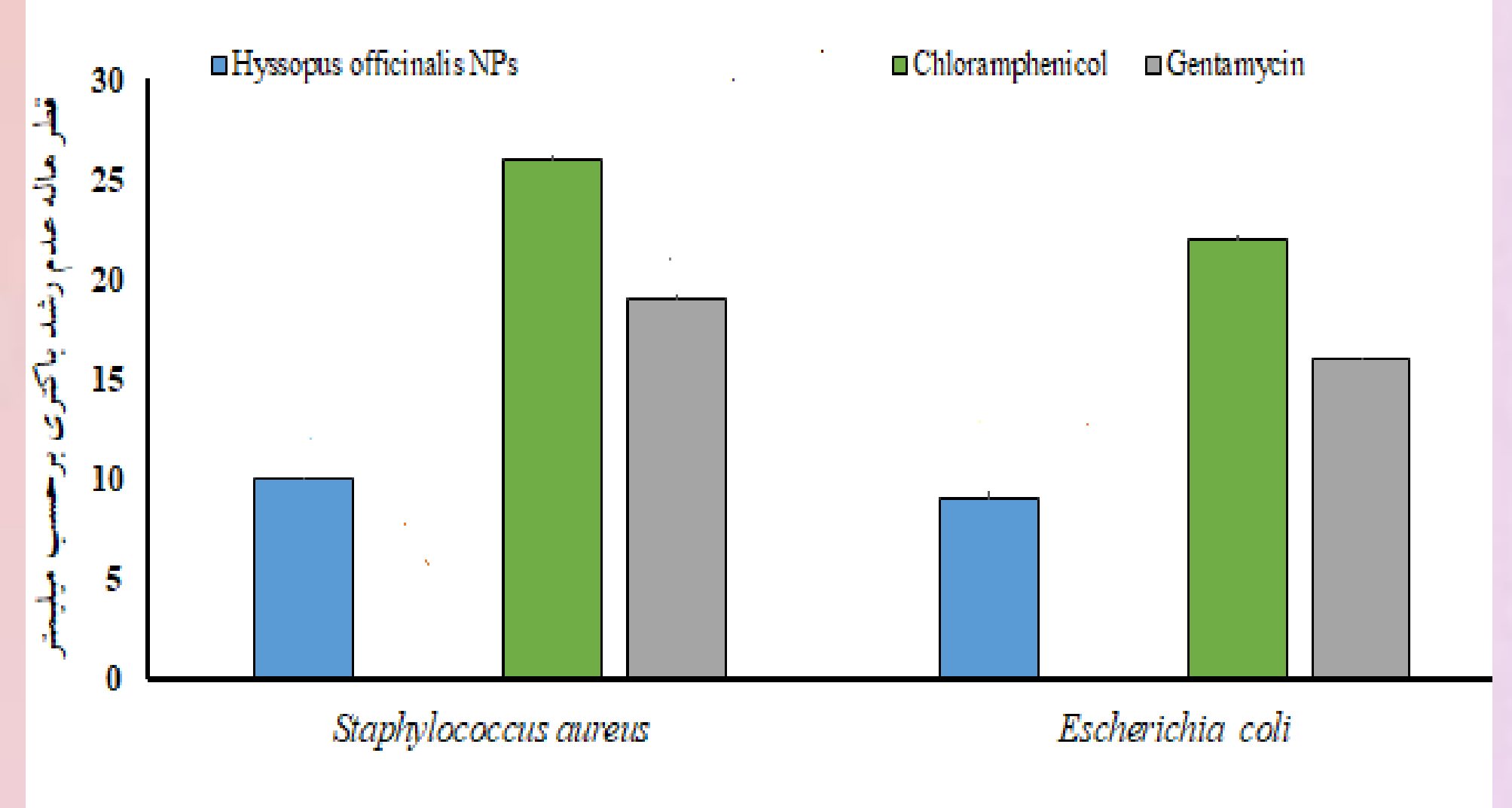
مطالعات گذشته نشان داده که طیف وسیعی از نانوذرات با اندازه و شکل متنوع را می‌توان براساس سنتز بهداشتی آورد. ضمن اینکه شرایط سنتز نیز بر روی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آنها موثر خواهد بود. بیشترین اثر سمیت سلولی نانوذرات به ابعاد آنها ارتباط دارد. نانوذرات کروی به راحتی با سطح سلول ارتباط برقرار کرده و سمیت خود را آغاز می‌کنند (گلیگا و همکاران، ۲۰۱۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه دارویی زوفا اثر کشندگی معنی‌داری بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی داشتند. گیاهان دارویی منبع غنی از متابولیت‌های مختلف از جمله پلی‌فنل‌ها، تانن‌ها و ترپن‌ها می‌باشد (دولیتیک و همکاران، ۲۰۱۸). این گیاهان دارای خواص ضد میکروبی قوی است و امروزه به عنوان یک آنتی‌بیوتیک طبیعی موثر مورد استفاده قرار می‌گیرد (لیجا و توپیل، ۲۰۰۷). کاووسی و یعقوبی (۱۳۹۶) در مطالعه خود بیان داشتند که نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه دارویی توسط آن‌ها قطری بین ۴۰ تا ۷۰ نانومتر دارند و اثرات ضد میکروبی معنی‌داری بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان دادند.

در سال‌های اخیر به دلیل مصرف روزافزون آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی، فراوانی سویه‌های مقاوم باکتری‌های بیماری‌زا افزایش یافته است. مقاومت باکتریایی یکی از چالش‌های مهم بخش بهداشت و درمان محسوب می‌گردد. باکتری‌های بیماری‌زا از مکانیسم‌های متعدد و متفاوتی برای ایجاد مقاومت در برابر مصرف انواع مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌کنند. مکانیسم‌های مقاومت در بین باکتری‌ها مختلف بوده و مطالعات نشان داده که باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از این نظر اختلاف دارند. اولین سد در برابر ترکیبات ضد میکروبی، دیواره سلول باکتری است. باکتری‌های گرم مثبت از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای دیواره سلولی ضخیمی‌تری هستند، با این وجود باکتری‌های گرم منفی نظیر *اشرشیا کلی* به دلیل دارا بودن یک لایه بیرونی از جنس لیپوپلی‌ساکارید و غنی از پورین، نسبت به باکتری‌های گرم مثبت از مقاومت بالاتری در برابر ورود مواد ضد میکروبی به درون سلول باکتری برخوردار هستند (بلرو همکاران، ۲۰۱۵). نانوفناوری به سرعت در حال رشد بوده و امروزه به عنوان بخش جدائی‌ناپذیری در تشخیص و درمان بیماری‌ها محسوب می‌گردد. در سال‌های اخیر، رویکردهای درمانی و تشخیصی مبتنی بر نانوفناوری، توانایی بالقوه نانوذرات را در درمان سرطان نشان داده است. نانوذرات به دلیل دارا بودن خصوصیات فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد از جمله نسبت سطح به حجم بالا و واکنش‌پذیری قوی، کاربردهای فراوانی پیدا کرده‌اند (وانگ و همکاران، ۲۰۱۷). اگرچه نانوفناوری یکی از امیدبخش‌ترین تحقیقات در زمینه پزشکی و دارویی است با این وجود، به دلیل سمیت بالقوه و ایمنی ناشناخته محصولات این حوزه، الزامات و برنامه‌های گسترده‌ای برای سنتز و کاربرد این دسته از مواد در بخش درمان و بهداشت ضروری است (گلیگا، ۲۰۱۴).

سنتز زیستی نانوذرات به دلیل سمیت کم و سازگاری با محیط زیست، بسیار مورد توجه هستند. در سنتز زیستی نانوذرات، از عوامل پوشش‌دهی در سنتز نانوذرات استفاده می‌شود. نانوذرات این عوامل پوششی را که معمولاً مولکول‌های آلی هستند، جذب می‌کنند و برای کمک به تثبیت نانوذرات استفاده می‌شوند. از نظر پزشکی، نشان داده شده است که بیوسنتز نانوذرات، کاربرد بالینی آنها را بسیار افزایش می‌دهد (لی و همکاران، ۲۰۱۹). مطالعات قبلی نشان داده که متابولیت‌های موجود در عصاره گیاه دارویی مرزنجوش علاوه بر اثر کشندگی و مهارت بر روی سلول‌های سرطانی، از بروز سرطان نیز جلوگیری می‌کنند (اتهمنه، ۲۰۲۰). براساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، اثرات ضد سرطانی نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی بر روی ۳ رده سلول سرطانی مختلف مشاهده شد. اگرچه اثرات کشندگی نانوذرات بر روی سلول‌های مختلف با افزایش غلظت نانوذرات نقره افزایش یافت با این وجود تفاوت معنی‌داری بین اثر کشندگی و نوع رده سلولی مشاهده نشد.

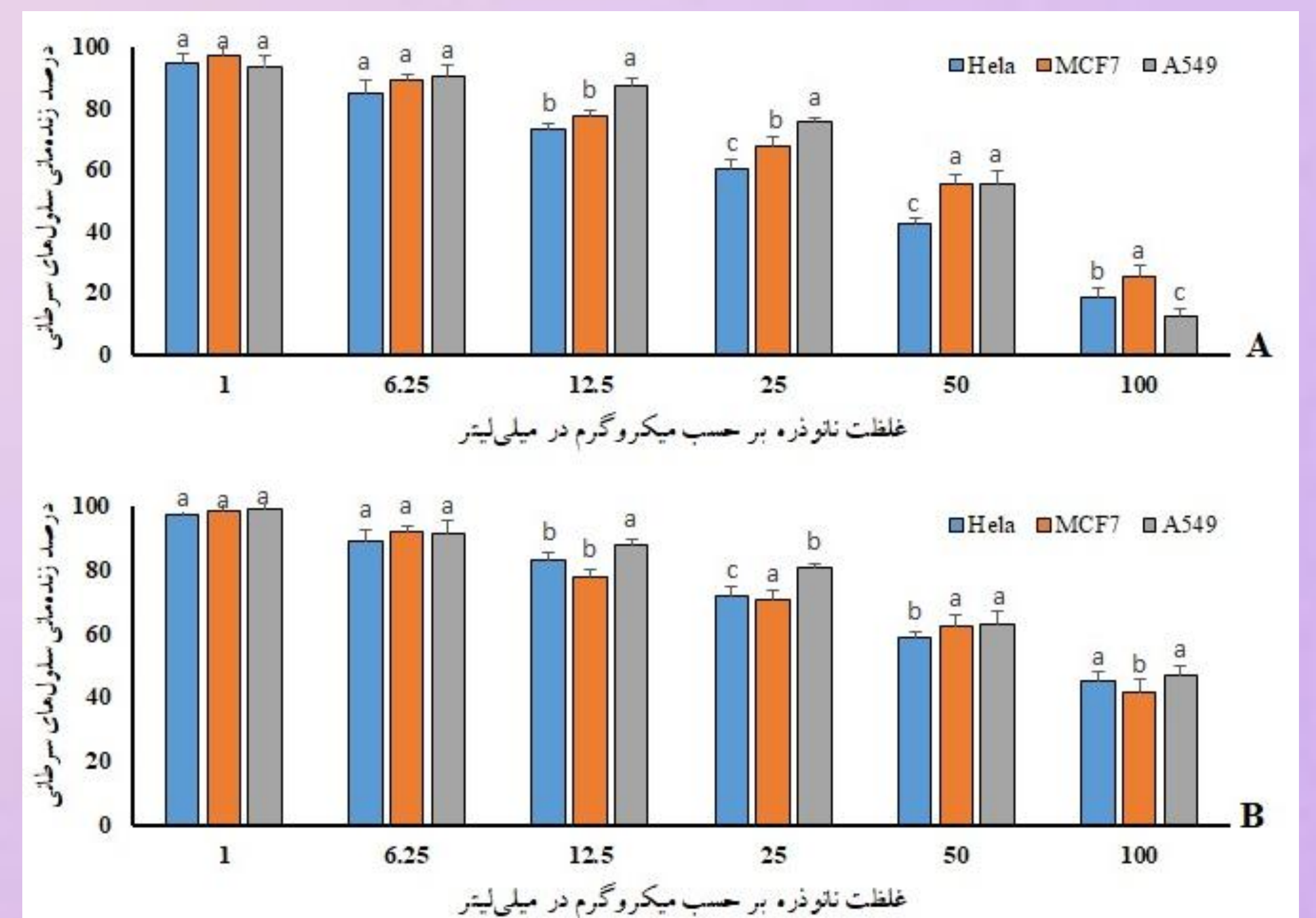
فیردهوس و لالیتا (۲۰۱۵) اثر سمیت سلولی نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه دارویی گل مرواریدی را با روش MTT علیه سلول‌های سرطانی پستان (MCF-7) مورد بررسی قرار دادند. سمیت سلولی قابل توجهی (۳ میکروگرم در میلی‌لیتر) مشاهده شد. آنها بیان کردند که اثر ضد سرطانی نانوذرات سنتز شده به دلیل شکل کروی و اندازه کوچک ذرات (۱۰ تا ۳۰ نانومتر) بوده که به راحتی به درون سلول‌های سرطانی نفوذ پیدا می‌کنند. اگرچه مطالعات دیگری در این زمینه وجود دارد و نشان داده که غلظت بالاتری از نانوذرات نقره (۸۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) جهت جلوگیری از تکثیر سلول‌های سرطانی نیاز است (داتا و همکاران، ۲۰۱۸). راج‌مینا و همکاران (۲۰۲۰) گزارش دادند که نانوذرات نقره زیستی می‌توانند به طور موثری بر علیه سلول‌های سرطانی مختلف سمیت داشته باشند. در مطالعه آنها بیشترین اثر کشندگی بر روی سلول‌های سرطانی پستان (MCF-7) مشاهده شد به طوری که ۶۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات نقره توانست ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی را از بین ببرد.

نانوذرات نقره می‌توانند با استفاده از اندوسیتوز وارد سلول شده و با تأثیر بر تنفس سلولی به میتوکندری وارد شده و گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) تولید کنند. به طور خلاصه، نانوذرات نقره می‌توانند به DNA سلول‌های سرطانی آسیب رسانده و با القای استرس اکسیداتیو، القای آپوپتوز و آسیب میتوکندری، سلول‌های سرطانی را مهار کنند (سوکیرتا و همکاران، ۲۰۱۲). براساس فرضیات ارائه شده، توسعه رگ‌های خونی به رشد سلول‌های سرطانی کمک می‌کند. رگ‌های خونی جدید با تأمین اکسیژن و مواد مغذی سلول‌های سرطانی به سلول‌ها کمک می‌کند تا به آنها حمله کرده و در بدن گسترش یابند. این پدیده به عنوان متاستاز شناخته می‌شود (فولکمن، ۲۰۰۲). نتایج مطالعات گذشته نشان داده که نانوذرات نقره سنتز شده توسط گیاهان دارویی، با مهار رگ‌زایی نقش مهمی در جلوگیری از توسعه و تولید سلول‌های سرطانی دارند (شن و همکاران، ۲۰۱۵).



شکل شماره ۵: نتایج آزمون انتشار دیسک به منظور تعیین میزان اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره. ستون‌هایی که دارای حرف مشترک هستند، از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار نیستند.

نتایج تست ضد سرطانی به روش MTT نشان داد که اثر مهارت نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره زوفا بر روی رده‌های سلول سرطانی با افزایش غلظت شده توسط عصاره مرزنجوش، تفاوت معنی‌داری بین اثر مهارت نانوذرات نقره سنتز شده توسط زوفا در رده‌های سلولی مختلف مشاهده نشد (شکل ۶). نانوذرات بر میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کاسته شد که نشان دهنده اثر متقابل مستقیم دوز بر میزان مهارت نانوذرات نقره بود. با مقایسه اثر مهارت نانوذرات نقره مختلف، مشاهده شد که نانوذرات سنتز شده توسط عصاره مرزنجوش نسبت به نانوذرات زوفا از اثر مهارتی بیشتری برخوردار بودند و درصد زنده مانده‌های سلولی مختلف کمتر بود. در رابطه با هر دو نانوذره سنتز شده، بیشترین اثر مهارتی با کاربرد ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد (شکل ۶). میانگین درصد اثر مهارتی بر سلول‌های مختلف با استفاده از غلظت‌های مختلف نانوذرات مرزنجوش ۳۳ درصد بود. بیشترین اثر مهارتی نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره مرزنجوش بر روی رده سلولی A549 مشاهده شد به طوری که میانگین اثر مهارتی بر روی این رده سلولی ۳۱ درصد بود. رده سلولی HeLa نیز با زنده مانده ۶۲ درصد، از نظر حساسیت در رتبه دوم قرار داشت. میانگین اثر مهارتی نانوذرات سنتز شده توسط عصاره زوفا به طور متوسط ۲۴ درصد برآورد شد. نتایج نشان داد که برخلاف نانوذرات سنتز



شکل شماره ۶: درصد بقای رده‌های سلولی HeLa، MCF7، A549 در برابر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره سنتز شده گیاه مرزنجوش (A) و زوفا (B) در مدت زمان ۷۲ ساعت. ستون‌هایی که دارای حرف مشترک هستند، از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار نیستند.

نتایج و بحث

نانوذرات سنتز شده به روش زیستی به دلیل دارا بودن مزایای فراوان نسبت به سایر روش‌ها، بیشتر مورد توجه هستند. گیاهان دارویی منبع غنی از ترکیبات زیستی با نام عمومی متابولیت ثانویه هستند که عملکرد دارویی آنها ثابت شده و به عنوان بهترین گزینه برای سنتز نانوذرات نقره محسوب می‌شوند (روی و همکاران، ۲۰۱۸). در مطالعه حاضر نانوذرات نقره به روش زیستی به طور موفقیت‌آمیزی سنتز شد. نانوذرات نقره سنتز شده در طول موج ۴۳۰ و ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب را نشان دادند. براساس نتایج مطالعات گذشته، افزایش ارتعاشات سطح پلاسمون و دامنه جذب نانوذرات نقره زیستی بین ۴۰۰ تا ۴۶۰ نانومتر گزارش شده است. در مطالعه حاضر میانگین قطر نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه دارویی زوفا برابر با ۲۴ نانومتر بود. اندازه و شکل نانوذرات عامل مهمی در میزان اثر ضد میکروبی آنها محسوب می‌گردد. نانوذرات با اندازه متفاوت می‌توانند اثرات متقابل مختلفی با دیواره سلولی باکتری‌ها داشته باشند که نهایتاً بر میزان خواص ضد میکروبی آنها بسیار موثر است (روئیس بالتازار، ۲۰۱۷).

Gluga, AR., Skoglund, S., Odnevall Wallinder, I., Fadeel, B., Karlsson, H.L.(2014), Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Particle and Fiber Toxicology*, 11(1).

He, Y., Li, X., Wang, J.(2017), Synthesis, characterization and evaluation cytotoxic activity of silver nanoparticles synthesized by Chinese herbal *Cornus officinalis* via environment friendly approach. *Environ Toxicol Pharmacol*; 56, 56.

Iqbal, S., Fakher-e-Alam, M., Akbar, F., Shafiq, M., Atif, M., Amin, N.(2019), Application of silver oxide nanoparticles for the treatment of cancer. *Journal of Molecular Structure*, 1189, 203.

Kavoosi, S., Yaghoubi, H.(2018), Synthesis of silver nanoparticles using green method of plant extract european marjoram (*Origanum majorana*) and their antibacterial effects. *Journal of Cellular and Molecular Research*, 30(2), 299.

Lee, SH., Jun, BH.(2019), Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. *International Journal of Molecular Science*, 20, 865.

Leeja, L., Thoppil, J.(2007). Antimicrobial activity of methanol extract of *Origanum majorana* L. (Sweet marjoram), *J. Environ. Biol. Acad. Environ. Biol. India*, 28, 145.

Liao, S., Zhang, Y., Pan, X., Zhu, F., Jiang, O., Liu, Q.(2019), Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 1469.

Mu, W., Chu, Q., Liu, Y., Zhang, N.(2020), A review on Nano-based drug delivery system for cancer chemo immunotherapy. *Nano-Micro Letters*, 12,142.

Nguyen, K.T.(2011), Targeted nanoparticles for cancer therapy: Promises and challenge. *Nanomed. Nanotechnol*.

Ovais, M., Khalil, AT., Raza, A., Khan, MA., Ahmad, I., Islam, NU., Saravanan, M.(2016), Green synthesis of silver nanoparticles via plant extracts: beginning a new era in cancer theranostics. *Nanomedicine*, 10,2217.

Raj Meena, HP., Singh, AP.,Tejavath, KK.(2020), Biosynthesis of silver nanoparticles using *Cucumis prophetarum* aqueous leaf extract and their antibacterial and antiproliferative activity against cancer cell lines. *ACS Omega*, 5, 5520.

Ratan, ZA., Haidere, MF., Nurunnabi, MD., Shahriar, S., Ahammad, AJS., Shim, YY.(2020), Green chemistry synthesis of silver nanoparticles and their potential anticancer effects. *Cancers*, 12, 855.

Roy, A., Bulut, O., Some, S., Kumar, Mandal, A, Yilmaz MD.(2018), Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC Advances*, 9, 2673.

Ruíz-Baltazar, AJ., Reyes-López, SY., Larrañaga, D., Estévez, M., Pérez,(2017), R. Green synthesis of silver nanoparticles using a *Melissa officinalis* leaf extract with antibacterial properties, *Results in Physics*, 7, 639..

Shaik, M., Khan, M., Kuniyil, M., Al-Warthan, A., Alkathlan, HZ., Siddiqui, MRH.(2018), Plant-extract-assisted green synthesis of silver nanoparticles using *Origanum vulgare* L. extract and their microbicidal activities. *Sustainability*, 10, 913.

Sharma, A., Goyal, AK., Rath, G.(2018), Recent advances in metal nanoparticles in cancer therapy, *Journal of Drug Target*, 8.

Sharma, D., Kanchi, S., Bisetty, K.(2015), Biogenic synthesis of nanoparticles: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 12, 3576.

Shen, HH.,Chan, EC., Lee, JH., Bee, YS., Lin, TW., Disting, GJ.(2015), Nanocarriers for treatment of ocular neovascularization in the back of the eye: New vehicles for ophthalmic drug delivery. *Nanomedicine*, 10, 20932107.

Sukirtha, R., Manasa Priyanka, K., Antony, JJ., Kamalakkannan, S., Balasubramanian, P.(2012), Cytotoxic effect of Green synthesized silver nanoparticles using *Melia azedarach* against in vitro HeLa cell lines and lymphoma mice model. *Process Biochemistry*, 47, 273279

فلز نقره به طور طبیعی سمی بوده و تبدیل فلز به فرم نانو ممکن است خطر سمیت را افزایش دهد. با این حال، روش سنتز سبز سمیت نانوذرات نقره را کاهش می‌دهد. سمیت نانوذرات نقره عمدتاً به پوشش آنها بستگی دارد. متابولیت‌های ثانویه گیاهی با ایجاد پوشش بر روی نانوذرات نقره، آنها را تثبیت کرده و از تجمع آنها جلوگیری می‌کند. به همین دلیل رفتار زیست سازگار نانوذرات نقره سنتز شده توسط گیاهان دارویی، برای تولید داروها و استفاده از روش‌های درمانی مناسب خواهد بود (راتان و همکاران، ۲۰۲۰).

نانوذرات چشم انداز جدیدی برای تشخیص، محافظت و درمان انواع سلول‌های سرطانی در اختیار محققین قرار می‌دهند. به دلیل بهبود سرعت دستگاه‌های مختلف تشخیصی و راهکارهای درمانی، مرگ و میر ناشی از سرطان بطور قابل توجهی مهار شده است. متأسفانه، تاکنون روش موثقی برای انتخاب و اتصال دقیق داروها به سلول‌های سرطانی به منظور جلوگیری از سمیت و عوارض جانبی آنها ارائه نشده است. برای غلبه بر این وضعیت، سنتز نانوذرات به عنوان یک تکنیک جدیدی راه‌کارهای مناسبی در اختیار بخش پزشکی قرار داده است (هی و همکاران، ۲۰۱۷).

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تولید نانوذرات نقره توسط عصاره گیاهان دارویی به روش زیستی، ضمن سادگی و هزینه بسیار پائین، از ایمنی بالائی برخوردار است. می‌توان با مطالعات بیشتر نانوذرات نقره سنتز شده به دلیل اندازه کوچک و ساختار کروی، قادرند به راحتی از دیواره سلولی سلول‌های باکتری عبور کرده و اثر سمی بر روی رشد و متابولیسم باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت داشته باشند. علاوه بر این، نانوذرات نقره با اثر متقابل به دیواره سلول‌های سرطانی و مکانیسم‌های متعدد درون سلولی، اثر مهاری مناسبی بر رده‌های سلولی مختلف خواهند داشت. بنابراین نانوذرات نقره سنتز شده به عنوان کاندید دارو و آنتی بیوتیک جهت اهداف درمانی سرطان و عفونت‌های میکروبی استفاده نمود.

منابع

Akhtar, MS., Panwar, J., Yun. YS. (2013), Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 1, 591.

Al-Sufyani, NM., Hussien, NA., Hawsawi, YM.(2019), Characterization and anticancer potential of silver nanoparticles biosynthesized from *Olea chrysophylla* and *Lavandula dentata* leaf extracts on HCT116 colon cancer cells. *Journal of Nanomaterials*, 7361695. Athamneh, K., Alneyadi, A., Alsamri, H., Alrashedi, A., Palakott, A., El-Tarabily, K., Eid, A., Dhaheri, Y.A., Iratni, R. (2020). *Origanum majorana* essential oil triggers p38 MAPK-mediated protective autophagy, apoptosis, and caspase-dependent cleavage of P70S6K in colorectal cancer cells. *Biomolecules*, 10, 412.

Bahar Yaqoob, S., Adnan, R.,Rameez Khan, RM., Rashid.(2020), M. Gold, silver, and palladium nanoparticles: a chemical tool for biomedical applications. *Frontiers in Chemistry*, 8, 376.

Baranwal, A., Srivastava, A., Kumar, P., Bajpai, VK., Maurya, PK., Chandra, P.(2018), Prospects of nanostructure materials and their composites as antimicrobial agents. *Front Microbiology*,9, 422..

Blair, MA., Webber, MA., Baylay, AJ., Ogbolu, DO., Piddock, LJ., C.(2015), Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Review*,13, 42.

Datta, PK.,Sandeep, A., Sonu, A.(2018), Anti-proliferative effect of silver nanoparticles in HeLa cells due to enhanced oxidative stress. *Research Journal of Biotechnology*,13(2), 68.

Duletic, S., Alimpic' Aradski, A., Kolarevic, S., Vukovic'-Gac'ic', B., Oaldje, M., Živkovic', J., Šavikin K. Marin P.(2018), Antineurodegenerative, antioxidant and antibacterial activities and phenolic components of *Origanum majorana* L. (Lamiaceae) extracts. *Journal of Applied and Botany Food Quality*, 91.

Fernando, SSN., Gunasekara, TDCP., Holton, J.(2018), Antimicrobial nanoparticles: applications and mechanisms of action, *Sri Lankan Journal of Infectious Diseases*,8 (1), 2.

Firdhouse, JM., Lalitha, P.(2015), Apoptotic efficacy of biogenic silver nanoparticles on human breast cancer MCF-7 cell lines. *Prog Biomater*,4, 113.

Folkman, J.(2002), Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. In *Seminars in Oncology*; Elsevier: Amsterdam, the Netherlands, 15.

Gerlier, D., Thomasset, N.(1986), Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunology Methods*, 94(1-2),5763.

اولین همایش ملی گیاهان دارویی، کارآفرینی و تجاری سازی

۱۹ و ۲۰ آبان ۱۴۰۰
MPEC 2021

1st National Conference on Medicinal Plants,
Entrepreneurship and Commercialization
10-11th Nov 2021, University of Jiroft



Vickers, A. (2004), Alternative cancer cures: "Unproven" or "disproven"? CAA Cancer Journal, 54, 110.

Wang, L., Hu, C., Shao, L. (2017), The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future, International Journal of Nanomedicine, 12, 1227.

Yesilot, S., Aydin, C. (2029), Silver nanoparticles; a new Hope in cancer therapy? Eastern Journal of Medicine, 24,(1), 111.

Yin, IX., Zhang, J., Zhao, I., Mei, ML., Li, Q., Chu, CH. (2020), The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. International Journal of Nanomedicine, 15, 2555.

Zahran, M., El-Kemary, M., KhalifaM, S., El-Seedi, H. (2017), Spectral studies of silver nanoparticles biosynthesized by *Origanum majorana*. *Green Processing and Synthesis*, 11, 123.

Evaluation of antimicrobial effects and estimation of anti-cancer potential of green nanoparticles biosynthesized using hyssop extract on different cell lines (A549, MCF-7 and Hela) Reyhaneh Sezari Hamankoh¹, Shabnam Shamei^{2*}

1 و 2. Department of Chemistry, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran.

1-Master of Chemistry, Department of Chemistry, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran.

2-Assistant Professor, Department of Chemistry, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran.
E-mail:shabnamshamaie@gmail.com

Abstract

Introduction: Metal nanoparticles synthesized using medicinal plants are used in anti-cancer and antimicrobial studies due to their unique physicochemical properties, high safety and low cost. **Materials and Methods:** Silver nanoparticles were synthesized using extracts of hyssop and marjoram. After studying the properties of the synthesized nanoparticles, two gram-negative *Escherichia coli* and gram-positive *Staphylococcus aureus* bacteria were used to evaluate the antimicrobial effect of the synthesized nanoparticles. Finally, the anti-cancer effect of synthesized silver nanoparticles on 3 cancer cell lines was evaluated by MTT method. **Finding:** The results showed that the synthesized nanoparticles were spherical in shape and their average size was between 15 and 26 nm. X-ray diffraction test also confirmed the successful synthesis of nanoparticles. The results of antimicrobial test showed that the synthesized silver nanoparticles had a significant antimicrobial effect on both bacteria. The anti-cancer effect of the synthesized nanoparticles was similar on all 3 cell lines. However, with increasing the concentration of nanoparticles on the survival of cancer cells decreased, indicating a direct dose interaction on the inhibitory rate of silver nanoparticles. **Discussion and Conclusion:** Medicinal plants can be used in the synthesis of silver nanoparticles. The synthesized nanoparticles, due to their coating of secondary metabolites and the release of silver ions (Ag^+), can be used as effective therapeutic agents in the treatment of various cancers.

Keywords: Nanoparticles, Cancer, Antibiotics, Metabolites