

Antibacterial and anticancer activities of silver nanoparticles fabricated by the *Artemisia scoparia* extract against lung cancer cell line (A549)

Moulaie S¹, Mirzaie A^{2*}, Aliasgari E¹

1- Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran.

2- Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, I. R. Iran.

Received: 2018/02/20 | Accepted: 2018/08/8

Abstract:

Background: In recent years, due to an increase in prevalence of cancer, there is a need to find new ways to control this disease. The aim of this study was to evaluate antibacterial and anti-cancer activities of silver nanoparticles (AgNPs) fabricated by *Artemisia scoparia* extract against lung cancer cell line (A549).

Materials and Methods: In this experimental study, AgNPs was synthesized and characterization of fabricated AgNPs was performed by scanning and transmission electron microscopy (SEM, TEM) methods. Subsequently, antibacterial activity of synthesized AgNPs was determined using the minimum inhibitory concentration (MIC) method. Moreover, cell toxicity of AgNPs against A549 cell line in 3.125-100 µg/mL concentrations was performed using the MTT method. The gene expression of *Bax* and *Bcl2* was measured using the real-time PCR.

Results: The results of SEM and TEM showed that the synthesized AgNPs had 33.40 nm average size. The MIC results demonstrated that the AgNPs had a significant antibacterial activity. In addition, the MTT results showed that AgNPs had dose-dependent cell toxicity. The real-time PCR results revealed that the *Bax* and *Bcl2* gene expression were up-regulated (2.34±0.34) and down-regulated (0.43±0.61), respectively ($P<0.05$).

Conclusion: According to the results of this study, the AgNPs had antibacterial and anticancer activities and it can be used as a drug candidate.

Keywords: Green synthesis, Silver nanoparticle, Lung cancer, *Artemisia scoparia*

* Corresponding Author: Amir Mirzaie

Email: A.mirzaie@riau.ac.ir

Tel: 0098 217 650 5891

Fax: 0098 217 650 7665

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2018; Vol. 22, No 5, Pages 487-496

بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی نانوذره نقره ساخته شده با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia scoparia* بر علیه رده سلولی سرطان ریه (A549)

سمیه مولایی^۱، امیر میرزایی^{۲*}، الهه علی عسگری^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: در سال‌های اخیر به دلیل افزایش شیوع مرگ‌ومیر ناشی از سرطان‌ها، نیاز به یافتن شیوه‌های جدید برای درمان سرطان افزایش پیدا کرده است. هدف از این مطالعه تعیین اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی نانوذره نقره ساخته شده با استفاده از عصاره گیاه *آرتمیزیاسکوپاریا* بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ابتدا نانوذرات نقره سنتز گردید و برای تایید ساختار و اندازه نانوذرات سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و گذاره (TEM) استفاده شد. به دنبال آن، اثرات ضد میکروبی نانوذره نقره سنتز شده با روش کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین، سمیت سلولی نانوذره نقره با استفاده از روش رنگ سنجی MTT در رده سلولی سرطان ریه در غلظت‌های ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بررسی شد. به علاوه، میزان بیان ژن‌های *Bcl2* و *Bax* با استفاده از روش Real-time PCR بررسی شد.

نتایج: نتایج میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM نشان داد که نانوذره سنتز شده دارای اندازه میانگین ۳۳/۴۰ نانومتر می‌باشد. نتایج MIC نشان داد که نانوذره نقره دارای اثرات ضد میکروبی است. همچنین، نتایج تست MTT نشان داد که نانوذره نقره دارای سمیت سلولی وابسته به دوز است. نتایج Real-time PCR نیز نشان داد که بیان ژن‌های *Bcl2* و *Bax* به ترتیب به اندازه ۲/۳۴±۰/۳۴ افزایش و ۰/۴۳±۰/۶۱ کاهش یافته است ($P < 0/05$ برای هر دو مقایسه).

نتیجه‌گیری: باتوجه به نتایج این مطالعه می‌توان گفت نانوذره نقره سنتز شده با استفاده از عصاره *آرتمیزیاسکوپاریا* دارای اثرات ضد سرطانی و ضد میکروبی بوده و می‌تواند به‌عنوان کاندید ترکیب دارویی مورد استفاده قرار بگیرد.

واژگان کلیدی: سنتز سبز، نانوذرات نقره، سرطان ریه، *آرتمیزیاسکوپاریا*

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۴، مهر و آبان ۹۷، صفحات ۴۹۶-۴۸۷

مقدمه

قابل توجه است که عملکرد نانوذرات نقره تحت تاثیر ویژگی‌های مختلف مانند شکل، اندازه، غلظت و هم‌چنین ترکیب شیمیایی آن قرار می‌گیرد [۵،۴]. هرچه ابعاد نانوذرات نقره کوچک‌تر باشند، عبور آنها از غشای بیولوژیکی سلول آسان‌تر می‌شود و اثرگذاری و قدرت نفوذ نانوذرات نقره در سلول بیشتر می‌شود [۷،۶]. با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در فناوری‌های پزشکی برای تشخیص و درمان سرطان، این بیماری هنوز به‌عنوان عامل تهدید کننده مرگ‌ومیر مطرح است، به طوری که یکی از سرطان‌های شایع دنیا، سرطان ریه است. در سراسر دنیا این نوع سرطان باعث مرگ-ومیر بسیاری از افراد می‌شود و در سال ۲۰۱۸ میزان ۱/۶۹ میلیون مرگ‌ومیر ناشی از این نوع سرطان گزارش شده است [۸-۱۰]. در سال‌های اخیر، به‌علت افزایش شیوع مرگ‌ومیر ناشی از سرطان و نقص روش‌های شیمی درمانی و رادیوتراپی در فرم‌های پیشرفته سرطان، نیاز به یافتن شیوه‌های جدید برای کنترل سرطان احساس می‌شود که یکی از این روش‌ها استفاده از نانوذرات به‌خصوص نانوذرات نقره است [۱۱]. نانوذرات نقره با اختلال در انتقال پیام سلولی، باعث ایجاد اختلال در شبکه ارتباطی سلولی می‌شوند و همچنین باعث آسیب رسانی به DNA سلولی می‌شوند [۱۳،۱۲].

تکنولوژی نانو، شناخت و کنترل مواد در ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر می‌باشد که سبب بروز خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی منحصر به‌فرد می‌شود و کاربردهای جدید را ممکن می‌سازد [۱]. بررسی‌های انجام گرفته حاکی از آن است که ۶۵ درصد از سهم نانوذرات جهان به نانوذرات نقره اختصاص یافته، به طوری که نانو-ذرات نقره در صنایع مختلف مانند پزشکی، داروسازی و زیست-فناوری مورد استفاده قرار می‌گیرند [۳،۲].

^۱ کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

^۳ استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

رودهن، مجتمع دانشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن

تلفن: ۰۹۱۲۰۱۷۱۵۰۸ | دوی‌اچ‌آی: ۰۲۱ ۷۶۵۰۷۶۶۵

پست الکترونیک: A.mirzaie@riau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱ | تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۵/۱۷

پودر گیاهی برای عصاره گیری به روش سوکسله استفاده شد؛ بدین ترتیب که ۵۰ گرم از پودر اندام هوایی گیاه به ۵۰۰ میلی لیتر متانول اضافه گردید. عصاره گیری به مدت ۱۲ ساعت صورت گرفت و در پایان حلال به وسیله روتاری اوپوراتور (Rv10 digital, آلمان) حذف گردید. عصاره تهیه شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا زمان سنتز نانوذرات نقره نگهداری شد [۲۶].

سنتز نانوذره نقره

برای سنتز نانوذره نقره از روش رسوب گذاری با احیای یون های نقره توسط عصاره استفاده شد. نانوذرات نقره با افزودن ۳ میلی لیتر عصاره اندام هوایی گیاه *آرتمیزیاسکوپاریا* به نیترات نقره (مرک آلمان) با غلظت ۰/۱ میلی مولار در دمای اتاق و دور همزن ۳۰ دور در دقیقه سنتز شد. بعد از گذشت دو ساعت از زمان واکنش، سه مرتبه شستشوی رسوب با آب مقطر انجام گرفت. تمام مراحل شستشو با دور ۱۳۰۰۰ RPM به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت شستشوی انتهایی با اتانول انجام شد و محصول در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد طی ۲ ساعت قرار گرفت [۲۷].

بررسی ویژگی های نانوذرات

بعد از گذشت دو ساعت از زمان افزودن عصاره به نیترات نقره و تغییر رنگ واکنش، آنالیز طیفسنجی UV-Vis نانوذرات نقره با استفاده از دستگاه طیفسنجی UV-Vis (Agilent, Spectrophotometer, USA) در طول موج ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین، به منظور بررسی ریخت شناسی و تایید اندازه نانوذرات نقره، نمونه پودر نانوذرات به مدت ۱۵ دقیقه اولتراسونیک شده و روی گرید دارای فیلم کربنی قرار داده شد. پس از خشک شدن گرید بدون حرارت و در مجاورت هوای اتاق، با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی گذاره (Leo 906) (TEM مدل ۱۰۰ KV Zeiss)، ساخت کشور آلمان با ولتاژ شتاب دهنده ۱۲۰ KV تصویربرداری شد. به منظور تایید اندازه نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) استفاده شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره و مطالعه نقطه به نقطه، جهت بررسی اندازه و مورفولوژی نانوذرات پس از پوشش - دهی با طلا در ولتاژ زیر ۳۰ KV و تحت فشار خلاء (10^{-5} Torr) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مدل XL30 شرکت فیلیپس ساخت کشور ژاپن مورد مطالعه قرار گرفت.

بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره

به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات نقره سنتز شده از روش MIC (Minimum inhibitory concen-)

امروزه از روش های مختلف فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی جهت سنتز نانوذرات نقره استفاده می کنند، اما روش های سنتز سبز که به روش های زیست سازگار (Eco-friendly) معروف هستند از اهمیت ویژه ای برخوردارند [۱۴، ۱۵]. در روش های سنتز سبز از عصاره گیاهان جهت سنتز نانوذرات استفاده می کنند که مزایای بسیاری مانند هزینه کمتر، سازگاری با محیط زیست و امکان تولید آسان در مقیاس بالا را دارند و در این روش نیازی به استفاده از دما، فشار بالا و همچنین ترکیبات شیمیایی نیست [۲۰-۱۶]. در مطالعه صالحی و همکاران از عصاره الکلی اندام هوایی گیاه *Artemisia marschalliana* Sprengel جهت سنتز نانوذرات نقره استفاده شد [۲۱]. همچنین، Rasheed و همکاران در سال ۲۰۱۷ از عصاره گیاه *آرتمیزیاسکوپاریا* جهت سنتز نانوذرات نقره استفاده کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده دارای اندازه میانگین ۲۵ نانومتر بوده و روی رده سلولی سرطان سینه (MCF-7) [۲۲] و دهانه رحم (HeLa) [۲۳] دارای اثرات سمیت سلولی معنی داری می باشد. به طور کلی مطالعات نشان داده است گیاهان جنس *آرتمیزیاسکوپاریا* یا درمنه به دلیل داشتن ترکیبات احیا کننده قوی برای سنتز نانوذره نقره مناسب می باشند [۲۴] و به همین دلیل در این مطالعه برای اولین بار از عصاره گیاه *آرتمیزیاسکوپاریا* که بومی کشور ایران است، جهت سنتز نانو-ذرات نقره استفاده شد. به طور کلی، بیش از ۲۰۰۰ گونه از جنس *آرتمیزیاسکوپاریا* در سرتاسر جهان وجود دارد و بسیاری از گونه های *آرتمیزیاسکوپاریا* جهت اهداف درمانی مثل التیام دهنده درد، تسکین سرفه، ضد حساسیت و درمان مالاریا استفاده می شوند. در میان ۲۰۰۰ گونه *آرتمیزیاسکوپاریا*، ۳۴ گونه در ایران وجود دارد که یکی از گونه های آن *آرتمیزیاسکوپاریا* است که دارای محتوای بالای فلاونوئید، تربینوئید و همچنین ماده شیمیایی به نام تانن است [۲۵]. با توجه به مقرون به صرفه بودن و عدم وجود اثرات زیست محیطی، عصاره های گیاهی جهت سنتز نانوذرات نقره و همچنین دارا بودن اثرات ضد سرطانی نانوذرات نقره، هدف از این مطالعه سنتز سبز نانوذره نقره با استفاده از عصاره گیاه *آرتمیزیاسکوپاریا* و بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی آن می باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری گیاه و عصاره گیری

گیاه *آرتمیزیاسکوپاریا* از بانک گیاهی مرکز ذخایر زیستی ایران با کد هر بار یوم ۱۳۴۲ تهیه شد. برای تهیه عصاره ابتدا اندام هوایی گیاه در جریان هوا قرار داده شد و سپس در سایه کاملاً خشک شد. اندام هوایی توسط دستگاه آسیاب برقی کاملاً پودر گردیده و درون ظروف شیشه ای نگهداری شد. به دنبال آن از

شد و غلظت آن به وسیله دستگاه نانودراپ (IMPLEN, آلمان) اندازه گیری شد. ساخت مولکول های DNA مکمل با کیت Revert Aid™ First strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, لیتوانی) انجام گرفت که در آن مخلوط واکنش حاوی ۵ میکرولیتر بافر واکنش ۵x، یک میکروگرم RNA، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر الیگو dT، دو میکرولیتر مخلوط داکسی نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ میلی مولار)، یک میکرولیتر مهارکننده آنزیم RNase (۲۰ واحد در میکرولیتر)، یک میکرولیتر آنزیم رونویسی معکوس و آب مقطر دو بار تقطیر (تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) بود. برنامه دمایی-زمانی به صورت ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (اتصال آغازگر)، ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه (ساخت cDNA)، ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (غیرفعال شدن آنزیم) و ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. پرایمرهای مورد استفاده برای ژن های هدف *Bax* و *Bcl2* و ژن β -actin به عنوان کنترل داخلی در جدول شماره ۱ آمده است. در نهایت، واکنش PCR با استفاده از دستگاه (Bioneer) Light cycler (کره) با شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی گراد: ۱ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی گراد ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد ۶۰ ثانیه انجام گرفت [۳۰]. میزان بیان ژن های مورد مطالعه از روی Ct های به دست آمده و با استفاده از نرم افزار REST آنالیز گردید.

جدول شماره ۱- پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Real-time

PCR	
نام ژن	توالی پرایمر (5'-3')
<i>Bax</i>	F 5'- ATGGGAGCAAGTCAGTGGAC -3' R 5'- CGTACCAGAGCGAGATGACA -3'
<i>Bcl2</i>	F 5'-TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC-3' R 5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAG-3'
β -actin	F 5'- TCCTCCTGAGCGCAAGTAC -3' R 5'- CCTGCTTGCTGATCCACATCT -3'

تجزیه و تحلیل آماری

داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۰ و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند. اطلاعات به- صورت $Mean \pm SD$ نمایش داده شده و $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

بیوسنتز نانوذرات با تغییر رنگ محلول طی یک ساعت از زمان واکنش صورت گرفت. رنگ محلول با افزودن عصاره گیاهی *آرتمیزیاسکوپاریا* به محلول نترات نقره از بی رنگ به رنگ مایل

(tration) استفاده شد. آزمایش MIC به روش رقیق سازی در میکروپلیت (میکرودایلوشن) و به صورت ۳ بار تکرار انجام گرفت؛ بدین صورت که نانوذره در غلظت های $3/125 \mu\text{g/ml}$ تا ۱۰۰ داخل چاهک ها در حجم ۱۰۰ میکرولیتر ریخته شد. به همه چاهک ها ۵ میکرولیتر از کشت باکتری های استاندارد/استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923، *انتروکوکوس فکالیس* ATCC 29212، *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 15442 و *اشریشیا کلی* ATCC 25922 با غلظت نیم مک فارلند به همراه ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مایع مولر هیتون برات اضافه شد. مقدار MIC به- عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری محسوب می شود [۲۸]. جهت صحت کار از آب به عنوان کنترل منفی و از آنتی- بیوتیک وسیع الطیف آمپی سیلین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

کشت سلول و بررسی سمیت سلولی

رده سلولی سرطان ریه (A549) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. به منظور بررسی اثرات کشندگی سلولی نانو ذره نقره روی رده سلولی A549 از روش رنگ سنجی MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) استفاده شد. غلظت های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر از نانوذره در فاصله زمانی ۲۴ ساعت روی رده سلولی A549 تیمار شد. بعد از گذشت زمان فوق، محتوای چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای به دقت خارج شد و به آن رنگ MTT (Sigma Aldrich, Germany) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت تحت شرایط CO_2 ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داشته شد. به دنبال آن محتوای چاهک ها خارج شد و میزان ۵۰ میکرولیتر DMSO به آنها اضافه شد. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه انکوباسیون، جذب نمونه ها با استفاده از دستگاه قرائت گر الایزا (ELISA reader, Oraganon Teknika, هلند) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و میزان کشندگی سلول توسط فرمول زیر محاسبه شد [۲۹]:

$$100 \times (\text{جذب نوری سلول های کنترل بر جذب نوری سلول های}$$

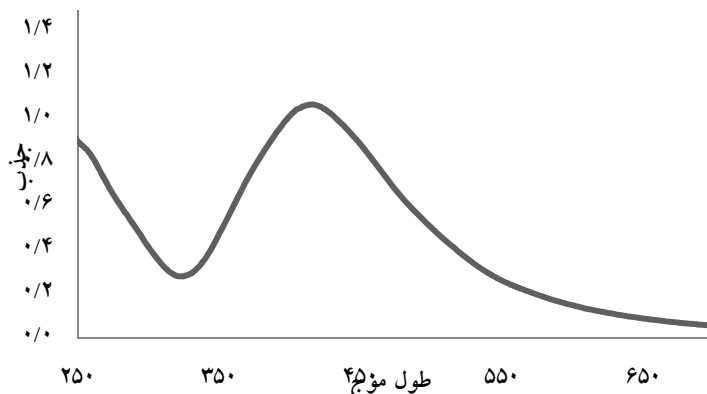
تیمار شده) = میزان بقای سلولی

لازم به ذکر تست MTT به صورت ۳ بار تکرار انجام گرفت.

اندازه گیری بیان ژن های *Bax* و *Bcl2*

میزان بیان ژن های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* با استفاده از روش Real-time PCR سنجیده شد. در ابتدا کل RNA سلول- های تیمار شده و نشده با نانوذرات نقره با استفاده از کیت استخراج RNA (کیازن، آمریکا) طبق دستورالعمل آن استخراج

میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM نیز نشان داد که نانوذره سنتز شده دارای ساختار کروی می‌باشد. همچنین، نتایج نشان داد که نانوذره نقره سنتز شده دارای میانگین سایز ۳۳/۴۰ نانومتر می‌باشد (شکل شماره ۲A و ۲B و نمودار شماره ۲C).



شکل شماره ۱- طیف سنجی UV-Vis نانوذرات نقره سنتز شده. با توجه به شکل، جذب UV نانوذرات نقره سنتز شده در طول موج بین ۲۵۰ تا ۷۰۰ نانومتر خوانده شد و ماکزیم جذب در طول موج ۴۳۸ نانومتر مشاهده شد.

اندازه‌گیری شد. تیمار سلول‌های رده سلولی A549 با غلظت‌های ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نانو-ذرات نقره در مدت ۲۴ ساعت به ترتیب سبب کاهش بقای سلول‌ها تا ۳۱/۲۹±۰/۷۵، ۷۲/۴۹±۰/۵۶، ۹۱/۸۳±۰/۳۶، ۶۲/۳۵±۰/۱۳، ۱۳/۴۴±۰ درصد می‌شود (شکل شماره ۳). نتایج نشان داد که سمیت سلولی نانوذره نقره سنتز شده وابسته به دوز می‌باشد.

بررسی بیان ژن‌های Bax و Bcl2

به دنبال تیمار سلول‌های A549 با غلظت ۵۰ درصد کشندگی (IC50)، تکثیر اختصاصی ژن‌های هدف، عدم جفت شدن پرایمرها و عدم تکثیر قطعات غیراختصاصی برای هر ژن با استفاده از منحنی ذوب تعیین شد. در شکل‌های شماره ۴ و ۵ منحنی ذوب ژن‌های β -actin، Bcl2 و Bax در رده سلولی A549 نشان داده شده است. تغییر بیان ژن‌های Bax و Bcl2 در سلول‌های A549 تیمار شده با نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی طی ۲۴ ساعت ارزیابی شد. بیان ژن Bax نسبت به ژن مرجع β -actin در رده سلولی سرطانی A549 تیمار شده با نانو-ذرات نقره زیستی به اندازه ۳۴/۳۴±۰/۲۳ (P<۰/۰۵) افزایش و بیان ژن Bcl2 به اندازه ۶۱/۴۳±۰/۰۴ (P<۰/۰۵) کاهش یافته بود (شکل شماره ۶).

به قرمز طی ۳۰ دقیقه و به تدریج در طی ۶۰ دقیقه از زمان واکنش به قهوه‌ای تیره تغییر یافت. تغییر رنگ نشان دهنده احیای نیترات نقره و تشکیل نانوذرات نقره در محلول است. وجود پیک در طول موج ۴۳۸ نانومتر برای نانوذرات نقره با دستگاه طیف‌سنجی UV-Vis طی زمان‌های مختلف واکنش تایید شد (شکل شماره ۱). نتایج

بررسی اثرات ضد میکروبی

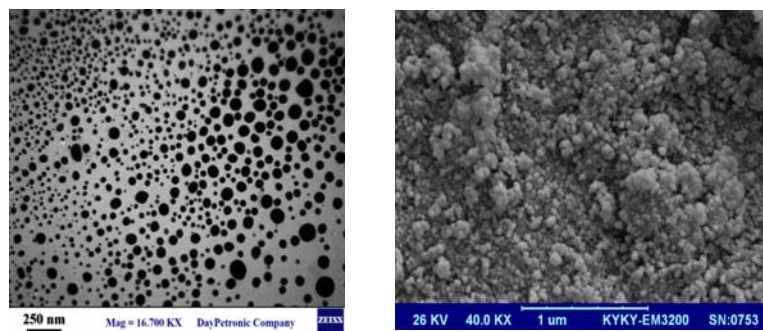
در این مطالعه به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی نانو-ذره نقره از روش MIC استفاده شد. در روش MIC سوبه‌های باکتریایی تحت غلظت‌های ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر قرار گرفتند. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره روی تمامی باکتری‌های مورد مطالعه خاصیت ضد باکتریایی دارند، به طوری که کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس و بیشترین مربوط به باکتری سودوموناس آئروژینوزا بود (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲- بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذره نقره سنتز شده

میزان MIC (میکروگرم در میلی لیتر)	نام باکتری
۲۵	استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923
۵۰	اتروکوکوس تکالیس ATCC 29212
۱۰۰	سودوموناس آئروژینوزا ATCC 15442
۱۰۰	اشریشیا کلی ATCC 25922

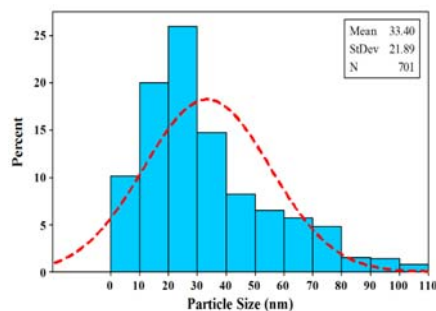
نتایج سمیت سلولی

اثرات نانوذرات نقره سنتز شده روی سلول سرطانی ریه (A549) با روش MTT از غلظت ۱۰۰-۳/۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر انجام گرفت و درصد زنده بودن سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت



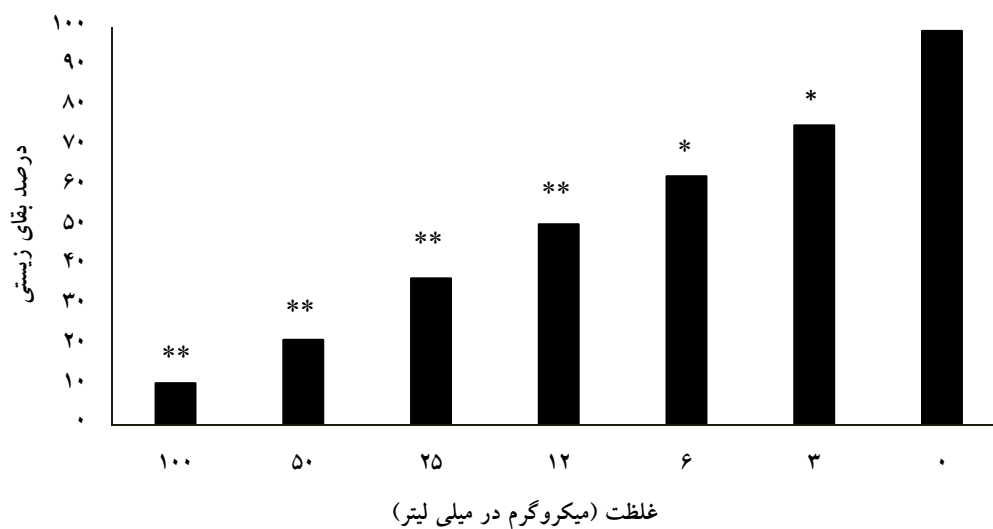
A

B

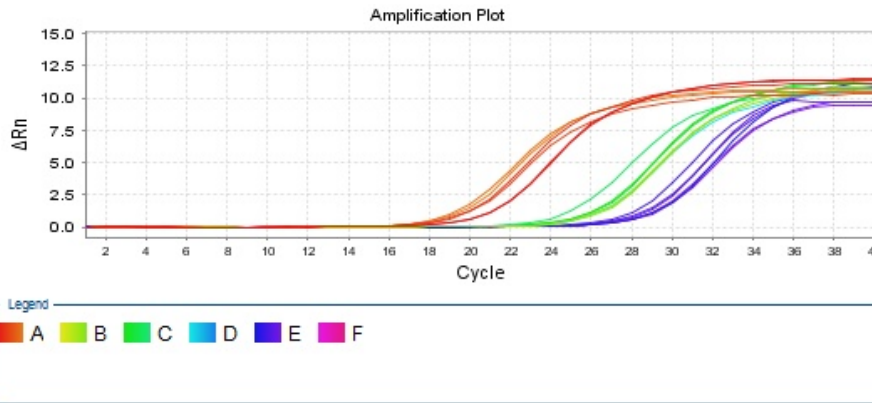


C

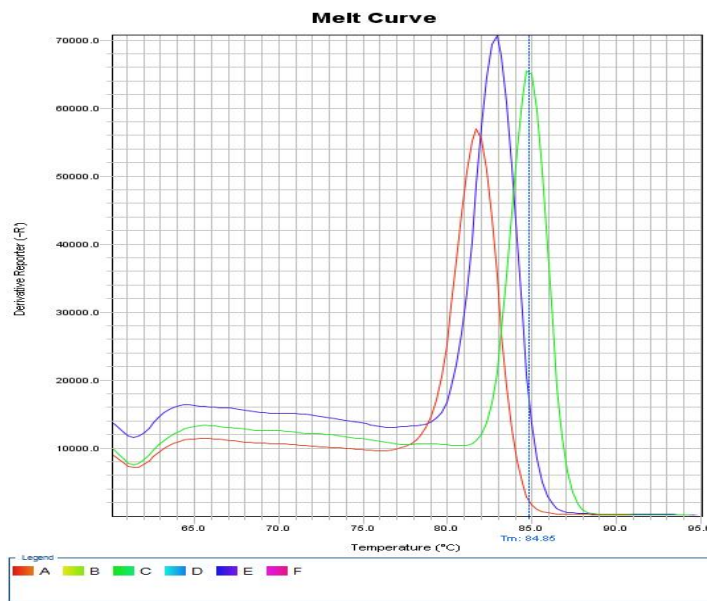
شکل شماره ۲- نتایج میکروسکوپ الکترونی TEM (A)، SEM (B) و نمودار میانگین ساین نانوذرات (C). با توجه به نمودار اندازه تقریبی ساین نانوذرات نقره ۳۳/۴۰ نانومتر می‌باشد.



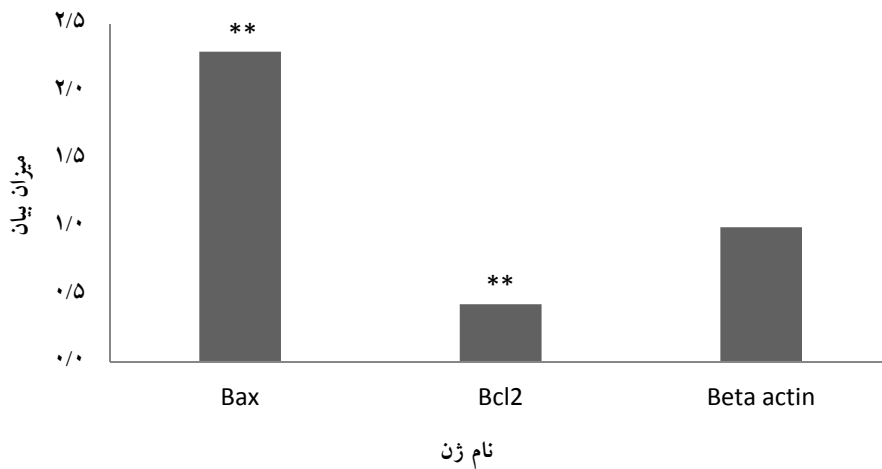
شکل شماره ۳- درصد بقای سلول‌های A549 در برابر غلظت‌های مختلف نانوذره نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت؛ نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است (* $P < 0.05$ ، ** $P < 0.01$ ، *** $P < 0.001$) (n=3).



شکل شماره ۴- نمودار تکثیر ژن‌های مورد مطالعه *Bax*، *Bcl2* و β -*actin* همانطور که مشاهده می‌شود از سیکل ۱۸ به بعد میزان فلورئوسانس نمونه افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده تکثیر ژن‌های مدنظر است. رنگ قرمز ژن *Bax*، رنگ سبز ژن *Bcl2* و رنگ آبی ژن β -*actin* بود.



شکل شماره ۵- نمودار منحنی ذوب ژن‌های *Bax*، *Bcl2* و β -*actin*. پیک قرمز مربوط به ژن β -*actin* با دمای ۸۲ درجه سانتی‌گراد، پیک آبی مربوط به ژن *Bcl2* با دمای ذوب ۸۴/۷۶ درجه سانتی‌گراد، پیک سبز مربوط به ژن *Bax* با دمای ذوب ۸۵ درجه سانتی‌گراد.



شکل شماره ۶- میزان بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* نسبت به ژن کنترل (β -*actin*). نسبت بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* نسبت به ژن مرجع در رده سلولی سرطانی A549 تیمار شده با نانوذره طی ۲۴ ساعت. ($P < 0.05$:*، $P < 0.01$:**، $P < 0.001$:***). (n=3)

بحث

امروزه با توجه به مشکلات عمده‌ای که در روش‌های شیمیایی و فیزیکی برای تولید نانوذرات وجود دارد، محققان از روش‌های کم‌هزینه و سازگار با محیط زیست به نام روش سبز برای سنتز نانوذرات نقره استفاده می‌کنند [۳۱]. در این مطالعه برای اولین بار از عصاره گیاه *آرتمیزیا اسکوپاریا* یا درمنه جهت سنتز نانوذرات نقره استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره با استفاده از عصاره بسیار ارزان قیمت بوده و به سرعت قابل انجام است و نانوذره نقره سنتز شده دارای اندازه میانگین $33/40$ نانومتر می‌باشد. به‌طور معمول، شکل و سایز نانوذرات ارتباط مستقیمی با سمیت سلولی دارد و معمولاً نانوذرات با اندازه کمتر از 100 نانومتر دارای سمیت سلولی بیشتری هستند. همچنین، نانوساختارهای با سطح آب‌دوست کوچک‌تر از 100 نانومتر بیشترین توانایی را برای فرار از سیستم فاگوسیتیک مولکولی دارند [۳۲،۳۳]. تاکنون مطالعات مختلفی در جهت سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاهان خانواده آستراسه به انجام رسیده است. Salehi و همکاران با استفاده از عصاره گیاه *آرتمیزیا مارشالیانا اسپرینگل* نانوذره نقره سنتز کردند و نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره سنتز شده دارای سایز کمتر از 50 نانومتر بوده و دارای اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی می‌باشد [۲۱]. طی تحقیقی در سال 2013 سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از احیای عصاره برگ گیاهی *اوکالیپتوس چاپمانیا* انجام گرفت و خواص ضد میکروبی و سمیت علیه رده سلولی لوسمی پرومیولوسیتیک حاد انسانی HL-60 آن به اثبات رسید [۳۴]. نانوذرات نقره تولید شده در این مطالعه دارای اثر ضد میکروبی معنی‌داری روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی بودند. یکی از دلایل اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره آزادسازی یون‌های نقره از نانوذرات می‌باشد که به اکسیژن، گوگرد و نیتروژن بیومولکول‌های عملکردی در سلول متصل شده و منجر به مرگ سلول‌های باکتریایی می‌شود. همچنین، نانوذرات نقره می‌توانند باعث تولید رادیکال‌های سمی اکسیژن در سلول‌های باکتریایی شده و روی DNA اثر بگذارند [۳۵]. Vijayakumar و همکارانش در سال 2013 با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia nilagrica* سنتز نانو ذره نقره را گزارش کردند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که این نانوذره تولید شده دارای خواص ضد باکتریایی است. سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia annua* نیز گزارش شده است. در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی و ضد آنزیم تیروزیناز نانوذرات نقره مورد مطالعه قرار گرفت. محققان بیان کردند که نانوذره نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاهی به‌عنوان احیا کننده قوی، مقرون به‌صرفه می‌باشد [۳۶]. سنتز

نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia pallens* نیز گزارش شده است. سنتز نانوذره در این مطالعه با استفاده از عصاره گیاه منجر به تشکیل ذرات کروی با اندازه متوسط 41 نانومتر شد. همچنین، اثرات ضد باکتریایی نانوذره تولید شده اثبات گردید [۳۷]. تشابه تمامی این مطالعات با مطالعه حاضر در این است که نانوذرات نقره می‌توانند به راحتی با استفاده از عصاره گیاهان سنتز شوند، اما وجه تمایز تمامی این مطالعات سایز نانوذرات نقره سنتز شده می‌باشد که بسته به محتوای فیتوشیمیایی آن گیاه می‌تواند متفاوت باشد [۳۳]. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات سنتز شده دارای سمیت سلولی وابسته به دوز می‌باشند. همچنین، نتایج Real-time PCR نشان داد که بیان ژن‌های آپوپتوزی به‌دنبال تیمار سلول‌ها تغییر معنی‌داری داشته‌اند؛ به‌طوری‌که ژن *Bax* افزایش بیان و ژن *Bcl2* کاهش بیان را نشان داد که حاکی از وقوع آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده است. ارزیابی برون‌تنی اثرات ضد سرطانی نانوذرات نقره ساخته شده از طریق احیای گیاهی *Morinda pubescens* روی سلول‌های سرطانی کبد HepG2 انجام شده و نتایج این پژوهش پتانسیل بالای نانوذرات در درمان سرطان را نشان داده است [۳۸]. Turner و همکاران پس از سنتز نانوذرات نقره از طریق عصاره جلبک *اولوا لاکتوکا* با سایز بین 20 تا 56 نانومتر، اثرات ضد سرطانی آن روی رده‌های سلولی سرطانی کبد HepG-2، پستان MCF-7، کلون HT29 و سلول نرمال Vero را نشان داده‌اند [۳۹]. خلیلی و همکاران با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia tschernieviana* نانوذره نقره سنتز کردند و اثرات بیولوژیکی آن را روی رده‌های سلولی سرطان کولون و نرمال مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره سنتز شده دارای قطر بین 10 تا 30 نانومتر بوده و روی رده سلولی سرطان کولون سمیت دارد. Mousavi و همکاران نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره برگ گیاه *Artemisia turcomonica* سنتز کرده و اثرات ضد سرطانی آن را روی رده سلولی سرطان معده مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که اندازه میانگین نانوذره نقره سنتز شده 22 نانومتر است و روی رده سلولی سرطان ریه اثر سمی دارد [۲۷]. با مقایسه نتایج این مطالعه و سایر مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که عصاره گیاهان مختلف می‌توانند در سایز نانوذره سنتز شده تاثیر گذار باشد، به‌طوری‌که در مطالعه ما سایز نانوذره سنتز شده $33/40$ نانومتر بود ولی سایر مطالعات اندازه‌های متفاوتی از نانوذرات سنتز شده را گزارش کرده‌اند که این نوع اختلاف در سایز نانوذرات به ترکیبات فلاونوئیدی و احیا کنندگی عصاره‌های گیاهی بر می‌گردد. همچنین با توجه به سایز نانوذره، میزان سمیت

میکروبی و ضد سرطانی می‌باشند. در نهایت می‌توان پیشنهاد کرد که با مطالعات بیشتر می‌توان از این نانوذره نقره سنتز شده به‌عنوان کاندید دارویی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی با کد اخلاق ۲۲/۳۴۰ به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از تمامی کسانی که در انجام این تحقیق همکاری نموده‌اند، به‌خصوص از آقای حسن نوربازرگان دانشجوی دکترای زیست‌فناوری پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

References:

- [1] Fakruddin M, Hossain Z, Afroz H. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. *J Nanobiotechnol* 2012; 10: 31.
- [2] Marin S, Vlasceanu GM, Tiplea RE, Bucur IR, Lemnaru M, Marin MM, Grumezescu AM. Applications and toxicity of silver nanoparticles: a recent review. *Curr Top Med Chem* 2015; 15(16): 1596-604.
- [3] Rónavári A, Kovács D, Igaz N, Vágvölgyi C, Boros IM, Kónya Z, et al. Biological activity of green-synthesized silver nanoparticles depends on the applied natural extracts: a comprehensive study. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 871-83.
- [4] Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* 2016; 17(9).
- [5] Ivask A, Kurvet I, Kasemets K, Blinova I, Aruoja V, et al. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PLoS One* 2014; 9(7): 9(7): e102108.
- [6] Zhang W, Xiao B, Fang T. Chemical transformation of silver nanoparticles in aquatic environments: Mechanism, morphology and toxicity. *Chemosphere* 2018; 191: 324-34.
- [7] Kim TH, Kim M, Park HS, Shin US, Gong MS, Kim HW. Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. *J Biomed Mater Res A* 2012; 100(4): 1033-43.
- [8] Riaz Ahmed KB, Nagy AM, Brown RP, Zhang Q, Malghan SG. Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. *Toxicol In Vitro* 2017; 38: 179-92.
- [9] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(1): 7-30.
- [10] Azar FE, Azami-Aghdash S, Pournaghi-Azar F, Mazdaki A, Rezapour A, Ebrahimi P, et al. Cost-effectiveness of lung cancer screening and treatment methods: a systematic review of

سلولی آن نیز می‌تواند متفاوت باشد. به‌طور معمول نانوذرات نقره زیر ۵۰ نانومتر دارای سمیت سلولی بیشتری هستند و می‌توانند الگوی بیان ژن‌های آپوپتوزی را تغییر دهند. به‌طور معمول بیشتر عوامل ضد سرطانی اثرات درمانی خود را با القای آپوپتوز اعمال می‌کنند [۴۰] و در این مطالعه نیز نانوذرات نقره سنتز شده باعث القای آپوپتوز شدند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده به‌روش سنتز سبز بسیار مقرون به‌صرفه بوده و دارای اثرات ضد

- systematic reviews. *BMC Health Serv Res* 2017; 17(1): 413.
- [11] Bharali DJ, Khalil M, Gurbuz M, Simone TM, Mousa SA. Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with emphasis on dendrimers. *Int J Nanomedicine* 2009; 4: 1-7.
 - [12] Ong C, Lim JZ, Ng CT, Li JJ, Yung LY, Bay BH. Silver nanoparticles in cancer: therapeutic efficacy and toxicity. *Curr Med Chem* 2013; 20(6): 772-81.
 - [13] Durán N, Nakazato G, Seabra AB. Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016; 100(15): 6555-70.
 - [14] Aboelfetoh EF, El-Shenody RA, Ghobara MM. Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using green algae (*Caulerpa serrulata*): reaction optimization, catalytic and antibacterial activities. *Environ Monit Assess* 2017; 189(7): 349.
 - [15] Mashwani ZU, Khan MA, Khan T, Nadhman A. Applications of plant terpenoids in the synthesis of colloidal silver nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci* 2016; 234: 132-41.
 - [16] Patil MP, Kim GD. Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017; 101(1): 79-92.
 - [17] Rajeshkumar S, Bharath LV. Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles-A review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity. *Chem Biol Interact* 2017; 273: 219-27.
 - [18] Meva FE, Segnou ML, Ebongue CO, Ntomba AA, Steve DY, Malolo FA, et al. Unexplored vegetal green synthesis of silver nanoparticles: a preliminary study with *Corchorus olitorus* Linn and *Ipomea batatas* (L.) Lam. *Afr J Biotechnol* 2016; 15(10): 341-9.
 - [19] Udayasoorian C, Kumar R, Jayabalakrishnan M. Extracellular synthesis of silver nanoparticles

- using leaf extract of *Cassia auriculata*. *Dig J Nanomater Biostruct* 2011; 6(1): 279–83.
- [20] Jadou A, Al-Shahwany AW. Biogenic synthesis and characterization of silver nanoparticles using some medical plants and evaluation of their antibacterial and toxicity potential. *JAOC Int* 2018.
- [21] Salehi S, Shandiz SA, Ghanbar F, Darvish MR, Shafiee Ardestani M, Mirzaie A, et al. Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Art-emisia marschalliana* Sprengel aerial part extract and assessment of their antioxidant, anticancer and antibacterial properties. *Int J Nanomedicine* 2016; 11: 1835–46.
- [22] Rasheed T, Bilal M, Iqbal HMN, Li C. Green biosynthesis of silver nanoparticles using leaves extract of *Artemisia vulgaris* and their potential biomedical applications. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2017; 158: 408–15.
- [23] Khalili H, Baghbani-arani F. Green Synthesized of Silver Nanoparticles Using *Artemisia tschernieviana* Extract and Evaluation of Cytotoxicity Effects on Human Colon Cancer (HT29) and Normal (HEK293) Cell Lines. *Sci J Ilam Univ Med Sci* 2017; 25(2): 91–100. [in Persian]
- [24] Bora KS, Sharma A. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. *Pharm Biol* 2011; 49(1): 101–9.
- [25] Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. The *Artemisia* L. Genus: a review of bioactive essential oils. *Molecules* 2012; 17(3): 2542–66.
- [26] Redfern J, Kinninmonth M, Burdass D, Verran J. Using soxhlet ethanol extraction to produce and test plant material (essential oils) for their antimicrobial properties. *J Microbiol Biol Educ* 2014; 15(1): 45–6.
- [27] Mousavi B, Tafvizi F, Zaker Bostanabad S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Artemisia turcomanica* leaf extract and the study of anti-cancer effect and apoptosis induction on gastric cancer cell line (AGS). *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018; 23: 1–12.
- [28] Wypij M, Czarnecka J, Świecimska M, Dahm H, Rai M, Golinska P. Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of biogenic silver nanoparticles synthesized from *Streptomyces xinghaiensis* OF1 strain. *World J Microbiol Biotechnol* 2018; 34(2): 23.
- [29] Satyavani K, Gurudeeban S, Ramanathan T, Balasubramanian T. Toxicity Study of Silver Nanoparticles Synthesized from *Suaeda monoica* on Hep-2 Cell Line. *Avicenna J Med Biotechnol* 2012; 4(1): 35–9.
- [30] Lalitha P. Apoptotic efficacy of biogenic silver nanoparticles on human breast cancer MCF-7 cell lines. *Prog Biomater* 2015; 4(2–4): 113–21.
- [31] Rónavári A, Kovács D, Igaz N, Vágvölgyi C, Boros IM, et al. Biological activity of green-synthesized silver nanoparticles depends on the applied natural extracts: a comprehensive study. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 871–83.
- [32] Tang HQ, Hu J, Yang L, Tan RX. Terpenoids and flavonoids from *Artemisia* species. *Planta Med* 2000; 66(4): 391–3.
- [33] Gliga AR, Skoglund S, Wallinder IO, Fadeel B, Karlsson HL. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol* 2014; 11: 11.
- [34] Sulaiman GM, Mohammed WH, Marzoog TR, Al-Amiery AA, Kadhum AA, Mohamad AB. Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Eucalyptus chapmaniana* leaves extract. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; 3(1): 58–63.
- [35] Patra JK, Baek KH. Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of silky hairs of corn and investigation of its antibacterial and anti-candidal synergistic activity and antioxidant potential. *IET Nanobiotechnol* 2016; 10(5): 326–33.
- [36] Vijayakumar M, Priya K, Nancy FT, Noorlidah A, Ahmed AB. Biosynthesis, characterisation and anti-bacterial effect of plant-mediated silver nanoparticles using *Artemisia nilagirica*. *Ind Crops Prod* 2013; 41: 235–40.
- [37] Xia QH, Zheng LP, Zhao PF, Wang JW. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Artemisia annua* callus for inhibiting stem-end bacteria in cut carnation flowers. *IET Nanobiotechnol* 2017; 11(2): 185–92.
- [38] Inbathamizh L, Mekalai P, Jancy E. In vitro evaluation of antioxidant and anticancer potential of *Morinda pubescens* synthesized silver nanoparticles. *J Pharm Res* 2013; 6(1): 32–8.
- [39] Turner A, Brice D, Brown MT. Interactions of silver nanoparticles with the marine macroalga, *Ulva lactuca*. *Ecotoxicology* 2012; 21(1): 148–54.
- [40] Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet* 2009; 46(8): 497–510.