

مقاله پژوهشی

ارزیابی خواص ضد اکسیدانی، ضد التهابی و ضد باکتریایی نانوذرات پلی‌لاکتیک کو گلیکولیک اسید (PLGA) بارگذاری شده با عصاره دود عنبرنسا

رویا مهدی‌زاده^۱، محسن فیروززای^۱، مسعود همایونی تبریزی^{۲*}، سیدجواد حسینی^۱

۱- گروه شیمی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

*مستول مکاتبات: mhomayouni6@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۹

DOI: 10.22034/ascij.2023.1979768.1465

چکیده

هدف از این مطالعه سنتز و بررسی اثرات ضد اکسیدانی، ضد التهابی و ضد باکتریایی نانوذرات پلی‌لاکتیک کو گلیکولیک اسید (PLGA) حاوی عصاره دود عنبرنسا است. برای این منظور دود عنبر نسا با استفاده از روش W1/O/W2 توسط نانوذرات PLGA محصور شد و با تکنیک‌های DLS، پتانسیل زتا، FESEM و میکروسکوپ الکترونی FTIR مشخص شد. فعالیت ضد اکسیدانی نانوذرات سنتز شده با استفاده از تست‌های ABTS و FRAP و همچنین اندازه‌گیری سطح بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و بیان اینترلوکین ۶ (IL-6) و اینترلوکین ۱۰ (IL-10) همچنین برای تعیین پتانسیل ضد التهابی نانوذرات با آزمون Real time PCR مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات سنتز شده بر روی دو سویه باکتریایی *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سوبتیلیس* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تشکیل نانوذراتی کروی با متوسط اندازه ۵۱/۲ نانومتر، شاخص پراکندگی ۰/۲۲، دارای شارژ سطحی ۳۵/۳۷- میلی‌ولت و راندمان کپسوله‌سازی ۷۴ درصد را نشان داد. خواص ضد اکسیدانی نانوذرات PLGA سنتز شده با کاهش Fe^{+3} ، مهار تشکیل رادیکال‌های آزاد و افزایش سطح بیان ژن‌های CAT و SOD تایید گردید. سطح بیان IL-6 و IL-10 نیز تحت تأثیر نانوذرات PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسا افزایش یافت که نشان‌دهنده خواص ضد التهابی نانوذرات پیشنهادی است. نانوذرات PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسا بر باکتری *Bacillus subtilis* اثر ضد باکتریایی داشت، اما بر *E. coli* تأثیری نداشت. نانوذرات PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسا دارای خواص ضد اکسیدانی، ضد التهابی است و می‌تواند به عنوان ترکیبی با پتانسیل ضد باکتریایی در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: عصاره آلی دود عنبرنسا، نانوذرات PLGA، ضد اکسیدان، ضد التهاب، ضد باکتری.

مقدمه

دارویی سنتزی در سال‌های اخیر به دلیل داشتن عوارض جانبی متعدد، طب جایگزین را به سمت ترکیبات سنتی و گیاهی سوق داده است که راه را برای طب مدرن باز کرده است (۲۲، ۳۱). در این پژوهش‌ها، دانشمندان به دنبال ترکیبات دارویی طبیعی با اثرات درمانی بیشتر و عوارض جانبی کمتر هستند. طب سنتی ایران منبع غنی از ترکیبات

دارویی سنتزی در سال‌های اخیر به دلیل داشتن عوارض جانبی متعدد، طب جایگزین را به سمت ترکیبات سنتی و گیاهی سوق داده است که راه را برای طب مدرن باز کرده است (۲۲، ۳۱). در این پژوهش‌ها، دانشمندان به دنبال ترکیبات دارویی طبیعی با اثرات درمانی بیشتر و عوارض جانبی کمتر هستند. طب سنتی ایران منبع غنی از ترکیبات

دستگاه تناسلی زنان، کاهش شدت خونریزی قاعدگی و کوتاه کردن دوره سندرم پیش از قاعدگی استفاده می‌کرد (۳۴). به طور کلی، مدفوع حیوانات حاوی مواد آلی، نیتروژن و مقادیر زیادی از گیاهان مصرف شده توسط حیوان است (۱۱). وجود موادی با فعالیت ضد باکتریایی نیز در عنبرنسارا گزارش شده است که ممکن است به دلیل میکرو فلور روده حیوان باشد (۳۲). همچنین گزارش شده است که دود به دلیل وجود فرمالدئید می‌تواند فعالیت باکتری‌کشی داشته باشد. هیدرولیز لیگنین در عنبرنسارا منجر به تشکیل اسیدهای ضعیف، مشتقات فوران و ترکیبات فنلی می‌شود. وجود فنل می‌تواند اثرات ضد التهابی عنبرنسارا را توجیه کند (۱۵). مطالعات دیگر اثرات عنبرنسارا را بر بهبود زخم و همچنین خواص سیتوتوکسیک آن در برابر سلول‌های سرطانی گزارش کرده‌اند (۶، ۱۲). به نظر می‌رسد این ترکیبات با خواص درمانی بالقوه زیادی که دارند به تحقیقات و آزمایشات بیشتری نیاز دارند (۲۸).

اگرچه شواهد زیادی برای حمایت از اثر درمانی فرآورده‌های طب طبیعی و سنتی وجود دارد، اما هنوز مشکلات و چالش‌های قابل توجهی در تجاری سازی گسترده این محصولات وجود دارد. فن‌آوری‌های جدید مانند فناوری نانو ابزارهایی هستند که می‌توانند طب سنتی را به طب مدرن پیوند دهند (۷، ۳۷). نانوتکنولوژی نقش اساسی در درمان بیماری‌ها با تحویل هدفمند و رهاسازی کنترل شده داروهای سنتی و مدرن دارد. نانوذرات می‌توانند تحویل دارو را با تجمع در بافت هدف بهبود بخشند و همچنین عوارض جانبی و دوز مورد نیاز دارو را کاهش دهند (۱). بنابراین، تحویل دارو توسط نانوحامل‌ها کارآمدتر بوده و علاوه بر تشخیص و درمان همزمان، می‌تواند فرصتی برای بهبود بیماری‌ها فراهم کند (۵، ۹).

پلی (لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید)، PLGA، یک پلیمر زیست‌تخریب‌پذیر با خواص جالب به عنوان یک نانوحامل است. این یک کوپلیمر آبریز است که عمدتاً از دو مونومر شامل اسید لاکتیک و اسید گلیکولیک

تشکیل شده است (۴). این نانوحامل توسط آژانس دارویی اروپا و سازمان غذا و داروی ایالات متحده به عنوان یک ماده ایده‌آل برای طراحی سیستم‌های دارورسانی تایید شده است (۳). PLGA به طور گسترده ای با تهیه نانوذرات حاوی عوامل آبدوست و آبریز سازگار است (۲۱، ۲۴). این ترکیب با توجه به اثرات نفوذپذیری و ماندگاری، تحویل پایدار و کنترل شده دارو و بهبود تجمع دارو در بافت هدف، امکانات مناسبی را برای راهبردهای درمانی فراهم می‌کند (۴). بسیاری از مطالعات کاربردهای سیستم‌های دارورسانی مبتنی بر PLGA را بررسی کرده‌اند و جنبه‌های مختلفی مانند روش‌های آماده‌سازی نانوذرات و میکروذرات مبتنی بر PLGA، نحوه جذب آنها توسط سلول‌های هدف، کنترل انتشار دارو و درمان‌های ترکیبی را ارزیابی کرده‌اند. اکثر این مطالعات کارایی بالای PLGA را تایید کرده‌اند (۸، ۳۰، ۳۵). بر این اساس، هدف از مطالعه حاضر کپسوله‌سازی عصاره آلی دود عنبرنسارا در نانوذرات PLGA و ارزیابی خواص درمانی آن شامل خواص ضداکسیدانی، ضدالتهابی و ضد باکتریایی آن است.

مواد و روش‌ها

استخراج دود عنبر نسارا: ابتدا یک کیلوگرم سرگین الاغ ماده در فصل بهار از روستاهای اطراف مشهد جمع‌آوری شد و پس از انتقال به آزمایشگاه نمونه‌ها کاملاً خشک شد. برای سوزاندن یک کیلوگرم عنبرنسارا، نمونه‌ها را خرد کرده و به صورت نسبی در یک فلاسک ریخته و تا دمای ۳۰۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد. برای ادامه سوختن، هر ۵ دقیقه یک پاف اکسیژن به سیستم اسپری شد. از طریق خروجی، دود به یک بشر حاوی ۸۰ میلی‌لیتر هگزان و ۱۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر هدایت شد. محلول دود جمع‌آوری شده به مدت ۳ روز در هوای آزاد قرار داده شد تا حلال تبخیر شود. سپس ۲۰ میلی‌گرم از دود استخراج شده در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و برای سنتز نانوذرات PLGA استفاده شد (۱۲).

کردن جمع‌آوری و جذب آن ارزیابی شد. در ادامه میزان جذب غلظت‌های مختلف عصاره دود عنبر نسا را ارزیابی و منحنی استاندارد چگالی نوری (OD) در مقابل غلظت‌های مختلف رسم شد. پس از اندازه‌گیری OD عصاره آزاد در طول موج ۴۲۰ نانومتر و قرار دادن قرائت‌ها در معادله به دست آمده از منحنی استاندارد، %EE از تفاوت بین مقدار کل عصاره و عصاره آزاد محاسبه شد.

بررسی توان ضد اکسیدان PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسا: آزمون **ABTS**: ابتدا ۲ میلی‌لیتر از محلول ۷ میلی‌مولار **ABTS** با ۱ میلی‌لیتر پرسولفات پتاسیم ۲/۴۵ میلی‌مولار مخلوط شده و به مدت ۱۶ ساعت در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس این محلول تا رسیدن به میزان جذب ۰/۷۵ در طول موج ۷۳۴ نانومتر، با آب مقطر رقیق‌سازی شد. در ادامه غلظت‌های مشخصی از نانوذرات به میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه و حجم برابری رادیکال آزاد به هر میکروتیوپ اضافه شد. پس از یک ساعت انکوباسیون در در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، OD این محلول در ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. از **BHA** به عنوان مرجع و از آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد. درصد فعالیت ضد اکسیدانی از رابطه زیر محاسبه شد (۳۳).
فعالیت مهار رادیکال (%) = (کنترل OD - نمونه OD) / کنترل OD × 100

آزمون FRAP: ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر از بافر استات ۳۰۰ میلی‌مول/لیتر با ۱ میلی‌لیتر **TPTZ** محلول در اسید کلریدریک ۴۰ میلی‌مول/لیتر مخلوط شد و سپس به آن ۲۰ میلی‌مول در لیتر کلرید آهن اضافه شد. پس از رساندن دمای محلول به ۳۷ درجه سانتیگراد، OD آن در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد **FeSO4** در همان طول موج رسم شد و مقادیر **FRAP** برای **PLGA** بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسا بر اساس منحنی استاندارد تعیین شد (۲۰).

سنتز نانوذرات PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسا: نانوذرات با روش انتشار/تبخیر حلال دوگانه امولسیون (W1/O/W2) مطابق با روش Sainz و همکاران تهیه شدند. برای این منظور ابتدا ۵۰ میلی‌گرم **PLGA** در ۱۳/۵ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان به عنوان فاز آلی حل شد. سپس ۲۰ میلی‌گرم دود حل شده در ۱ میلی‌لیتر آب به محلول اضافه شد و به مدت ۶۰ ثانیه تحت سونیکاسیون قرار گرفت (تهیه فاز W1/O). به محلول **W1/O** ۴ میلی‌لیتر **PVA** دو درصد به عنوان تثبیت کننده اضافه شد و به مدت ۴ دقیقه (محلول ثانویه) سونیک شد. در ادامه به محلول ثانویه ۱۰ میلی‌لیتر **PVA 0.1** درصد اضافه شد و به مدت ۲ ساعت روی همزن قرار گرفت. امولسیون نهایی با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰-۴۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و به مدت ۱۰ دقیقه در نیتروژن مایع قرار گرفت. نانوذرات به دست آمده پس از شستشو با استفاده از خشک کن انجمادی خشک و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

مشخصه‌یابی نانوذرات PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسا: خصوصیات فیزیکی سنتز نانوذرات **PLGA** بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسا توسط **FESEM** (تخمین اندازه ذرات و بررسی‌های مورفولوژیکی) و **DLS** (تعیین پتانسیل زتا) و خصوصیات شیمیایی به روش **FTIR** بررسی شد. برای اندازه‌گیری قطر متوسط و شارژ سطحی نانوذرات، ابتدا میزان مشخصی از نانوذرات در آب مقطر دیونیزه با غلظت ۱ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر تهیه شد و پس از دیسپرس شدن نانوذرات در آب، مخلوط حاصل در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد آنالیز گردید. به منظور بررسی گروه‌های عاملی نانوذرات، از روش **FTIR** استفاده شد. برای این منظور مخلوطی از نانوذرات و **KBr** تهیه و در دستگاه خاصی به صورت قرص فشرده تهیه شد و در ادامه قرص‌ها در دستگاه **FTIR** آنالیز گردید.

بررسی بازده کپسوله شدن دارو: به منظور تعیین راندمان کپسولاسیون (%EE)، مایع رویی حاصل از مرحله کپسوله

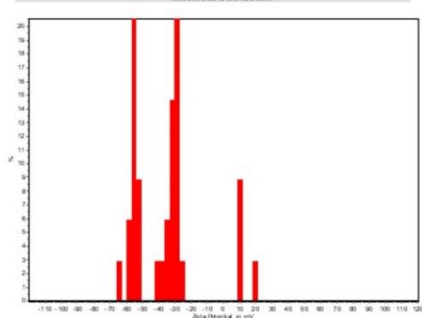
بررسی اثرات ضد باکتریایی PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسارا و عصاره دود عنبرنسارا: در این بررسی از باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* جهت بررسی اثرات ضد باکتریایی نانوذرات استفاده شد. این دو سویه از بانک میکروبی تهیه و روی محیط‌های کشت افتراقی مانیتول سالت آگار و خون آگار کشت داده شدند و پس از انکوباسیون در دمای ۳۹ درجه سانتیگراد، سوسپانسیون باکتریایی تهیه شد. روش انتشار دیسک (DDM) برای ارزیابی خواص ضد باکتریایی انتخاب شد. بدین منظور ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و سپس دیسک‌های مورد نظر به آرامی و در فواصل استاندارد روی محیط کشت شدند. از دیسک جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. دو دیسک کاغذی خالی در ۴۰ میکرولیتر PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسارا و عصاره دود عنبرنسارا خالی غوطه ور شدند و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد. پس از ۲۴ ساعت، قطر ناحیه بازدارنده (ZOI) اندازه‌گیری شد و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تجزیه و تحلیل شدند (۱۸).

بررسی تغییرات بیان ژن‌های ضد اکسیدانی و ضد التهابی: سطح بیان ژن‌های کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به عنوان دو عامل مهم در دفاع ضد اکسیدانی و تغییرات بیان ژن‌های اینترلوکین به منظور بررسی اثرات نانوذرات بر پروسه التهاب مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب سلول‌های A2780 ابتدا با غلظت‌های مختلف PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسارا (۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) تیمار شدند و پس از ۴۸ ساعت، RNA با استفاده از کیت تجاری و طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. کیفیت RNA با الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد. در ادامه DNA مکمل با الگو قرار دادن RNA با استفاده از کیت فرمنتاز و طبق پروتوکل شرکت سازنده سنتز شد و cDNA حاصل، به همراه پرایمرهای اختصاصی، آب و سایبرگرین برای بررسی تغییرات بیان ژن‌های مورد نظر در واکنش Real Time PCR قرار گرفت و تحت برنامه زمانی دمایی ویژه ای آنالیز شد. نتایج با استفاده از روش $\Delta\Delta Ct$ تجزیه و تحلیل شد و تغییرات نسبی در بیان ژن مشخص شد. ژن GAPDH به عنوان یک مرجع استفاده شد.

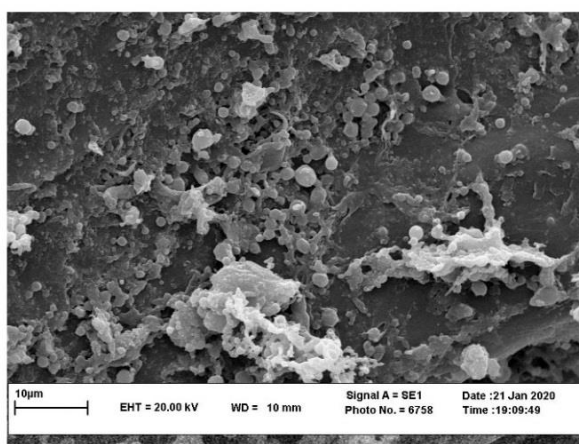
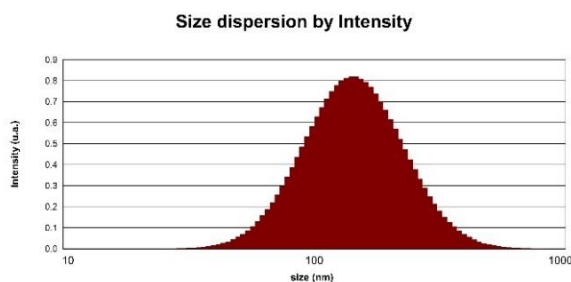
جدول ۱. توالی پرایمرهای فوروارد و معکوس مورد استفاده در آزمون Real time PCR

Genes primer sets			
GAPDH	F: 5'GCAGGGGGGAGCCAAAACGGT 3'	R: 5' TGGGTGGCAGTGATGGCATGG 3'	
CAT	F: 5' CGTGCTGAATGAGGAACAGA 3'	R: 5' AGTCAGGGTGGACCTCAGTG 3'	
SOD	F: 5' CAGCATGGGTTCCACGTCCA 3'	R: 5' CACATTGGCCACACCGTCTCT 3'	
IL-6	F: 5' CAAATTCGGTACATCCTC 3'	R: 5' CTGGCTTGTTTCTCACTA 3'	
IL-10	F: 5' TGGAGGACTTTAAGGGTTAC 3'	R: 5' GATGTCTGGGTCTTGTT 3'	

Statistics	
Mobilities:	Zeta Potential
Mean: -2.75 $\mu\text{m}^2/\text{s/V/cm}$	Mean: -35.37 mV
Standard Deviation: 1.67	Standard Deviation: 21.46
Number of Trackings: 34	Coefficient: 12.86



Cumulants method			
Zaverage (nm):	140.13		
Dv10:	48.99	Dv50:	112.23
Dv90:	281.81	PDI:	0.2230
Dmean Intensity:	160.42	Dmean volume:	145.00
		Dmean number:	51.24



شکل ۱- الف) اندازه (۵۱/۲۴) و شاخص پراکندگی (۰/۲۲) نانوذرات PLGA بارگذاری شده با عصاره دود عنبرنسا را با روش DLS. ب) شارژ سطحی نانوذرات PLGA بارگذاری شده با عصاره دود عنبرنسا را (۳/۳۵- میلی ولت) ج) تصویر FESEM از نانوذرات PLGA بارگذاری شده با عصاره دود عنبرنسا را

نتایج

سنتز شده دارای انرژی بالایی برای جلوگیری از آگلومره شدن ذرات می‌باشند و بنابراین می‌توان گفت نانوذرات سنتز شده دارای پایداری بالایی می‌باشند. بررسی مورفولوژی نانوذرات با میکروسکوپ FESEM تشکیل نانوذراتی کروی با ابعاد زیر ۱۰۰ نانومتر و در محدوده ۵۰ نانومتر را نشان می‌دهد که با نتایج حاصل از داده‌های DLS در ارتباط با قطر واقعی نانوذرات مطابقت دارد (شکل ۱). شکل ۲ طیف FTIR با استفاده از IRPal نسخه ۳۴۱۳ ۲۰ تفسیر شده را نشان می‌دهد. یک پیک در ۳۴۱۳ سانتی‌متر نشان دهنده پیوند هیدروژنی (O-H) و دو پیک در ۲۹۱۹ سانتی‌متر و ۲۸۵۱ سانتی‌متر نشان دهنده پیوند

مشخصه‌یابی نانوذرات PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسا را: بررسی اندازه ذرات نشان داد ذرات تشکیل شده دارای متوسط قطر واقعی ۵۱/۲۴ نانومتر و قطر هیدرودینامیکی ۱۴۰/۱۳ نانومتر می‌باشند. شاخص پراکندگی نانوذرات ۰/۲۲ گزارش شده است که نشان‌دهنده تشکیل ذراتی تک پراکنده می‌باشد. شارژ سطحی نانوذرات با روش زتا سایزر ارزیابی شد نتایج نشان داد نانوذرات سنتز شده دارای بار سطحی منفی می‌باشند. از آن جا که نانوذرات پلیمری PLGA دارای بار منفی می‌باشند لذا این نتایج موفقیت در سنتز را نشان داده است. از طرفی بررسی بار سطحی نشان داد نانوذرات

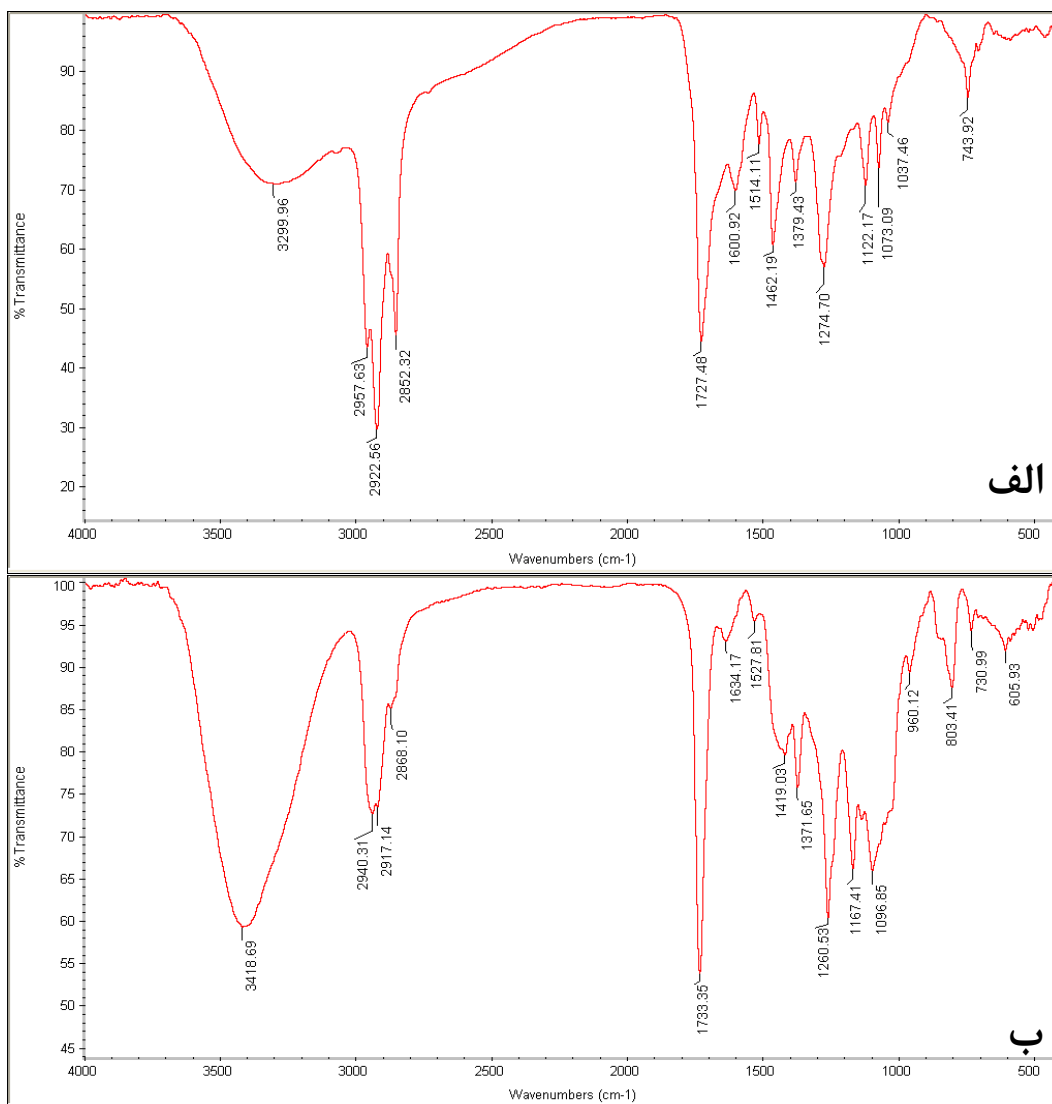
C-H است. این پیک‌ها عصاره دود عنبرنسارا و پوشیده شده با نانوذرات PLGA را تایید می‌کنند.

بررسی بازده کپسوله شدن دود در نانوذرات PLGA: همچنین بر اساس قرارگیری میزان OD در معادله به‌دست‌آمده از منحنی استاندارد، درصد کپسوله شدن دود در نانوذرات ۷۴/۸ درصد گزارش شد (شکل ۳). بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی نانوذرات با مهار رادیکال‌های آزاد ABTS محاسبه شد. این نتایج میزان غلظت میانه برای مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد را در حدود ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد. همانگونه که مشاهده می‌گردد میزان مهار رادیکال‌های آزاد توسط نانوذرات در مقایسه با BHA به عنوان ضد اکسیدان استاندارد پایین تر می‌باشد با این حال می‌توان گفت نانوذرات اثر مهاری بالایی بر رادیکال‌های آزاد نشان داده‌اند (شکل ۴).

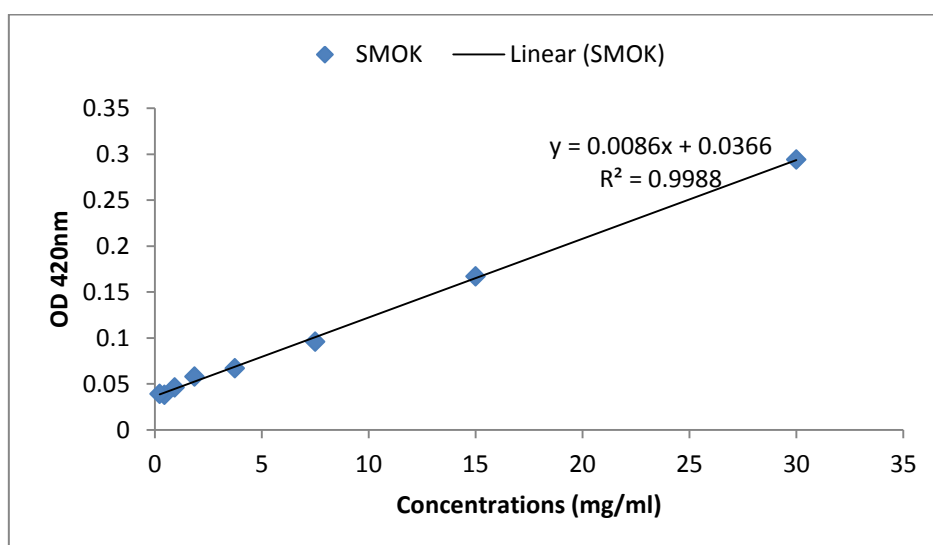
با توجه به مقادیر FRAP به دست آمده برای غلظت‌های مختلف نانوذرات PLGA بارگذاری شده با عصاره دود عنبرنسارا، این نانوذرات با افزایش تولید Fe^{2+} -TPTZ از Fe^{3+} -TPTZ دارای فعالیت ضد اکسیدانی هستند. در (شکل ۵ الف) نمودار استاندارد برای غلظت‌های مختلف $FeSO_4$ رسم شده است. بررسی (شکل ۵ ب) نشان می‌دهد نانوذرات در غلظت ۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر میزان $FeSO_4$ قادر به مهار یون‌های آهن می‌باشند.

نتایج آنالیز ملکولی افزایش بیان ژن کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز به عنوان ژن‌های ضد اکسیدانی را نشان داد. این نتایج نشان دهنده فعال شدن پروسه ضد اکسیدانی در طی درمان با نانوذرات می‌باشد (شکل ۶). روش انتشار

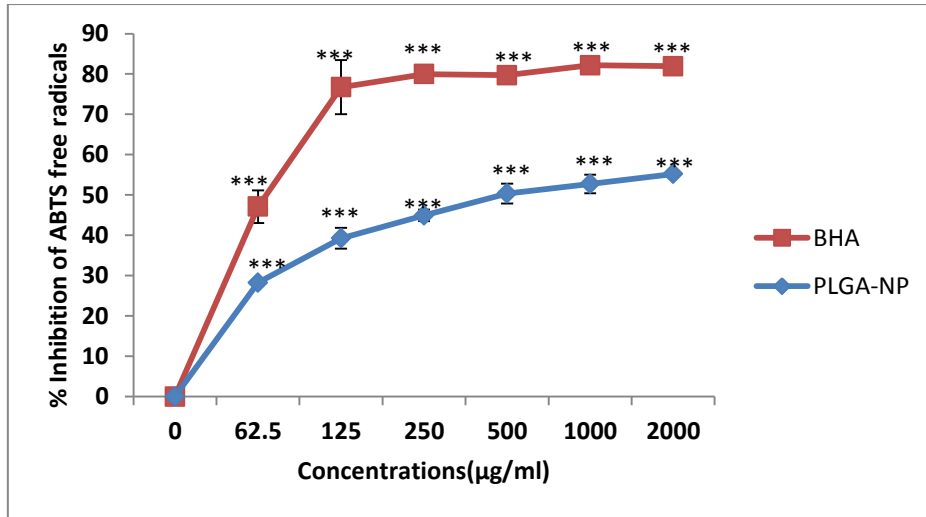
دیسک برای ارزیابی اثر ضد باکتریایی PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسارا و عصاره دود عنبرنسارا نشان داد که PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسارا و عصاره دود عنبرنسارا می‌توانند رشد *B. subtilis* را مهار کنند. این اثر بازدارندگی در PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسارا (قطر $ZOI = 17$ میلی‌متر) بیشتر از عصاره دود عنبرنسارا خالی (قطر $ZOI = 13$ میلی‌متر) بود. از سوی دیگر، قطر ZOI جتتامایسین به عنوان کنترل مثبت ۱۶ میلی متر بود که نشان دهنده اثر بازدارندگی بیشتر PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسارا نسبت به جتتامایسین است (شکل ۷). به منظور بررسی توان ضد التهابی نانوذرات میزان بیان ژن ایترولوکین ۶ به عنوان ژن پروالتهابی و ژن ایترولوکین ۱۰ به عنوان ژن ضد التهاب مورد ارزیابی قرار گرفت. شکل ۸ الف نتایج آنالیز ملکولی افزایش بیان ژن ایترولوکین ۶ به عنوان ژن پروالتهابی را نشان می‌دهد. این نتایج نشان دهنده فعال شدن پروسه التهاب در طی درمان با نانوذرات می‌باشد با این حال افزایش بیان ژن به تنهایی نشانگر وقوع التهاب نمی‌باشد بنابراین در این بررسی ژن ضد التهابی ایترولوکین ۱۰ نیز ارزیابی شد. شکل ۸ ب بررسی میزان بیان ژن ایترولوکین ۱۰ افزایش بیان بالای این ژن را در هر دو غلظت مورد بررسی نشان می‌دهد. این ژن از جمله ژن‌های ضد التهابی به شمار می‌رود که افزایش بیان آن می‌تواند سبب سرکوب پروسه التهاب گردد.



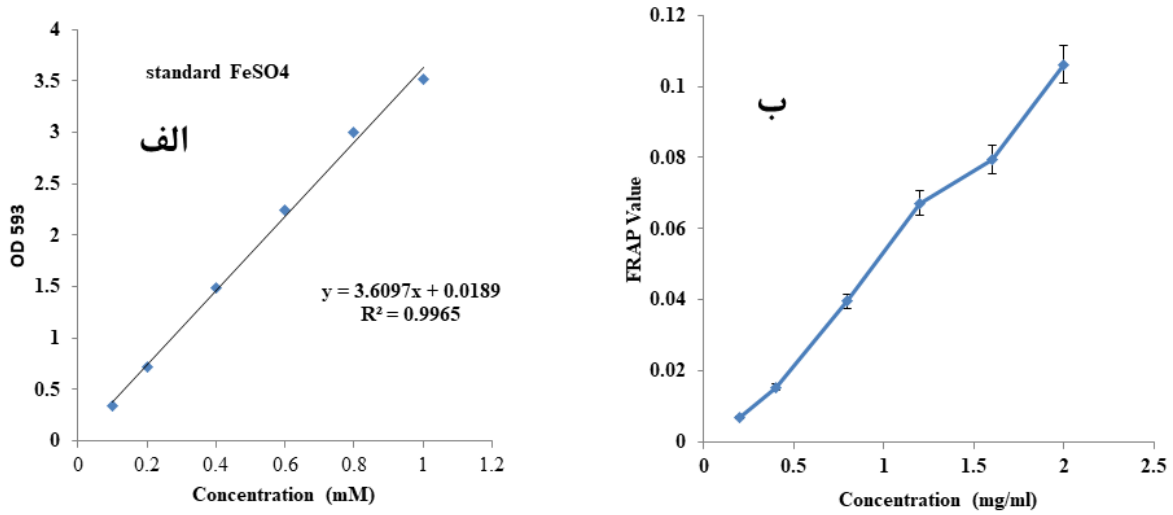
شکل ۲- طیف FTIR (الف) عصاره دود عنبر نسارا (ب) نانوذرات PLGA بارگذاری شده با عصاره دود عنبر نسارا



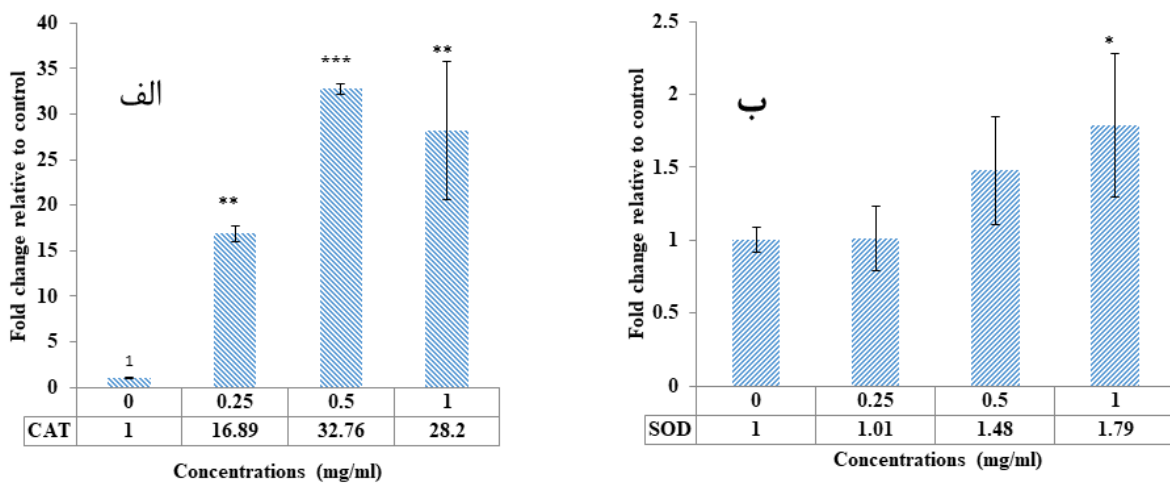
شکل ۳- منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف دود عنبر نسارا



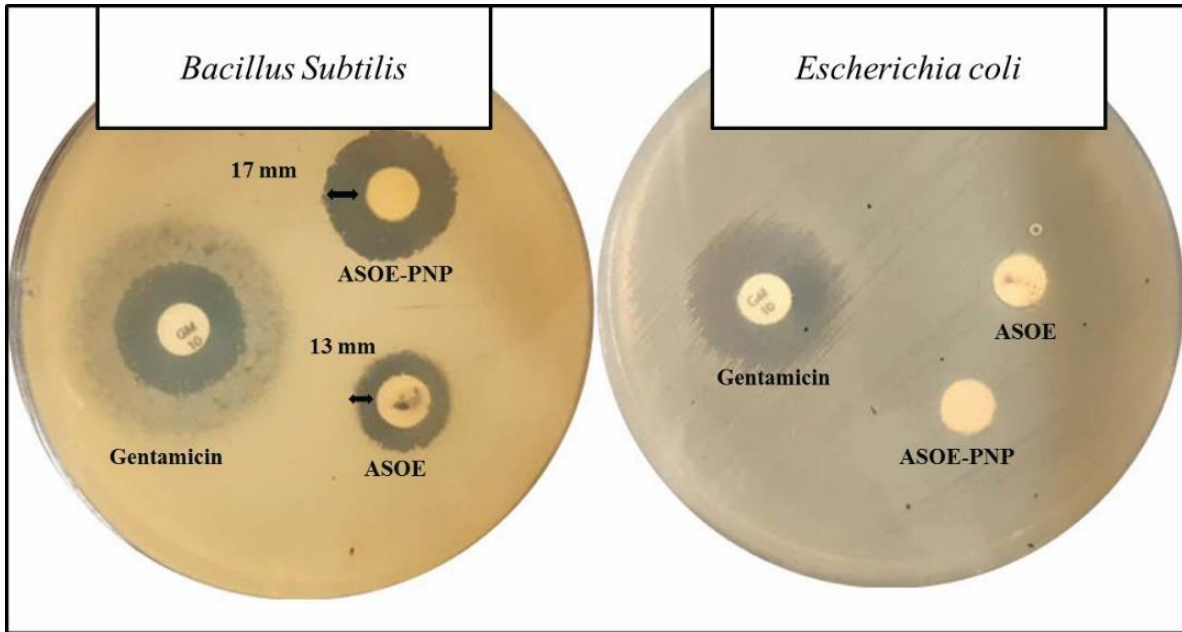
شکل ۴- بررسی اثر ضد اکسیدانی نانوذرات PLGA بارگذاری شده با عصاره دود عنبرنسا را به روش ABTS



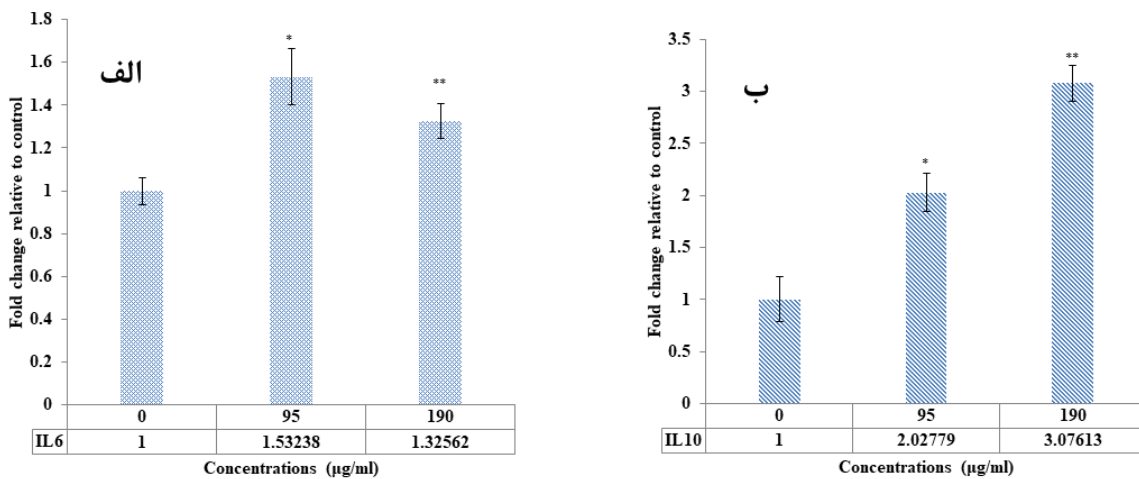
شکل ۵- الف) نمودار استاندارد FeSO4 (ب) نمودار FRAP Value برای نانوذرات PLGA بارگذاری شده با عصاره دود عنبرنسا را



شکل ۶- الف) ارزیابی میزان بیان ژن‌های ضد اکسیدانی کاتالاز (ب) سوپر اکسید دیسموتاز در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات در مقایسه با کنترل داده‌ها با میانگین \pm انحراف معیار و $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$ معنی دار در نظر گرفته شدند.



شکل ۷- نتایج تست ضد باکتریایی نانوذرات PLGA بارگذاری شده با عصاره دود عنبرنسا (ASOE-PNP) و عصاره دود عنبرنسا (ASOE) با روش دیسک انتشاری



شکل ۸- (الف) ارزیابی میزان بیان ژن اینترلوکین ۶ در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات در مقایسه با کنترل (ب) ارزیابی میزان بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات در مقایسه با کنترل داده‌ها با میانگین \pm انحراف معیار و $p < 0.05$ و $p < 0.01$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

بحث

داروها یا مولکول‌های شبه دارو ایفا کرده است نانوذرات به عنوان حامل داروهای آبرگیز با مولکول‌های درمانی مانند mRNA، siRNA و DNA عمل می‌کنند (۱۴). نانوپزشکی از زمان پیدایش خود راه درازی را پیموده است و پیشرفت‌های زیادی داشته است (۱۹). نانوپزشکی قدرت کنترل بیماری‌های انسانی مانند سرطان، عفونت‌ها و بیماری‌های عصبی، عضلانی و قلبی را دارد (۲۳). در

در این بررسی دود عنبرنسا با استفاده از سوزاندن جمع آوری شد و سپس با روش تبخیر حلال امولسیون دوگانه در نانوذرات PLGA بارگذاری شد. نانوذرات تشکیل شده کروی دارای اندازه ۵۱/۲۴ نانومتر و پراکندگی ۰/۲۲ بود. شارژ سطحی نانوذرات ۳۵/۳۷- گزارش شد که نشان دهنده تشکیل ذراتی پایدار می‌باشد. نانوتکنولوژی اخیراً نقش بسیار مهمی در گسترش تنوع و در دسترس بودن

است (۲۸). نشان داده شده است که عنبرنسا را بر اینترلوکین‌های التهابی و سیتوکین‌ها تأثیر می‌گذارد اینترلوکین ۶ و ۱۰ هر دو خاصیت پیش التهابی و ضد التهابی دارند اینترلوکین ۶ در درجه اول اثرات ضد التهابی دارد و پروتئین‌های فاز حاد مانند CRP را از سلول‌های کبدی آزاد می‌کند CRP همچنین به عنوان یک مولکول پیش التهابی و ضد التهابی عمل می‌کند (۱۶). اینترلوکین ۱۰ در حالت ضد التهابی، با تحریک سیستم ایمنی، از تهاجم سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند (۱۷). با توجه به نتایج مطالعه حاضر، سطح بیان اینترلوکین ۶ و ۱۰ در سلول‌های A2780 تیمار شده با PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسا را افزایش یافت که نشان دهنده اثر ضد التهابی و در نتیجه پتانسیل ضد سرطانی این نانوذرات است. سایر مطالعات در این زمینه پانندی و همکاران اثر نانوذرات PLGA بارگذاری شده با روتین بر روی سلول‌های سرطان کبد را بررسی کرد و نشان داد که IL-6، IL-1 β و TNF- α توسط این نانوذرات کاهش می‌یابد (۱۶). همانطور که گفته شد، اینترلوکین ۶ می‌تواند خواص پیش التهابی و ضد التهابی داشته باشد که عملکرد آن باید با توجه به سایر عوامل و انواع سلول‌های مورد مطالعه ارزیابی شود. اثر ضد باکتریایی دود عنبرنسا را به ترکیب خوراک و گیاهان مصرفی حیوان بستگی دارد. با این حال، مطالعات نشان داده است که دود حاصل از سوزاندن خوراک دام هیچ اثر ضد باکتریایی مشابه مدفوع حیوانات ندارد. این احتمال وجود ترکیبات دیگر در فضولات حیوانی را افزایش می‌دهد که می‌تواند به دلیل فعل و انفعالات درون دستگاه گوارش و همچنین پروبیوتیک‌ها باشد. فرآیند تخمیر و هضم خوراک در دستگاه گوارش ممکن است باعث تولید سموم شود. اثر ضد باکتریایی دود عنبرنسا را به ترکیب خوراک و گیاهان مصرفی حیوان بستگی دارد (۱۷). حرارت باعث تبدیل مواد موجود در یک گیاه یا محصول به اجزای میکروسکوپی می‌شود و امکان جذب بیشتر ترکیبات را فراهم می‌کند (۱۰). طالبی و همکاران اثر دود

مطالعه حاضر، توانایی دارورسانی هدفمند نانوذرات PLGA برای کپسوله کردن دود عنبرنسا را مورد استفاده قرار گرفت و خواص درمانی مختلف آن مورد ارزیابی قرار گرفت. سنجش ABTS و FRAP نشان داد که نانوذرات PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسا دارای خواص ضد اکسیدانی است. این با افزایش بیان ژن‌های SOD و CAT تایید شد. بیان IL-6 و IL-10 تیمار شده با PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسا را به طور قابل توجهی افزایش یافت که نشان دهنده خواص ضد التهابی PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسا است. اثر ضد باکتریایی PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسا بر *E. coli* و *B. subtilis* نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان دهنده فعالیت ضد باکتریایی این نانوذرات بر *B. subtilis* بود. ضد اکسیدان‌ها موادی هستند که از اکسید شدن سایر مواد جلوگیری کرده و رادیکال‌های آزاد را خنثی می‌کنند (۳۶). ترکیبات پلی‌فنولی به عنوان گروهی از آنتی-اکسیدان‌ها اثرات درمانی زیادی در مبارزه با استرس اکسیداتیو دارند (۲۹). ماده اصلی موجود در دود عنبرنسا ۲-متوکسی-۴-وینیل فنل است که می‌تواند خواص ضد اکسیدانی آن را افزایش داده و رادیکال‌های آزاد را جذب کند (۲). شبستریان و همکاران خواص ضد اکسیدانی نانوذرات PLGA بارگیری شده با عصاره دود اسپند هارمالا را با سنجش DPPH، ABTS و FRAP گزارش کرد (۲۵). همانطور که گفته شد دود عنبرنسا به دلیل وجود ترکیبات فنلی خاصیت ضد اکسیدانی دارد. این خواص ضد اکسیدانی با کپسوله کردن آنها در نانوذرات PLGA و انجام آزمایشات مختلف در مطالعه حاضر تأیید شد. PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عنبرنسا این خاصیت را با کاهش آهن سه ظرفیتی، مهار تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش بیان کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز اعمال می‌کند.

خواص ضد التهابی عنبرنسا را در درمان بیماری‌های التهابی مانند استوماتیت آفتی و اوتیت میانی گزارش شده

Medicinal and Chemical Sciences, 3(3):245-253.

3. Chen H., Lui Y.S., Zhao J., Xu L. Tan L.P. 2018. Effect of solvent composition of electrospun PLGA fibers on paclitaxel release. *Materials Technology*, 33(11):716-722.

4. Chiu H.I., Samad N.A., Fang L., Lim V. 2021. Cytotoxicity of targeted PLGA nanoparticles: a systematic review. *RSC Advances*, 11(16):9433-9449.

5. Foroutan Koudehi M., Imani Fooladi A.A., Aghozbeni E.A.H., Nourani M.R. 2019. Nano bioglass/gelatin scaffold enhanced by nanosilver as an antibacterial conduit for peripheral nerve regeneration. *Materials Technology*, 34(13):776-784.

6. Joharchi K., Anaraki Firouz S.M., Mashhadiabbas F., Mansouri A., Shafiee H., Taheri J.B. 2020. Wound healing and the effect of ANNAS; a new product of AnbarNesa. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 15(2):e66668.

7. Khshemat V., Homayouni-Tabrizi M., Neamati A., Khadem F., Irani M. 2021. Fabrication, characterisation, and biological properties of chitosan nanoparticles containing rapeseed pollen extract (RPE) on the MCF-7 cell line. *Materials Technology*, 37(14):1-11.

8. Li Y., Liu L., Qu X., Ren L., Dai K. 2015. Drug delivery property, antibacterial performance and cytocompatibility of gentamicin loaded poly (lactic-co-glycolic acid) coating on porous magnesium scaffold. *Materials Technology*, 30(sup6):B96-B103.

9. Ma Z., Fan Y., Wu Y., Kebebe D., Zhang B., Lu P., Pi J., Liu Z. 2019. Traditional Chinese medicine-combination therapies utilizing nanotechnology-based targeted delivery systems: a new strategy for antitumor treatment. *International Journal of Nanomedicine*, 14:2029.

10. Mohammadi G., Valizadeh H., Barzegar-Jalali M., Lotfipour F., Adibkia K., Milani M., Azhdarzadeh M., Kiafar F., Nokhodchi A. 2010. Development of azithromycin-PLGA nanoparticles: Physicochemical characterization and antibacterial effect

عبرنسا را بر استافیلوکوکوس اورئوس و *B. subtilis* بررسی کرد و اظهار داشت که دود عبرنسا فقط بر روی استافیلوکوکوس اورئوس اثر ضد باکتریایی دارد (۳۲). پروین و همکاران همچنین گزارش کردند که دود عبرنسا می‌تواند رشد استافیلوکوکوس اورئوس و *P. aeruginosa* را مهار کند (۱۷).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر به طور کلی نشان داد که استفاده از فناوری‌های جدید مانند فناوری نانو می‌تواند فعالیت‌های زیستی دود عبرنسا را برای بهره‌گیری از پتانسیل درمانی آن افزایش دهد. PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عبرنسا ستنز شده در این مطالعه با ظاهر یکنواخت خود و ابعاد کوچک و پایدار توانسته اثر ضد اکسیدانی، کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش کاهش آهن سه ظرفیتی از خود نشان دهد. آنها همچنین با افزایش بیان ژن‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز، و همچنین اثر ضد التهابی با افزایش بیان ژن‌های IL-10 و IL-6، فعالیت ضد التهابی را در سلول‌های A2780 نشان دادند. از دیگر خواص عصاره آلی دود عبرنسا و PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عبرنسا تایید شده در این مطالعه، اثر ضد باکتریایی بر علیه باسیلوس سوبتیلیس بود. به طور کلی، اثرات درمانی متعدد نشان می‌دهد که PLGA بارگذاری شده با عصاره آلی دود عبرنسا یک ترکیب ارزشمند است که نیاز به بررسی بیشتر در مطالعات آینده دارد.

منابع

1. Alhajamee M., Marai K., Al Abbas S.M.N. Homayouni Tabrizi M. 2021. Co-encapsulation of curcumin and tamoxifen in lipid-chitosan hybrid nanoparticles for cancer therapy. *Materials Technology*, 37(18):1-12.
2. Ataei Moghadam S., Rostami Charati F., Akbari R., Gholamalipour Alamdari E. Behmanesh B. 2020. Consideration antimicrobial and antioxidant properties of anbarnesa smoke ointment. *Journal of*

- informational supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 35(3):240.
19. Rajendran A., Vinoth G., Shanthi V., Barik R., Pattanayak D., 2014. Silver nano particle incorporated Ti metal prepared by chemical treatment for antibacterial and corrosion resistance study. *Materials Technology*, 29(sup1):B26-B34.
20. Rajurkar N.S., Hande S. 2011. Estimation of phytochemical content and antioxidant activity of some selected traditional Indian medicinal plants. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(2):146.
21. Rezvantalab S., Moraveji M.K. 2019. Microfluidic assisted synthesis of PLGA drug delivery systems. *RSC Advances*, 9(4):2055-2072.
22. Rinita J., Jose R., Jothi N.N. 2020. Acclimated growth and characterization of manganese oxide nanospheres using natural extract from *trigonella foenum-graecum*. *Materials Technology*, 36(5):1-8.
23. Saxena S.K., Nyodu R., Kumar S., Maurya V.K. 2020. Current advances in nanotechnology and medicine. *NanoBioMedicine*, 2020: 3-16.
24. Schoubben A., Ricci M., Giovagnoli S. 2019. Meeting the unmet: From traditional to cutting-edge techniques for poly lactide and poly lactide-co-glycolide microparticle manufacturing. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 49(4):381-404.
25. Shabestarian H., Homayouni Tabrizi M., Movahedi M., Neamati A., Sharifnia F. 2021. Putative mechanism for cancer suppression by PLGA nanoparticles loaded with *Peganum harmala* smoke extract. *Journal of Microencapsulation*, 38(5):324-337.
26. Shafiee H., Mortazavi H., Baharv M., Eslami G., Bakhtiari S., Taheri S., Namazi F., Asgari A., Azimi S., Joharchi K. 2012. Iranian traditional medicine: Comparison of the antibacterial effect of ANNAS 0.2% and chlorhexidine 0.2%. *African Journal of Microbiology Research*, 6(15):3600-3603.
27. Shafiee H.A., Moravej-Salehi E. 2015. Anbarnesa: The Past Tradition, the Future against *Salmonella typhi*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 80(1):34-39.
11. Moral R., Moreno-Caselles J., Perez-Murcia M., Perez-Espinosa A., Rufete B., Paredes C. 2005. Characterisation of the organic matter pool in manures. *Bioresource Technology*, 96(2):153-158.
12. Mousavi-Khattat M., Nourbakhshan H., Roumi M., Ebrahiminejad M., Fazeli Y., Shakeran Z., 2021. Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized using extract of animal waste as a traditional medicine on MCF-7 human breast cancer cell line. *SSRN Electronic Journal*, 10.21203/rs.3.rs-412407/v1.
13. Muhamad N., Plengsuriyakarn T., Na-Bangchang K. 2018. Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review. *International Journal of Nanomedicine*, 13:3921.
14. Mukherjee A., Bhattacharyya S. 2020. Nanotechnology in medicine. *Biotechnology Business-Concept to Delivery*, 2020:57-64.
15. Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1):25-33.
16. Pandey P., Rahman M., Bhatt P.C., Beg S., Paul B., Hafeez A., Al-Abbasi F.A., Nadeem M.S., Baothman O., Anwar F. 2018. Implication of nano-antioxidant therapy for treatment of hepatocellular carcinoma using PLGA nanoparticles of rutin. *Nanomedicine*, 13(8):849-870.
17. Parvin N., Validi M., Banitalebi M., Mobini G.R., Ashrafi K., Farrokhi E., Rafieian-Kopaei M., Akbari N., Safdari Dehcheshmeh F., Rafiee Vardanjani L. 2010. Effect of medicinal smokes on some nosocomial infection factors. *Journal of Shahrekord Uuniversity of Medical Sciences*, 12(2):76-83.
18. Patel J.B., Cockerill F., Bradford P.A. 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth

33. Thein-Han W., Misra R. 2009. Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 5(4):1182-1197.
34. Tonekaboni H. 2007. The Present for the Faithful (Tohfat ol momenin). Tehran: Research Center of Traditional Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Nashre Shahr Press.
35. Wu P., Zhou Q., Zhu H., Zhuang Y., Bao J. 2020. Enhanced antitumor efficacy in colon cancer using EGF functionalized PLGA nanoparticles loaded with 5-Fluorouracil and perfluorocarbon. *BMC Cancer*, 20:1-10.
36. Yashin A., Yashin Y., Xia X., Nemzer B. 2017. Antioxidant activity of spices and their impact on human health: A review. *Antioxidants*, 6(3):70.
37. Zhang R., Liu F., Tian Y., Cao W., Wang R. 2021. Nanotechnology in Traditional Medicines and Natural Products. *Frontiers in Chemistry*, 9: doi.org/10.3389/fchem.2021.633419.
28. Shafiee H.A., Motamedi M.H.K., Mina M., Taheri J.B., Azimi S., Joharchi K., Yadegari Z., Rasouli H.R. 2014. Evaluation of cytotoxic effects of Anbarnesa on fibroblast L929: Can it be used as a mouthwash? *Ancient Science of Life*, 33(4):203.
29. Stagos D. 2020. Antioxidant activity of polyphenolic plant extracts, Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
30. Swider E., Koshkina O., Tel J., Cruz L.J., de Vries I.J.M., Srinivas M. 2018. Customizing poly (lactic-co-glycolic acid) particles for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 73:38-51.
31. Taheri J.B., Azimi S., Rafieian N., Zanjani H.A. 2011. Herbs in dentistry. *International Dental Journal*, 61(6):287-296.
32. Talebi A., Harigh E., Dehdashtian E., Amini F., Meshkat M., 2017. Evaluation of the effect of smoke of Anbar Nasara (Donkey dung) extract on staphilococcus aureus and *Bacillus subtilis*.

Evaluation of Antioxidant, Anti-inflammatory and Antibacterial P with Anbernesara Smoke Extract

Roya Mahdizadeh¹, Mohsen Firoozrai¹, Masoud Homayouni Tabrizi^{2*}, Seyed Javad Hoseini¹

1- Department of Chemistry, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran

2- Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Abstract

The aim of this study is to synthesize and investigate the anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-bacterial effects of poly(lactic acid) (PLGA) nanoparticles containing the extract of *Anbernesara* smoke. For this purpose, *Anbernesara* smoke was extracted and encapsulated by PLGA nanoparticles using the W1/O/W2 method and characterized by DLS, zeta potential, FESEM and FTIR electron microscope techniques. The antioxidant activity of the synthesized nanoparticles using ABTS and FRAP tests, as well as measuring the expression levels of the antioxidant genes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) and the expression of interleukin 6 (IL-6) and interleukin 10 (IL-10) was also analyzed to determine the anti-inflammatory potential of nanoparticles by Real time PCR test. The antibacterial activity of the synthesized nanoparticles was evaluated on two bacterial strains *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. The results showed the formation of spherical nanoparticles with an average size of 51.2 nm, dispersion index of 0.22, surface's charge of -35.37 mV and encapsulation efficiency of 74%. The antioxidant properties of synthesized PLGA nanoparticles were confirmed by reducing Fe^{+3} , inhibiting the formation of free radicals and increasing the expression level of CAT and SOD genes. The expression levels of IL-6 and IL-10 genes were also increased under the influence of PLGA nanoparticles loaded with the organic extract of *Anbernesara* smoke, indicating the anti-inflammatory properties of the proposed nanoparticles. PLGA nanoparticles loaded with the organic extract of *Anbernesara* smoke had an antibacterial effect on *B. subtilis*, but not on *E. coli*. The PLGA nanoparticles loaded with the organic extract of *Anbernesara* smoke have anti-oxidant, anti-inflammatory properties and can be considered as a combination with antibacterial potential.

Keywords: Organic extract of *Anbernesara* smoke, PLGA nanoparticles, Anti-oxidant, Anti-inflammatory, Antibacterial