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

شبنم شماعی (نویسنده مسئول)[1*] و ریحانه سزاری‌همانکوه[2]

۱*- استادیار، گروه شیمی، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران، shabnamshamaie@gmail.com

۲- کارشناسی ارشد، گروه شیمی، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران، hadisghaemi65@gmail.com

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۱

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)

Shabnam Shamei (Corresponding author)[*1] and Reyhaneh Sezari Hamankoh[2]

1*- Assistant Professor, Department of Chemistry, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran, shabnamshamaie@gmail.com

2- M.Sc graduated, Department of Chemistry, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran, hadisghaemi65@gmail.com

Received: June 2022 Accepted: July 2022

چکیده

نانوذرات فلزی سنتز شده با استفاده از گیاهان داروئی به دلیل دارا بودن خصوصیات فیزیکوشیمیائی 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 داروئی 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 روی سه سلول سرطانی به روش MTT ارزیابی گردید. 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 تائید 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 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 مهاری نانوذرات نقره بود. 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: آنتی بیوتیک، سرطان، متابولیت، نانوذره

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: Antibiotics, Cancer, Metabolites, Nanoparticles

مقدمه و کلیات

در سال‌های اخیر نانوذرات به عنوان ابزار قدرتمند و پیشرفته‌ای در شناسائی و درمان بسیاری از بیماری‌های خطرناک از جمله سرطان کاربردهای فراوانی پیدا کرده است (Bahar Yaqoob *et al.*, 2020). 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 (Mu *et al.*, 2020). 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. علاوه‌براین از این نانوذرات می‌توان به عنوان حامل داروهای موثر نیز استفاده نمود (Sharma *et al.*, 2018). نانوذرات نقره می‌توانند با تولید گونه‌های اکسیژن فعال(ROS)، استرس اکسیداتیو و جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های حیاتی، سبب مرگ برنامه‌ریزی شده (Poptosisa) سلول‌های سرطانی شوند (Iqbal *et al.*, 2020). در دهه گذشته پیشرفت‌های قابل توجهی در سنتز نانوذرات فلزی با ساختار و خصوصیات منحصر به فرد صورت گرفته است. اندازه و ساختارهای فضائی 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 شناسائی و درمان بیماری‌ها مختلف مورد استفاده قرار گیرند (Yin *et al.*, 2020). استفاده بی‌رویه و غیر اصولی از آنتی‌بیوتیک‌های شیمیائی، سبب شده که انواع مختلفی از پاتوژن‌های مقاوم ایجاد شوند. بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاوم شده‌اند و بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های موجود، کارائی خود را از دست داده‌اند. ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، در حال تبدیل شدن به بزرگترین چالش سلامتی بشر در دنیا است (Baranwal *et al.*, 2018). 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 (Fernando *et al.*, 2018). 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 (Lee and Jun, 2019). روش‌های نوین متعددی در حال توسعه یا بهبود هستند تا خصوصیات فیزیکو-شیمیائی نانوذرات را افزایش دهند. در برخی روش‌ها فرآیند سنتز به نحوی اصلاح شده تا خصوصیات نوری، مکانیکی، فیزیکی، شیمیائی 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 داروئی از جمله پیش‌سازهای سازگار با محیط زیست بوده که در تولید نانوذرات کاربرد فراوانی پیدا کرده‌اند (Sharma *et al.*, 2018). سنتز نانوذرات فلزی با استفاده از ترکیبات زیستی موجود در عصاره گیاهان داروئی، 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 (Akhtar *et al.*, 2013). کشور ایران به دلیل شرایط آب و هوائی یکی از مراکز تنوع و رشد بسیاری از گیاهان داروئی 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 داروئی زوفا و بررسی اثرات ضد میکروبی و سمیت نانوذرات نقره سنتز شده بر روی سلول‌های سرطانی است.

فرآیندپژوهش

تهیه عصاره آبی گیاه داروئی مورد مطالعه: نمونه‌ی گیاهی مورد مطالعه گیاه داروئی زوفا (*Hyssopus officinalis*) از مزارع شهرستان خرم‌آباد جمع‌آوری و پس از تائید گیاه‌شناسی مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از شستشو توسط آب مقطر در آون با دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ 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 ٦٠ درجه سانتیگراد در بن‌ماری قرار داده شد. مخلوط مورد نظر به مدت ٢٤ ساعت در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. عصاره‌ی تهیه شده توسط کاغذ صافی واتمن (شماره ٢٤) 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 محلول روئی توسط فیلتر سرنگی (۰/۲۲ میکرونی) صاف شد.

بیوسنتز نانوذرات نقره: به منظور سنتز نانوذرات نقره، ابتدا مقدار ۵ میلی‌لیتر از عصاره آبی از گیاه داروئی مورد مطالعه به طور جداگانه به ۹۵ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره ۱ میلی‌مولار منتقل شد. محلول مورد نظر به مدت ٢٤ ساعت در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) روی شیکر قرار داده شد. سپس محلول حاوی نانوذرات نقره سنتز شده به فالکون‌های استریل ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و در سانتریفیوژ با ۵۰۰۰rpm 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 ٤٥ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت

منتقل شد. رسوب بدست 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 شد.

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 موج‌هائی 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 انجام شد.

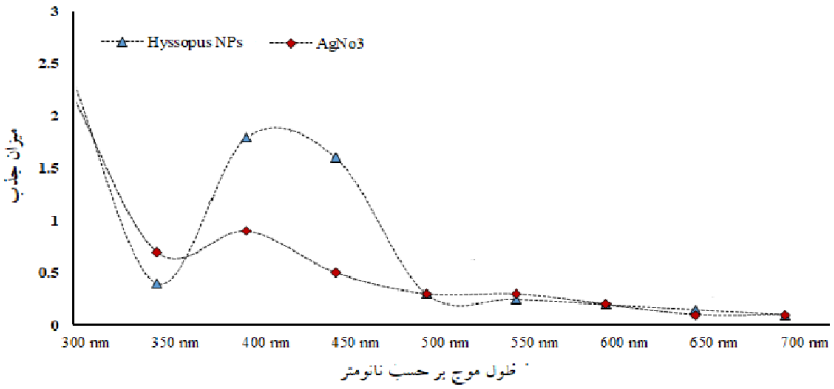
بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره و نانوذرات نقره سنتز شده: به منظور بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده، از دو باکتری گرم منفی *اشرشیا کولی* (PTCC 1330) و گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112) استفاده شد. ابتدا جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) نانوذرات نقره سنتز شده، از روش میکرودایلوشن و معرف تترازولیوم کلراید استفاه 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(Shaik *et al*., 2018).

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 (A549، MCF-7 و HeLa) از بانک انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت مناسب (RPMI) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۵ درصد CO_2 کشت داده شد. نمونه‌هائی از هر یک از سلول‌های سرطانی با غلظت معین تهیه شد به نحوی که مقدار غلظت در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ تائی حدود ۵×۱۰^{٤} سلول بود. سپس سلول‌های سرطانی با غلظت‌های مختلف نانوذره نقره (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ٦/۲۵ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تیمار شدند. سپس جهت ارزیابی اثر سمیت نانوذرات روی سلول‌های سرطانی، از معرف MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لتر استفاده شد. به هر یک از چاهک‌ها مقدار ۲۰ میکرولیتر از محول MTT اضافه شد و به مدت ٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد و تاریکی گرماگذاری شدند. سپس به منظور حل نمودن کریستال‌های فورمازان، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، میزان جذب هر چاهک با استفاده از اسپکتروفتومتر و طول موج ۵۷۰ نانومتر

اندازه‌گیری شد. غلظتی که سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی به میزان ۵۰ 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 روی میزان جذب نمونه کنترل تعیین شد و با ضرب نمودن مقدار به دست آمده در عدد ۱۰۰، درصد بقا برای هر نمونه سلول سرطانی بدست آمد (Gerlier and Thomasset, 1986).

نتایج و بحث

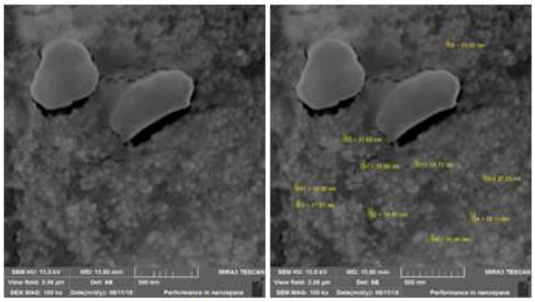
اولین نشانه به عنوان سنتز موفق نانوذرات نقره، تغییر رنگ مخلوط عصاره و محلول نیترات نقره به رنگ تیره در نظر گرفته شد. در بسیاری از مقالات، تغییر رنگ را به عنوان نشانه سنتز نانوذرات گزارش شده داده‌اند. تیره شدن محلول نیترات نقره در مجاورت عصاره گیاهی را می‌توان ناشی از پلاسمون سطحی دانست. متابولیت‌های ثانویه موجود در عصاره گیاهان داروئی با فرایند اکسیداسیون و احیاء مسئول تشکیل نانوذرات نقره می باشند. (Al-Sufyani *et al.*, 2019). براساس نتایج اسپکتروفتومتری، نانوذرات سنتز شده توسط عصاره زوفا در طول موج ۴۳۰ نانومتر بیشترین جذب را نشان دادند (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج جذب نانو ذرات و محلول نیترات نقره با استفاده از اسپکتروفتومتری(UV-Vis)

Fig1- Results of adsorption of nanoparticles and silver nitrate solution using spectrophotometric (UV-Vis)

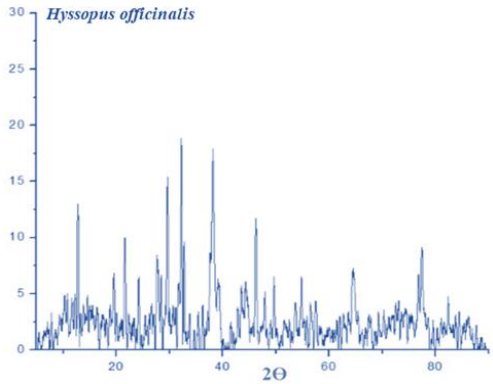
به منظور بررسی خصوصیات نانوذرات نقره سنتز شده، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) استفاده گردید. نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان داد که میانگین نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره زوفا اندازه‌ای بین ۲۴ تا ۱۹ نانومتر داشتند. دامنه اندازه نانوذرات سنتز شده توسط عصاره زوفا بین ۱۸ و ۳۰ نانومتر بودند. نانوذرات سنتز شده توسط عصاره داروئی کروی شکل بودند (شکل۲).



شکل۲- نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی(SEM)به منظور تعیین اندازه و شکل نانوذرات نقره

Fig 2 - Scanning electron microscope (SEM) results to determine the size and shape of silver nanoparticles

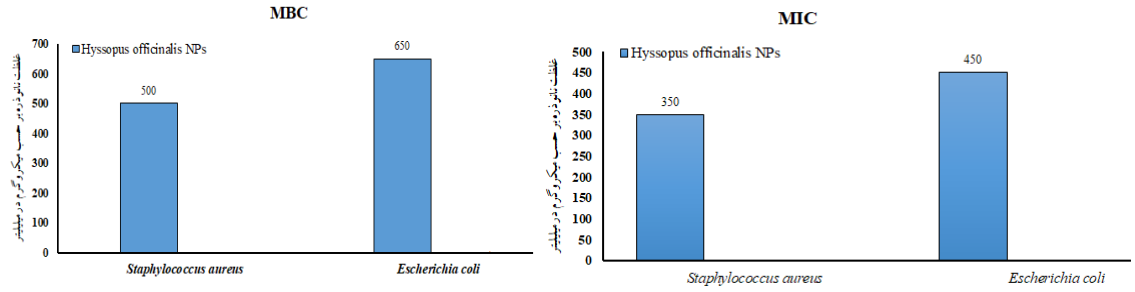
به منظور تائید نتایج به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی، از طیف سنجی پراش اشعه ایکس (XRD) استفاده شد. نتایج آزمون XRD پیک‌های در زوایای ۳۸/۱۵، ٤٤/٦١، ٤٩/٦١، ٥٧/٥١ و ٧٧/٢٦ درجه در نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره زوفا نشان داد که منطبق بر طیف استاندارد تجمع نقره بودند. (شکل ۳).



شکل ۳-نتایج آزمون پراش اشعه ایکس (XRD) به منظور تائیدسنتز نانوذرات نقره

Fig 3- X-ray diffraction (XRD) test results to confirm the synthesis of silver nanoparticles

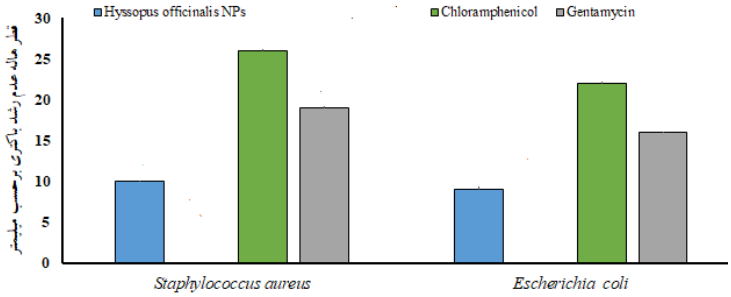
پس از تائید سنتز نانوذرات و بررسی خصوصیات فیزیکی آنها، اثرات ضد میکروبی تانوذرات نقره ستز شده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمون حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) برای تعیین اثرات ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که نانوذرات سنتز شده توسط عصاره زوفا سبب مهار باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت شده بود. 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* ٦٥٠ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* این میزان ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای نانوذرات سنتز شده توسط عصاره زوفا بود (شکل ٤).



شکل ٤- نتایج آزمون حداقل غلظت بازدارندگی غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانوذرات نقره روی باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*

Fig 4 - Minimum Inhibitory Concentration Test Results (MIC) and Minimum Inhibitory Concentration (MBC) of silver nanoparticles on Escherichia coli and Staphylococcus aureus

نتایج آزمون انتشار دیسک نشان داد که نانوذرات سنتز شده توسط عصاره گیاه داروئی زوفا 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).

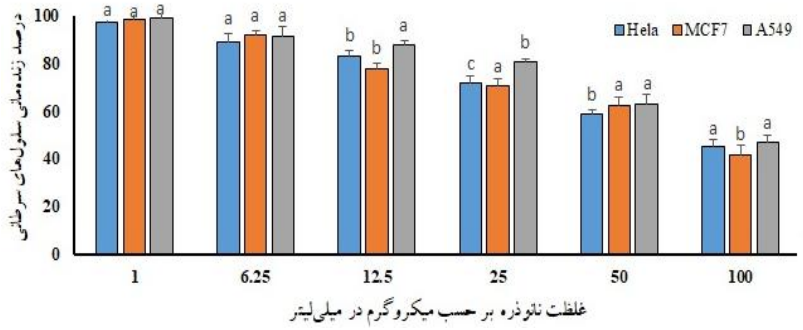


شکل۵- آزمون انتشار دیسک نانوذرات سنتزی با عصاره گیاه زوفا روی دو باکتری *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*

Fig 5 - Disk diffusion test of synthetic nanoparticles with hyssop extract on Escherichia coli and Staphylococcus aureus

نتایج تست ضد سرطانی به روش MTT نشان داد که اثر مهاری نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره زوفا بر روی رده‌های سلول سرطانی با افزایش غلظت نانوذرات بر میزان زنده‌مانی سلولهای سرطانی کاسته شد که نشان دهنده اثر متقابل مستقیم دوز بر میزان مهاری نانوذرات نقره بود. با مقایسه اثر مهاری نانوذرات نقره مختلف، مشاهده شد که نانوذرات سنتز شده توسط عصاره مرزنجوش نسبت به نانوذرات زوفا از اثر مهاری بیشتری برخوردار بودند و درصد زنده مانی رده‌های سلولی مختلف کمتر بود. در رابطه با هر دو نانوذره سنتز شده، بیشترین اثر مهاری با کاربرد ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. میانگین درصد اثر مهاری بر سلول‌های مختلف با استفاده از غلظت‌های مختلف نانوذرات مرزنجوش

۳۳ درصد بود. بیشترین اثر مهاری نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره مرزنجوش بر روی رده سلولی A549 مشاهده شد به طوریکه میانگین اثر مهاری بر روی این رده سلولی ۳۱ درصد بود. رده سلولی HeLa نیز با زنده مانی ٦٢ درصد، از نظر حساسیت در رتبه دوم قرار داشت. میانگین اثر مهاری نانوذرات سنتز شده توسط عصاره زوفا به طور متوسط ٢٤ درصد برآورد شد. نتایج نشان داد که برخلاف نانوذرات سنتز شده توسط عصاره مرزنجوش، تفاوت معنی‌داری بین اثر مهاری نانوذرات نقره سنتز شده توسط زوفا در رده‌های سلولی مختلف مشاهده نشد (شکل ٦).



شکل ٦- درصد بقای رده‌های سلولی A549، MCF7 و HeLa غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره سنتزی گیاه زوفا

Fig 6- Percentage survival of A549, MCF7 and HeLa cell lines of different concentrations of synthetic silver nanoparticles of Hyssop

بررسی نتایج ضد میکروبی: نانوذرات سنتز شده به روش زیستی به دلیل دارا بودن مزایای فراوان نسبت به سایر روش‌ها، بیشر مورد توجه هستند. گیاهان داروئی 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 (Roy *et al.*, 2018). در مطالعه حاضر نانوذرات نقره به روش زیستی به طور موفقیت‌آمیزی سنتز شد. نانوذرات نقره سنتز شده در طول موج ٤٣٠ و ٤٥٠ نانومتر بیشترین میزان جذب را نشان دادند. براساس نتایج مطالعات گذشته، افزایش ارتعاشات سطح پلاسمون و دامنه جذب نانوذرات نقره زیستی بین ٤٠٠ تا ٤٦٠ نانومتر گزارش شده است. در مطالعه حاضر میانگین قطر نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه داروئی زوفا برابر با ٢٤ 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 (Ruíz-Baltazar *et al.*, 2017). مطالعات گذشته نشان داده که طیف وسیعی از نانوذرات با اندازه و شکل متنوع را می‌توان براساس روش سنتز به دست آورد. ضمن اینکه شرایط سنتز نیز بر روی خصوصیات فیزیکی و شیمیائی 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

(Gliga *et al*., 2014). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه داروئی زوفا اثر کشندگی معنی‌داری بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی داشتند. گیاهان داروئی منبع غنی از متابولیت‌های مختلف از جمله پلی‌فنل‌ها، تانن‌ها و ترپن‌ها می‌باشد (Duletic *et al*., 2018). این گیاهان دارای خواص ضد میکروبی قوی است و امروزه به عنوان یک آنتی‌بیوتیک طبیعی موثر مورد استفاده قرار می‌گیرد. کاووسی و یعقوبی (۱۳۹۶) در مطالعه خود بیان داشتند که نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه داروئی توسط آن ها قطری بین ٤٠ تا ٧٠ 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 شیمیائی، فراوانی سویه‌های مقاوم باکتری‌های بیماری‌زا افزایش یافته است. مقاومت باکتریائی 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 ضخیم‌تری 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 (Blair *et al*., 2015). 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 فیزیکوشیمیائی منحصر به فرد از جمله نسبت سطح به حجم بالا و واکنش‌پذیری قوی، کاربردهای فراوانی پیدا کرده‌اند (Wang *et al*., 2017). 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 (Gliga *et al*., 2014).

بررسی نتایج ضدسرطانی: 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 (Lee *et al*., 2019). مطالعات قبلی نشان داده که متابولیت‌های

موجود در عصاره گیاه داروئی مرزنجوش علاوه‌بر اثر کشندگی و مهاری بر روی سلول‌های سرطانی، از بروز سرطان نیز جلوگیری می‌کنند (Athamneh *et al.*, 2020). براساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، اثرات ضد سرطانی نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی 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 (Firdhouse and Lalitha, 2015). اثر سمیت سلولی نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه داروئی 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 (Datta *et al.*, 2018). Raj Meena *et al.*, (2020) 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 طوریکه ٦٥ 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 (Sukirtha *et al.*, 2012). 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 (Folkman, 2002). نتایج مطالعات گذشته نشان داده که نانوذرات نقره سنتز شده توسط گیاهان داروئی، با مهار رگ‌زائی نقش مهمی در جلوگیری از توسعه و تولید سلول‌های سرطانی دارند (Shen *et al.*, 2015). 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 داروئی، برای تولید داروها و استفاده از روش‌های درمانی مناسب خواهد بود (Ratan *et al.*, 2020). نانوذرات چشم انداز جدیدی برای تشخیص،

محافظت و درمان انواع سلول‌های سرطانی در اختیار محققین قرار می‌دهند. به دلیل بهبود سرعت دستگاه های مختلف تشخیصی و راهکارهای درمانی، مرگ و میر ناشی از سرطان بطور قابل توجهی مهار شده است. متأسفانه، تاکنون روش موفقی برای انتخاب و اتصال دقیق داروها به سلول های سرطانی به منظور جلوگیری از سمیت و عوارض جانبی آنها ارائه نشده است. برای غلبه بر این وضعیت، سنتز نانوذرات به عنوان یک تکنینک جدیدی راه‌کارهای مناسبی در اختیار بخش پزشکی قرار داده است (He *et al.*, 2017).

نتیجه گیری کلی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تولید نانوذرات نقره توسط عصاره گیاهان داروئی به روش زیستی، ضمن سادگی و هزینه بسیار پائین، از ایمنی بالائی برخوردار است. نانوذرات نقره سنتز شده به دلیل اندازه کوچک و ساختار کروی، قادرند به راحتی از دیواره سلولی سلوهای 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 می‌توان با مطالعات بیشتر از نانوذرات نقره سنتز شده به عنوان کاندید دارو و آنتی بیوتیک جهت اهداف درمانی سرطان و عفونت‌های میکروبی استفاده نمود.

منابع

1) Akhtar, M., Panwar, J. and YS, Yun. 2013. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. ACS Sustainable Chemistry and Engineering, 1: 591.
2) Al-Sufyani, N.M., Hussien, N.A. and Y.M, Hawsawi. 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.
3) Athamneh, K., Alneyadi, A., Alsamri, H., Alrashedi, A., Palakott, A., El-Tarabily, *K., Eid, A., Dhaheri, Y.A. and R, Iratni. 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.
4) Bahar Yaqoob, S., Adnan, R., Rameez Khan, R.M. and M, Rashid. 2020. Gold, silver, and palladium nanoparticles: a chemical tool for biomedical applications. Frontiers in Chemistry: 8: 376.
5) Baranwal, A., Srivastava, A., Kumar, P., Bajpai, V.K., Maurya, PK. and P, Chandra. 2018. Prospects of nanostructure materials and their composites as antimicrobial agents. Front Microbiology. 9: 422.
6) Blair, M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O. and L.J, Piddock. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nature Review,13: 42.
7) Datta, P.K., Sandeep, A. and A, Sonu. 2018. Anti-proliferative effect of silver nanoparticles in HeLa cells due to enhanced oxidative stress. Research Journal of Biotechnology,13(2): 68.
8) Duletic, S., Alimpic´ Aradski, A., Kolarevic, S., Vukovic´-Gac˘ic´, B., Oaldje, M., Živkovic´, J., Šavikin, K. and P, Marin. 2018. Antineurodegenerative, antioxidant and antibacterial activities and phenolic components of *Origanum*

of *Origanum majorana* L. (Sweet marjoram). *J. Environ. Biol. Acad. Environ. Biol. India*. 28: 145.

19) Mu, W., Chu, Q., Liu, Y. and N, Zhang. 2020. A review on Nano‐based drug delivery system for cancer chemo immunotherapy. Nano-Micro Letters,12:142.
20) Nguyen, K.T. 2011. Targeted nanoparticles for cancer therapy: Promises and challenge. Nanomed. Nanotechnol, 2:5
21) Ovais, M., Khalil, A.T., Raza, A., Khan, M.A., Ahmad, I., Islam, N.U. and M, Saravanan. 2016. Green synthesis of silver nanoparticles via plant extracts: beginning a new era in cancer theranostics. Nanomedicine, 10: 2217.
22) Raj Meena, H.P., Singh, A.P. and K.K, Tejavath. 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.
23) Ratan, Z.A., Haidere, M.F., Nurunnabi, M.D., Shahriar, S., Ahammad, A.J.S. and Y.Y, Shim. 2020. Green chemistry synthesis of silver nanoparticles and their potential anticancer effects. Cancers, 12: 855.
24) Roy, A., Bulut, O., Some, S., Kumar, M., Mandal, A. and M.D, Yilmaz. 2018. Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. RSC Advances, 9: 2673.
25) Ruíz-Baltazar, A.J., Reyes-López, S.Y., Larrañaga, D., Estévez, M. and R, Pérez. 2017. Green synthesis of silver nanoparticles using a *Melissa officinalis* leaf extract with antibacterial properties. Results in Physics, 7: 639.
26) Shaik, M., Khan, M., Kuniyil, M., Al-Warthan, A., Alkhathlan, H.Z. and M.R.H, Siddiqui. 2018. Plant-extract-assisted green synthesis of silver nanoparticles using *Origanum vulgare* L. extract and their microbicidal activities. Sustainability, 10: 913.

majorana L. (Lamiaceae) extracts. Journal of Applied and Botany Food Quality: 91.

9) Fernando, S.S.N., Gunasekara, TDCP. and J, Holton. 2018.Antimicrobial nanoparticles: applications and mechanisms of action. Sri Lankan Journal of Infectious Diseases, 8 (1): 2.
10) Firdhouse, J.M. and P, Lalitha. 2015. Apoptotic efficacy of biogenic silver nanoparticles on human breast cancer MCF-7 cell lines. Prog Biomater, 4: 113.
11) Folkman, J. 2002. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. In Seminars in Oncology.Elsevier. Amsterdam, the Netherlands: 15.
12) Gerlier, D. and N, Thomasset. 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. Journal of Immunology Methods, 94(1-2):5763.
13) Gliga, A.R., Skoglund, S., Odnevall Wallinder, I., Fadeel, B. and H.L, Karlsson. 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.
14) He, Y., Li, X. and J, Wang. 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.
15) Iqbal, S., Fakher-e-Alam, M., Akbar, F., Shafiq, M., Atif, M. and N, Amin. 2019. Application of silver oxide nanoparticles for the treatment of cancer. Journal of Molecular Structure, 1189: 203.
16) Kavoosi, S. and H, Yaghoubi. 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.
17) Lee, S.H. and B.H, Jun. 2019. Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. International Journal of Molecular Science, 20: 865.
18) Leeja, L. and J, Thoppil. 2007. Antimicrobial activity of methanol extract

27) Sharma, A., Goyal, A.K. and G, Rath. 2018. Recent advances in metal nanoparticles in cancer therapy. Journal of Drug Target, 8.
28) Sharma, D., Kanchi, S. and K, Bisetty. 2015. Biogenic synthesis of nanoparticles: A review. Arabian Journal of Chemistry, 12: 3576.
29) Shen, H.H., Chan, E.C., Lee, J.H., Bee, Y.S., Lin, T.W. and G.J, Dusting. 2015. Nanocarriers for treatment of ocular neovascularization in the back of the eye: New vehicles for ophthalmic drug delivery. Nanomedicine, 10: 20932107.
30) Sukirtha, R., Manasa Priyanka , K., Antony, J.J., Kamalakkannan, S. and P, Balasubramanian. 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.
31) Vickers, A. 2004. Alternative cancer cures: “Unproven” or “disproven”? CA A Cancer Journal. 54: 110.
32) Wang, L., Hu, C. and L, Shao. 2017. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. International Journal of Nanomedicine, 12: 1227.
33) Yesilot, S. and C, Aydin. 2019. Silver nanoparticles; a new Hope in cancer therapy? Eastern Journal of Medicine, 24 (1): 111.
34) Yin, I.X., Zhang, J., Zhao, I., Mei, M.L., Li, Q. and C.H, Chu. 2020. The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. International Journal of Nanomedicine,15: 2555.
35) Zahran, M., El-Kemary, M., KhalifaM, S. and, H, El-Seedi. 2017. Spectral studies of silver nanoparticles biosynthesized by *Origanum majorana*. Green Processing and Synthesis, 11: 123.