Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Synthesis of Silver Nanoparticles using Methanol Extract of Bunium Persicum and the Evaluation of its Cytotoxic, Antileishmanial, and Antimicrobial Activities

Fatemeh Sharifi[1], Neda Mohamadi[2*], Sara Soltanian[3*], Mohsen Doostmohammadi[4]

[1] Research Center of Tropical and Infectious Diseases, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
[2] Herbal and Traditional Medicines Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
[3] Dept of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
[4] Pharmaceutic Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Science, Kerman, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 04 January 2022
Revised: 23 February 2022
Accepted: 19 April 2022
Published Online: 21 January 2023

**** Correspondence to:***
Neda Mohamadi, sara Soltanian
Herbal and Traditional Medicines Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran; Dept of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
Email:
n_mohammadi@kmu.ac.ir
Soltanian@uk.ac.ir

A B S T R A C T

Introduction: The unique properties of silver nanoparticles (Ag-NPs) produced using plant extract make them attractive for use in medical and industrial applications. Bunium persicum from the Apiaceae family is native to Iran, Afghanistan, Pakistan, and some Central Asian countries, which is locally known as "Kermanin Black Cumin" in Iran. In this study, Ag-NPs were synthesized using methanol extract of B. persicum as the regenerating and stabilizing agent for the first time and were followed by the characterization and evaluation of its biological potency.

Material & Methods: Synthesis of Ag-NPs was conducted using the B. persicum extract. Ultraviolet-visible (UV-VIS) spectroscopy was used to detect the presence of nanoparticles. Scanning Electron Microscope (SEM) was also employed to visualize the surface morphology, shape, and size distribution of nanoparticles. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) is very sensitive to the chemical surface of nanoparticles and was utilized to identify functional groups in the nanoparticles. Cytotoxicity against cancer cell lines and antileishmanial activities were investigated using MTT assay, and the well diffusion method was used to detect the antibacterial property of the synthesized nanoparticles.

Findings: UV-VIS spectrum exhibits an absorption band at around 400-450 nm suggesting the formation of biological Ag-NPs. The size and morphological properties of nanoparticles were assessed by SEM which showed that particles have spherical shapes with a diameter of about 20-70 nm. Ag-NPs showed cytotoxicity against human glioblastoma cancer cell line A-172 (IC50:7.2 µg/ml) and breast cancer cell line MCF-7 (IC50:7.6 µg/ml) after 48 h treatment. Ag-NPs presented antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The present study confirmed good antileishmanial activity against the promastigote and amastigote stages of Leishmania major. The IC50 values of Ag-NPs and Glucantime® were 73.89 and 16.17µg/mL for promastigote, as well as 171.02 and 398.21 µg/mL for amastigotes assays, respectively.

Discussion & Conclusion: The extract of B. persicum has the ability to reduce Ag+ ions to Ag nanoparticles. Moreover, the fabricated Ag-NPs have good cytotoxicity, antibacterial, and antileishmanial activities.

Keywords: Antibacterial activity, Antileishmanial effects, Bunium persicum, Cytotoxicity, Green synthesis, Silver nanoparticles

➢ **How to cite this paper**
Sharifi F, Mohamadi N, Soltanian S, Doostmohammadi M. Synthesis of Silver Nanoparticles using Methanol Extract of Bunium Persicum and the Evaluation of its Cytotoxic, Antileishmanial, and Antimicrobial Activities. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(6): 9-20.

© The Author(s)
Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصارهٔ متانولی گیاه زیرهٔ سیاه و ارزیابی میزان سمیت، فعالیت ضد لیشمانیا و ضدمیکروبی آن

فاطمه شریفی[۱]، ندا محمدی[۲*]، سارا سلطانیان[۳*]، محسن دوست محمدی[۴]

[۱] مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

[۲] مرکز تحقیقات داروهای گیاهی و سنتی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

[۳] گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

[۴] مرکز تحقیقات داروسازی، انستیتو نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۴

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۳۰

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۱۱/۰۱

نویسنده مسئول:

ندا محمدی؛ سارا سلطانیان

مرکز تحقیقات داروهای گیاهی و سنتی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران؛

گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

Email:
n_mohammadi@kmu.ac.ir;
soltanian@uk.ac.ir

چکیده

مقدمه: ویژگی‌های منحصربه‌فرد نانوذرات نقره که به‌وسیلهٔ عصاره‌های گیاهی تولید می‌شود، به استفادهٔ چشمگیر آن‌ها در کاربردهای پزشکی و صنعتی منجر شده است. گیاه Bunium Persicum از خانوادهٔ Apiaceae، بومی ایران، افغانستان، پاکستان و برخی از کشورهای آسیای شرقی است که نام محلی آن در ایران، زیرهٔ سیاه است. در این مطالعه، برای اولین بار از عصارهٔ متانولی زیرهٔ سیاه به‌عنوان عامل احیاکننده و پایدارکننده برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شد و سپس ویژگی‌های ساختاری و خصوصیات بیولوژی آن بررسی گردید.

مواد و روش ها: نانوذرات نقره به‌وسیلهٔ عصارهٔ زیرهٔ سیاه سنتز شد. طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش برای بررسی حضور نانوذرات صورت گرفت و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، مورفولوژی سطحی، شکل و اندازهٔ نانوذرات مشخص گردید. طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه، به مواد شیمیایی سطح نانوذرات بسیار حساس است و برای شناسایی گروه‌های عملکردی در نانوذره استفاده شد. میزان سمیت روی سلول‌های سرطانی و خاصیت ضد لیشمانیا با استفاده از روش MTT بررسی گردید و روش انتشار از چاهک برای بررسی ویژگی ضدباکتریایی نانوذرات سنتزشده انجام شد.

یافته‌ها: طول‌موج ۴۵۰-۴۰۰ نانومتر در طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش بر تشکیل نانوذرات نقره گواهی می‌دهد. میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان‌دهندهٔ شکل کروی و قطر بین ۷۰-۲۰ نانومتر هستند. مقدار IC50 بر ردهٔ سلول انسانی گلیوبلاستوما A-172 و سرطان سینه MCF-7 طی ۴۸ ساعت، به‌ترتیب ۷/۶ و ۷/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. نانوذرهٔ نقره فعالیت ضدباکتریایی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد. مطالعهٔ حاضر فعالیت ضد لشمانیایی مناسبی را علیه مراحل پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا ماژور تأیید کرد. مقادیر IC50 نانوذره و گلوکانتیم به‌ترتیب ۷۳/۸۹ و ۱۶/۱۷ میکروگرم در میلی‌لیتر برای پروماستیگوت و ۱۷۱/۰۲ و ۳۹۸/۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای آماستیگوت بود.

بحث و نتیجه‌گیری: عصاره زیرهٔ سیاه توانایی احیای یون‌های نقره به نانوذرات نقره را دارد و سمیت و فعالیت ضدباکتریایی و ضد لیشمانیایی مناسبی نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: آثار ضد لیشمانیا، زیرهٔ سیاه، سنتز سبز، سمیت سلولی، فعالیت ضدباکتریایی، نانوذرهٔ نقره

استناد: شریفی، فاطمه؛ محمدی، ندا؛ سلطانیان، سارا؛ دوست محمدی، محسن. سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصارهٔ متانولی گیاه زیرهٔ سیاه و ارزیابی میزان سمیت، فعالیت ضد لیشمانیا و ضدمیکروبی آن. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، بهمن ۱۴۰۱؛۳۰(۶): ۹-۲۰.

مقدمه

نانوذرات نقره به علت کاربرد وسیعی که در صنعت داروسازی و پزشکی دارد و همچنین به‌سبب ویژگی های زیستی ازجمله خواص ضدسرطانی، ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی و ضدالتهابی، توجه بسیاری را به خود جلب کرده است (۲، ۱). در بسیاری از تحقیقات از ترکیبات طبیعی میکروارگانیسم ها و به‌ویژه گیاهان برای سنتز نانوذرات استفاده می شود (۴، ۳). در این روش، گروه های عملکردی متابولیت های گیاهی مانند فنول ها، آلکالوئیدها و ترپن ها به‌عنوان عوامل پایدارکننده و احیاکننده در سنتز نانوذرات عمل می کنند و بنابراین، روشی مقرون‌به‌صرفه، با بازدهی بالا و غیرسمی است (۵).

زیرهٔ سیاه گیاه چندساله و خودگشن از خانوادهٔ چتریان (Apaiaceae) است که با نام علمی Boiss Bunium Persicumمعروف است. این گیاه یکی از مهم ترین و ارزشمندترین گیاهان دارویی است که به‌طور وحشی در مناطقی از ایران که آب‌وهوای خشک دارند، مانند استان‌های کرمان، فارس، اصفهان و یزد می رویند (۷، ۶). دانهٔ زیرهٔ سیاه در طب سنتی به‌عنوان ضدنفخ، ضدتشنج، ضدصرع، ضداسهال، تب‌بر، کاهندهٔ چربی و کلسترول خون، ضدآلرژی، تقویت‌کنندهٔ معده، ادرارآور و برطرف‌کنندهٔ سوءهاضمه به‌کار می‌رود (۱۳، ۱۲). دانه زیرهٔ سیاه غنی از عطرمایهٔ گیاهی است و از دیرباز، به‌عنوان چاشنی و طعم‌دهنده در انواع غذا مانند نوشابه، شکلات و پنیر استفاده‌شده است. تولید عطرمایه در زیرهٔ سیاه بیش از ۳ برابر زیرهٔ سبز است. زیرهٔ سیاه حاوی ترکیبات فراوانی ازجمله ترپن‌ها، فنل‌ها، فلاونوئیدها وآلکالوئیدها است که کاربردهای بسیاری در صنایع دارویی و غذایی دارد و همچنین خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدان مناسبی در آن دیده‌شده است (۸-۱۱).

هدف اولیهٔ این مطالعه سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصارهٔ متانولی زیرهٔ سیاه و تعیین ویژگی های نانوذرهٔ سنتزشده با استفاده از طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش (UV–Vis spectroscopy, Uv-Vi)، میکروسکوپ الکترونی روبشی انتشار میدانی (Field Emission Scanning Electron Microscope, FESEM)، طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه (Fourier transform infrared) FTIR بود؛ سپس میزان سمیت آن روی ردهٔ سلول های سرطانی، میزان خاصیت ضدباکتریایی و آثار ضد لیشمانیایی آن با استفاده از روش های مختلف بررسی گردید.

مواد و روش ها

جمع‌آوری و عصاره‌گیری گیاه: گیاه زیرهٔ سیاه از ارتفاعات جوپار استان کرمان، در ژوئیهٔ سال ۲۰۱۹ جمع‌آوری شد و یک گیاه‌شناس آن را شناسایی کرد. یک نمونه به مرکز هرباریوم در بخش فارماکوگنوزی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران (KF1432) سپرده شد. قسمت‌های هوایی گیاه خشک گردید و عصاره‌گیری با استفاده از روش ماسراسیون با متانول ۸۰ درصد به مدت ۷۲ ساعت صورت گرفت. عصارهٔ تغلیظ‌شده در آون خلأ (Vacucell, Einrich-tungen GmbH)، در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک و سپس تا زمان آزمایش، در فریزر دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنتز نانوذرات نقره: به‌منظور سنتز نانوذرات نقره، از نیترات نقره به‌عنوان منبع فلز استفاده گردید. برای این کار، ۳۰۰ میکرولیتر نیترات نقره (۰/۱ درصد) و ۱۰ میلی‌لیتر از عصارهٔ گیاه (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) مخلوط شدند. این مخلوط با آب دیونیزه چندین بار خوب شستشو داده و در آون با دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک گردید.

بررسی خصوصیات نانوذرات نقره: تشکیل نانوذرهٔ نقره با استفاده از روش طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش و دستگاه اسپکتروفتومتر (PerkinElmer، آلمان) در طول‌موج ۶۰۰-۳۰۰ نانومتر کنترل شد. برای تعیین گروه‌های عملکردی موجود، نانوذره تحت تجزیه‌وتحلیل طیفی FTIR قرار گرفت. برای بررسی اندازه، مورفولوژی و

توزیع نمونه‌های سنتزشده از میکروسکوپ FESEM استفاده گردید.

کشت سلول و تعیین میزان سمیت: در این مطالعه، دو ردهٔ سلولی گلیوبلاستومای انسان (A-172) و سرطان سینهٔ انسان (MCF-7) از بانک سلول انستیتو پاستور ایران تهیه شد. رده های سلولی در محیط کشت DMEM (Eagle's Medium Dulbecco's Modified)، حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovin Serum, FBS) یک درصد آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند و در انکوباتور دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO2 نگه‌داری گردیدند. میزان زنده ماندن سلول پس از قرارگیری در معرض غلظت های مختلف نانوذرهٔ نقره توسط روش رنگ‌سنجی MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) تعیین شد. به‌منظور پاساژ سلولی، ابتدا سلول ها به مدت ۳-۵ دقیقه در معرض آنزیم تریپسین قرار گرفتند و پس از تک‌سلولی شدن شمارش گردیدند و در هر خانه از پلیت ۹۶ خانه، به تعداد ۵۰۰۰ سلول توزیع شدند. پلیت به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید تا اینکه سلول ها در هر خانه به کانفوئنسی ۸۰-۷۰ درصد رسیدند. از نانوذرات نقره، ابتدا یک محلول با غلظت ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در آب مقطر استریل و سپس با استفاده از محیط کشت، غلظت های مختلف ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ساخته شد. پس از تیمار سلول ها با غلظت های مختلف نانوذره نقره به مدت ۴۸ ساعت، ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه اضافه گردید و ظرف حاوی سلول ها به مدت ۳ ساعت انکوبه شد؛ سپس محتوای چاهک ها به‌دقت خارج گردید و بلورهای فورمازان نامحلول بنفش با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide, DMSO) حل و درنهایت، جذب نوری به‌وسیلهٔ دستگاه قرائت‌گر الایزا (BioTek- ELx800) در طول‌موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبهٔ درصد زنده ماندن سلول ها، میانگین جذب پس تیمار با غلظت های مختلف نانوذرهٔ نقره بر میانگین جذب سلول های کنترل تقسیم و عدد به‌دست‌آمده در ۱۰۰ ضرب گردید. نتایج به‌دست‌آمده برای هر ردهٔ سلولی استفاده شد تا غلظت موردنیاز برای مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد (IC_{50})، توسط برنامه probit در نرم‌افزار SPSS vol.18 محاسبه گردد.

فعالیت ضدباکتریایی نانوذرهٔ سنتزشده: بررسی آثار ضدباکتریایی نانوذرهٔ نقرهٔ سنتزشده علیه باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylo-coccus aureus*, ATCC 6538)، باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*, ATCC 6051) و اشرشیاکلای (*Escherichia coli*, ATCC11303) با روش انتشار از چاهک در آگار صورت گرفت. بدین منظور از سوسپانسیون هر میکروب به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر روی پلیت حاوی مولر هینتون آگار ریخته و با سواپ استریل در سه جهت به‌صورت انبوه کشت داده شد؛ سپس در سطح هریک از پلیت های کشت داده‌شده چاهک هایی به قطر ۶ میلی‌لیتر ایجاد گردید و درون هر چاهک مقدار ۵۰ میکرولیتر از رقت های مختلف (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) نانوذرهٔ نقره ریخته شد. از آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (Ciprofloxacin) (۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و آب دیونیزه به‌عنوان کنترل مثبت و منفی به‌ترتیب استفاده گردید. آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.

بررسی اثر کشندگی رقت‌های مختلف نانوذرهٔ نقره روی انگل لیشمانیا ماژور به روش MTT؛ تهیه و کشت انگل: در این تحقیق از پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور (Promastigotes of Leishmania. Major) سویهٔ MRHO/IR/75/ER تهیه‌شده از مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران، استفاده گردید. پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور در محیط کشت RPMI 1640 حاوی سرم جنین گوساله کشت داده شد.

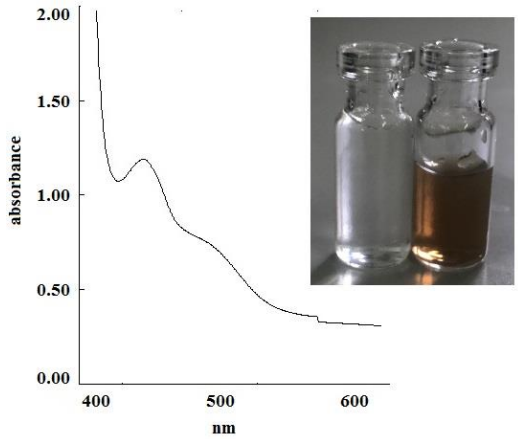
بررسی آثار ضد پروماستیگوتی (Anti-promastigotes) نانوذره: اثر کشندگی نانوذرهٔ نقرهٔ سنتزشده توسط گیاه زیرهٔ سیاه روی پروماستیگوت های انگل لیشمانیا ماژور در شرایط

آزمایشگاهی بررسی گردید. بدین منظور، رقت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرهٔ نقره تهیه شد. تعداد 10^6 سلول از پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور در فاز ثابت رشد در ۱۰۰× ۲/۵ از میکرولیتر محیط کشت RPMI 1640در هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ چاهکی کشت گردید. حجم ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های مختلف نانوذره به هر چاهک اضافه شد. در چاهک شاهد، تنها محیط کشت و در چاهک کنترل محیط کشت و انگل اضافه گردید. پس از ۷۲ ساعت از انکوباسیون، میکروپلیت توسط سانتریفوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد، با دور ۲۷۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی به‌آرامی تخلیه گردید و ۱۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات به هر چاهک اضافه شد. میزان رنگی که تولید می‌شود، با میزان زنده بودن سلول ها و فعالیت متابولیکی سلول‌ها متناسب است. درنهایت، میزان جذب توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا (BioTek- ELx800) در ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ۵۰ درصد غلظت مهاری (مقادیر IC_{50}) نیز توسط برنامهٔ probit در نرم‌افزار SPSS vol.18 محاسبه گردید (۱۲).

آنالیز آماری داده‌ها: همهٔ آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. تجزیه‌وتحلیل داده ها با استفاده از بستهٔ آماری SPSS vol.18 انجام شد. تفاوت میان گروه های آزمون و کنترل با استفاده از آزمون t و ANOVA تجزیه‌وتحلیل گردید. علاوه بر این، $P<0.05$ به‌عنوان آماری معنی دار تعریف شد. مقادیر IC_{50} (غلظت مهاری ۵۰ درصد) با استفاده از آزمون Probit در SPSS محاسبه گردید.

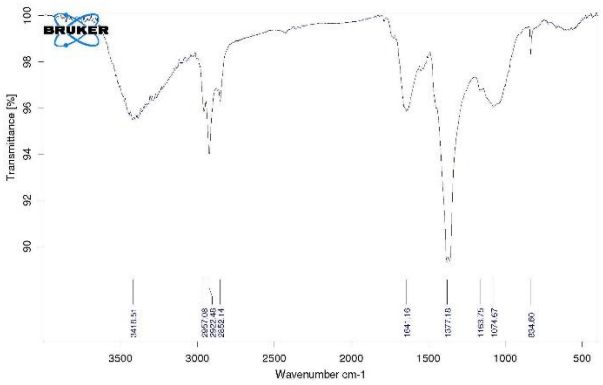
یافته ها

بررسی خصوصیات نانوذرات نقرهٔ تولیدشده با گیاه زیره: روش سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از احیای یون‌های نقره به‌وسیلهٔ عصارهٔ گیاه زیره انجام شد. اولین نشانهٔ تولید نانوذرات نقره تغییر رنگ محلول است. تغییر رنگ نیترات نقره از زرد کم‌رنگ به زرد مایل به قهوه‌ای پس از ۲۴ ساعت مشاهده گردید. همان‌طور که در شکل شمارهٔ ۱ دیده می‌شود، طیف جذبی نانوذره در محدودهٔ ۴۵۰-۴۰۰ نانومتر توسط طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش ظاهر شد.

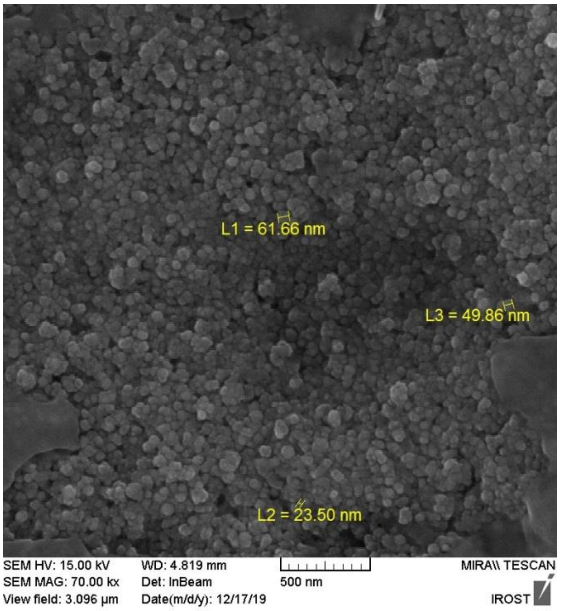


شکل شمارهٔ ۱. طیف اشعهٔ ماوراءبنفش نانوذرات نقرهٔ سنتزشده با استفاده از عصارهٔ گیاه زیره

خصوصیات نانوذرات با استفاده از FTIR مشخص گردید. شکل شمارهٔ ۲ نمودار حاصل از طیف‌سنجی نانوذرات را نشان می دهد. طیف حاصل از رسوب نانوذرات به‌دست‌آمده توسط عصاره گیاه زیره، پیک هایی در محدودهٔ ۳۴۱۸، ۲۹۵۷، ۲۹۲۲، ۲۸۵۲، ۱۶۴۱، ۱۳۷۷، ۱۱۶۳، ۱۰۷۴ و ۸۳۴ Cm-1 نشان داد. باند جذب در ۳۴۱۸ ممکن است به علت فرکانس های هیدروکسیل (OH) باشد. ظاهر قله در ۲۹۲۲، ۲۹۵۷، ۲۸۵۲ و ۱۶۴۱ مربوط به ارتعاشات کششی C-H گروه های آلیفاتیک موجود در عصارهٔ گیاه است؛ همچنین پیک های موجود در ۱۳۷۷، ۱۱۶۳، ۱۰۷۴ Cm-1 مربوط به ارتعاشات کششی آلکن‌ها و ارتعاشات خمشی C-H و پیک موجود در ۸۳۴ Cm-1 مربوط به فرکانس های C-Cl است. تصاویر SEM تشکیل نانوذرهٔ نقره به شکل کروی در اندازهٔ بین ۷۰-۲۰ نانومتر را نشان داده است (شکل شمارهٔ ۳).



شکل شمارهٔ ۲. طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR) در نانوذرات نقرهٔ سنتزشده با استفاده از عصارهٔ گیاه زیره در محدودهٔ ۴۰۰-۱۴۰۰۰Cm-

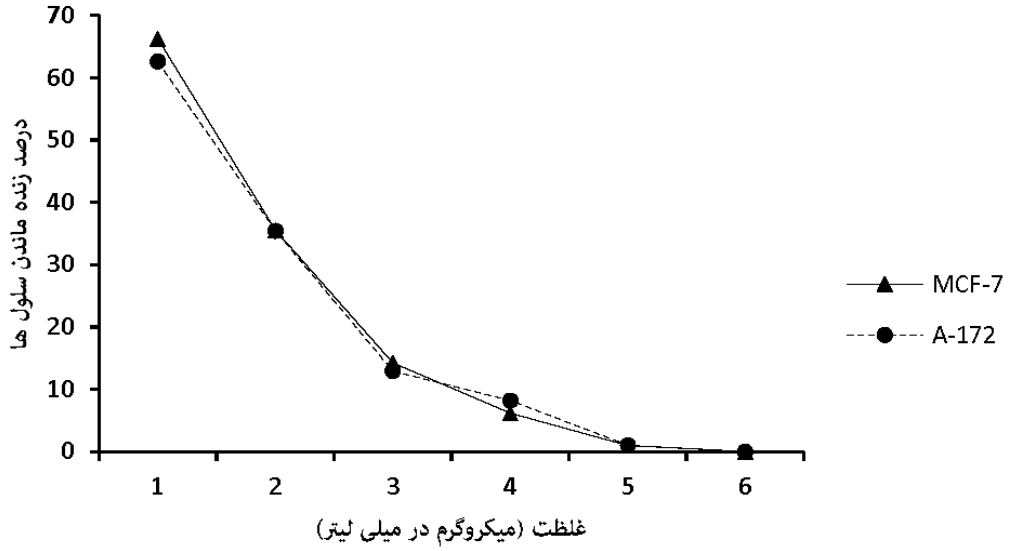


شکل شمارهٔ ۳. تصویر و توزیع ذره‌ای نانوذرات نقرهٔ سنتزشده با استفاده از عصارهٔ گیاه زیره به‌وسیلهٔ میکروسکوپ الکترونی SEM

بررسی میزان سمیت نانوذرهٔ نقره: به‌منظور بررسی آثار نانوذرات نقرهٔ سنتزشده به روش سبز روی تکثیر سلول های سرطانی گلیوبلاستوما و سینه، از روش MTT استفاده گردید. آثار سمیت با غلظت های مختلف ۵ تا ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان تیمار گزارش شد. نتایج سنجش میزان زنده ماندن سلول ها در غلظت های مختلف نانوذرهٔ نقره بر اساس رنگ‌سنجی MTT در شکل شمارهٔ ۴ ارائه گردید. نتایج مهار رشد سلول ها را به‌صورت وابسته به غلظت، پس از گذشت زمان ۴۸ ساعت نشان داد. بدین ترتیب با تعیین مقدار IC_{50} مشخص شد که به‌ترتیب غلظت ۷/۲ و ۷/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر در ۴۸ ساعت، به مرگ ۵۰ درصد از سلول های A-172 و MCF-7 منجر شده است.

فعالیت ضدباکتریایی نانوذرهٔ نقره: بررسی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرهٔ نقرهٔ سنتزشده بر سه گونه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلای و باسیلوس سوبتیلیس نشان داد که غلظت ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرهٔ نقره هیچ اثر مهاری بر رشد باکتری های بررسی‌شده ندارد؛

همچنین مطالعات نشان داد، درحالی‌که آنتی‌بیوتیک سیپروفلاکسین کمترین اثر مهاری را در رشد باسیلوس سوبتیلیس در مقایسه با دو باکتری دیگر دارد، غلظت ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذره اثر مهاری بسیار بیشتری روی رشد باسیلوس سوبتیلیس، در مقایسه با استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلای نشان می دهد (جدول شمارهٔ ۱).

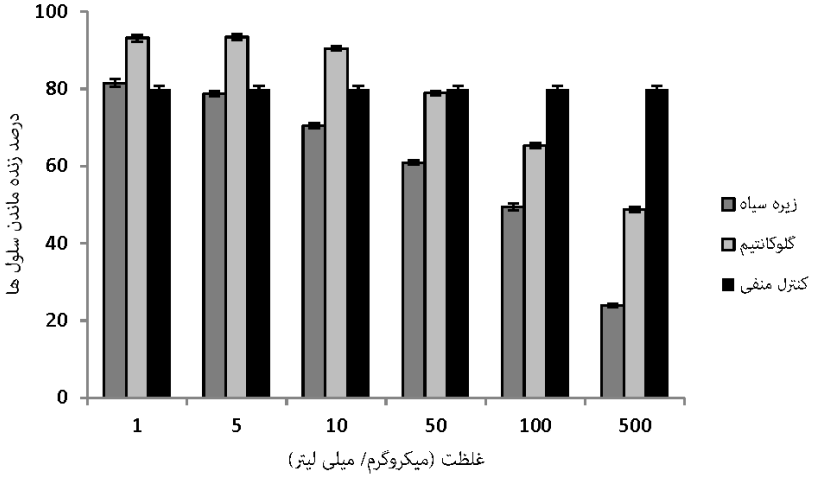


شکل شمارهٔ ٤. اثر سمیت نانوذرهٔ نقرهٔ سنتزشده روی ردهٔ سلول های گلیوبلاستومای انسانی A-172 و سینهٔ انسان MCF-7. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف نانوذره به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و آزمون رنگ‌سنجی MTT روی آن‌ها انجام گردید و میزان درصد زنده ماندن سلول‌ها در غلظت‌های مختلف محاسبه شد

جدول شمارهٔ ۱. قطر هالهٔ عدم رشد میکروبی در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره با روش انتشار از چاهک (برحسب میلی‌متر)

	غلظت‌های نانوذرهٔ نقره (میکروگرم در میلی‌لیتر)				
میکروارگانیسم	۲۵	۵۰	۷۵	۱۰۰	سیپروفلاکسین
استافیلوکوکوس اورئوس	۰	۰	۱۱±۰/۸۱	۲۶/۶۶±۳/۲	۲۱۵
اشرشیاکلای	۰	۰	۷±۰/۸	۳۳/۳۳±۲/۳	۱۷۳
باسیلوس سوبتیلیس	۰	۰	۴۳±۳	۹۱/۳۳±۱/۸	۱۱/۶

اثر ضد پروماستیگوت نانوذرهٔ نقره: شکل شمارهٔ ۵، درصد زنده‌مانی سلول (درصد) برای نانوذرهٔ نقره و گلوکانتیم در مقابل کنترل تیمارنشده را نشان می‌دهد. مقادیر IC_{50} برای نانوذرهٔ نقره و گلوکانتیم به‌ترتیب ۷۳/۸۹±۲/۳۲ و ۳۹۸/۵۱±۲۱/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. میان نانوذرهٔ نقره و گلوکانتیم تفاوت معنی‌داری وجود داشت.



شکل شمارهٔ ۵. تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرهٔ نقره و گلوکانتیم (داروی کنترل) بر درصد زنده ماندن پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور

بحث و نتیجه‌گیری

تاکنون مطالعات بسیاری روی فعالیت های زیستی نانوذرات نقرهٔ سنتزشده توسط سنتز سبز انجام‌شده و ویژگی های مختلفی ازجمله اثر سمیت آن‌ها بر رده‌های سلول های سرطانی و اثر ضدمیکروبی آن‌ها به اثبات رسیده است؛ به‌عنوان‌مثال، نانوذرات نقرهٔ سنتزشده توسط عصاره های گیاهی مختلف مانند *Salvia officinalis*، *Annona squamosa*، *Piper longum*، *Morinda-citrifolia*، *Semenovia suffruticosa* و *Artemisia quttensis* آثار سمیت چشمگیری علیه رده های سلول های سرطانی نشان داده‌اند (۱۳-۱۵، ۲). اندازه، شکل و بار نانوذرات فلزی عامل‌های مهمی هستند که بر میزان سمیت آن‌ها اثر می گذارد؛ به‌عنوان‌مثال، شکل و اندازهٔ نانوذرات با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species, ROS) مرتبط است (۱۶). علاوه بر این، ترکیبات مختلف گیاهی که روی سطح نانوذرات متصل‌اند، عامل مؤثری در القای آثار سمیت آن‌ها هستند؛ درنتیجه، نانوذرات نقرهٔ سنتزشده با استفاده از عصاره های گیاهان مختلف می تواند به آثار سمی مختلفی منجر شود؛ بنابراین، آثار سمیت بالاتر نانوذرات سنتزشده با عصارهٔ گیاهان در مقایسه با عصارهٔ خالص می تواند به علت آثار سینرژیستیک یون های فلزی و ترکیبات ارگانیک طبیعی گیاهان باشد (۱۷، ۱۴). نانوذرات نقره روی سلول های سرطانی، در مقایسه با سلول های طبیعی، به‌طور انتخابی اثر نمی گذارد و این مسئله سبب می‌گردد آثار جانبی بسیاری داشته باشد و استفادهٔ آن را در درمان سرطان محدود کند. نانوذرات نقره توسط سلول های پستانداران با سازوکارهای مختلف جذب می شود؛ مانند پینوسیتوز، فاگوسیتوز و اندوسیتوز (۱۶).

در مطالعهٔ انجام‌شده روی اثر سمیت نانوذرهٔ نقرهٔ سنتزشده با عصارهٔ گیاه *Salvia officinalis* مشاهده شد که میزان IC_{50} آن روی رده سلول های MCF-7 و A-172 به‌ترتیب ۵۸/۶ و ۵۰/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر است (۲)؛ همچنین بررسی اثر سمیت نانوذرهٔ نقرهٔ سنتزشده با عصارهٔ گیاه *Semenovia suffruticosa* نشان داد که میزان IC_{50} آن روی چند ردهٔ سلولی سرطانی ۱۵ الی ۲۶ میکروگرم در میلی‌لیتر است (۱). **در** مطالعهٔ دیگری، نانوذرات نقرهٔ سنتزشده به‌وسیلهٔ عصارهٔ برگ گیاه Annona Squamosa، اثر سمیت بر ردهٔ سلول‌های سرطان سینه MCF-7 و سلول‌های اپی‌تلیال نرمال سینه HBL-100 با میزان IC_{50} ۵۰ و ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان داد و این نتایج نیز نشان‌دهندهٔ آن است که سلول‌های طبیعی در برابر نانوذرات نقره، مقاومت بیشتری نسبت به سلول‌های سرطانی ندارند (۱۳). در مقایسه با مطالعات اخیر، نانوذرات نقرهٔ ساخته‌شده با عصارهٔ زیرهٔ سیاه IC_{50}تقریباً ۷ میکروگرم در میلی‌لیتر را روی دو ردهٔ سلولی گلیوبلاستوما و سرطان سینه انسان نشان داد که نشان‌دهندهٔ سمیت بسیار بالای آن است. مقاومت باکتری ها به آنتی‌بیوتیک‌ها و یون‌های فلزی به این امر منجر شد که دانشمندان به دنبال عواملی باشند که توانایی مهار باکتری های پاتوژن را دارند. مطالعات مختلف نشان داد که نانوذرات نقرهٔ سنتزشده با گیاهان مختلف فعالیت های ضدباکتریایی نشان می دهند (۱۸، ۲، ۱)؛ بنابراین، نانوذرات نقره به‌طور گسترده در پزشکی، صنایع غذایی و دارویی استفاده می‌شوند (۲۰، ۱۹، ۱۴). چندین سازوکار برای اثر ضدباکتریایی نانوذرهٔ نقره پیشنهادشده است. به‌نظر می آید که یون های نقرهٔ رهاشده از نانوذرهٔ نقره فعالیت ضدباکتریایی را افزایش می دهد و همچنین تکثیر DNA، عملکرد تنفس، سنتز ATP و رشد باکتری را مهار می کند و درنهایت، به مرگ سلول منجر می شود (۲۲، ۲۱). انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها نیز با سازوکارهای مختلف باعث مهار رشد باکتری ها می گردند؛ به‌عنوان‌مثال، سیپروفلوکساسین که در این آزمایش به‌عنوان کنترل مثبت برای مهار رشد باکتری ها استفاده شد، پس از نفوذ به غشای سلول باکتری، سنتز DNA را با جلوگیری از اثر DNA جیراز در باکتری متوقف می‌کند (۲۳). محدودیت استفاده از بسیاری از

آنتی‌بیوتیک‌ها به علت عوارض جانبی ناشی از مصرف آن‌ها است؛ بنابراین، یافتن جایگزین‌های مناسب با عوارض جانبی کمتر نیاز است. استفاده از نانوذرات نقرهٔ سنتزشده به روش بیولوژیکی، به‌سبب آثار منحصربه‌فرد آن‌ها علیه فرایندهای نامطلوب زیستی مانند خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی، به‌عنوان روش جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها برای مقابله با عفونت ها می‌تواند مؤثر باشد (۲۵، ۲۴). بررسی اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقرهٔ سنتزشده با عصارهٔ برگ گیاه کرفس کوهی علیه استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلای، سالمونلا تیفی موریوم، لیستریا مونوسیتوژنز، آسپرژیلوس فلاووس، پنی‌سیلیوم اکسپانسوم و کلاویسپس پورپورا، نشان‌دهندهٔ فعالیت ضدمیکروبی بالای آن علیه همهٔ میکروارگانیسم های مطالعه‌شده بود (۲۶)؛ همچنین نانوذرات نقرهٔ سنتزشده با عصارهٔ تهیه‌شده از گیاهان Berberis vulgaris، Brassica nigra، Capsella bursa-pastoris، Lavandula angustifolia و Origanum vulgare، فعالیت ضدمیکروبی بالاتری نسبت به آنتی‌بیوتیک gentamicin sulpha نشان داد (۲۶). در مطالعهٔ دیگر مشاهده شد که نانوذرات نقرهٔ سنتزشده با عصارهٔ گیاه S.suffruticosa فعالیت ضدباکتریایی مناسبی علیه باکتری های گرم منفی مانند اشرشیاکلای و سودوموناس اورئوس نشان می دهد؛ اما در مقابل، این نانوذرات فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری های گرم مثبت نشان نمی دهد. آثار متفاوت این نانوذره روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی، به علت ساختار دیوارهٔ سلول باکتری های گرم منفی است که انتقال یون های نقره را به غشای پلاسمایی باکتری های گرم منفی تسهیل می کند (۱). نتایج مطالعهٔ دیگر نشان داد که نانوذرات نقرهٔ سنتزشده با عصارهٔ S.officinalis در غلظت بالا فعالیت ضدباکتریایی علیه استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سابتیلوس نشان می دهد (۲). مطالعه اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقرهٔ سنتزشده با عصارهٔ برگ گیاه چای pu-erh نیز نشان‌دهندهٔ فعالیت ضدمیکروبی قوی آن علیه پاتوژن‌های مواد غذایی است (۲۷)؛ بنابراین، نانوذرات نقرهٔ سنتزشده با عصارهٔ گیاهان مختلف طیف گسترده‌ای از آثار ضدمیکروبی ضعیف و قوی نشان دادند.

لیشمانیوز جلدی یکی از بیماری های مهم و اندمیک در برخی از کشورهای مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری ازجمله ایران به‌حساب می آید. این بیماری در سال‌های اخیر در برخی استان های ایران روند افزایشی به خود گرفته است (۲۸). درمان معمول لیشمانیوزها استفاده از ترکیبات آنتیموان پنج ظرفیتی است که این داروها گران، کمیاب و دارای عوارض جانبی شدید هستند. علاوه بر این، درمان با آن‌ها زمان‌بر است و همچنین در سال‌های اخیر موارد متعددی از مقاومت دارویی این ترکیبات گزارش‌شده است که کارایی درمانی آن‌ها زیر سؤال می‌برد (۲۹).

برای تعیین آثار نانوذرهٔ نقره روی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور و مقایسهٔ بررسی اثر ضد لیشمانیایی آن با گلوکانتیم، از روش رنگ سنجی MTTاستفاده گردید که نتایج نشان داد، با افزایش غلظت، موجب افزایش مهار رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور می‌شود و کاهش جذب نوری بیانگر این اثر مهاری است؛ همچنین در مقایسهٔ میانگین جذب نوری میان داروی کنترل و نانوذرهٔ بررسی‌شده، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده گردید. در ایران، در مطالعات متعددی از این روش رنگ‌سنجی برای بررسی اثر ضد لیشمانیایی نانوذره ها و عصاره‌های گیاهی، به علت فوایدی ازجمله سادگی، سهولت، تکرارپذیری، ارزانی، ایمن و قابل‌اطمینان بودن، استفاده‌شده است.

دربارهٔ ارزیابی خواص دارویی و سمیت فرآورده‌ها و ترکیبات جدید، عده‌ای به کاهش استفاده از حیوانات در شرایط آزمایشگاهی اعتقاد دارند که این امر سبب گسترش روش‌های برون‌تنی گردیده است. در یک روش از پروماستیگوت ها برای بررسی تأثیر

مواد ضد لیشمانیایی در شرایط آزمایشگاهی استفاده می‌شود. در این زمینه، اثر ضد لیشمانیایی عصاره‌های آویشن شیرازی و اسپند در مقایسه با داروی کنترل بررسی شد، به‌طوری‌که عصاره ها و داروی کنترل تأثیر مناسبی بر مهار رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور نشان دادند (۳۰)؛ همچنین در مطالعهٔ دیگری، عصاره‌های درمنه کوهی، آنقوزه و قوزهٔ پنبه رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی را مهار کردند (۳۱). با توجه به نتایج این مطالعه و مقایسه با مطالعات گذشته، این نانوذره به‌صورت آزمایشگاهی تـأثیر مناسبی بر پروماستیگوت ها لیشمانیا ماژور دارد.

بـا توجه به نتایج بررسی حاضر امید است بتوان با اسـتفاده از ایـن دارو، در درمان بیماری سالک گام‌های مؤثری برداشت.

مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که عصارهٔ بذر زیره توانایی مناسبی برای تولید نانوذرات نقره دارد. عصاره و نانوذرات تولیدشده دارای پتانسیل زیستی چشمگیری از نظر سمیت روی ردهٔ سلول‌های سرطانی، آثار ضدمیکروبی و ضد لیشمانیا است و در صورت انجام مطالعات تکمیلی و بررسی آثار جانبی و نیز بهینه‌سازی شرایط می‌توان از آن‌ها در صنایع غذایی، داروسازی و کشاورزی و در آینده نزدیک، به‌عنوان مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی طبیعی با اثربخشی بیشتر استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از همکاری‌های صمیمانهٔ خانم دکتر میترا مهربانی، رییس مرکز تحقیقات داروهای گیاهی دانشکدهٔ داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمان، برای در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می کنیم.

تعارض منافع

مقاله نویسندگان مقاله هیچ گونه تعارض منافعی با همدیگر ندارند.

کد اخلاق:

در این تحقیق مطالعه ای بر روی انسان و حیوان انجام نشده و فاقد کد اخلاق می باشد.

References

1. Dipankar C, Murugan S. The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from Iresine herbstii leaf aqueous extracts. Colloids Surf B Biointerfaces 2012; 98: 112-19. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.04. 006.
2. Sharifi F, Sharififar F, Soltanian S, Doost-mohammadi M, Mohamadi. Synthesis of silver nanoparticles using Salvia officinalis extract: Structural characterization, cyto-toxicity, antileishmanial and antimicrobial activity. Nanomed Res J 2020; 5: 339-46. doi: 10.22 034/nmrj2020.04.005
3. Gour A, Jain NK. Advances in green synthesis of nanoparticles. Artif Cells Nanomed Biotechnol 2019; 47: 844-51. doi: 10.1080/21 691401.2019.1577878.
4. Nisar P, Ali N, Rahman L, Ali M, Shinwari ZK. Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles: an insight into the mechanism of action. J Biol Inorg Chem 2019; 24: 929-41. doi: 10.1007/s00775-019-01717.
5. Soltanian S, Sheikhbahaei M, Mohamadi N. Cytotoxicity evaluation of methanol extracts of some medicinal plants on P19 embryonal carcinoma cells. J Appl Pharm Sci 2017; 7: 142-9. doi: 0.7324/JAPS.2017.70722
6. Karimzadeh MR, Soltanian S, Sheikhbahaei M, Mohamadi N. Characterization and biological activities of synthesized zinc oxide nanoparticles using the extract of Acan-tholimon serotinumn. Green Process Synth 2020; 9: 722-33. doi: org/10.1515/gps-2020-0058.
7. Soltanian S, Sheikhbahaei M, Mohamadi N, Pabarja A, Fekri Soofi Abadi M, Mohammadi Tahroudi MH. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using hertia intermedia and evaluation of its cytotoxic and antimicrobial activities. Bio Nano Sci 2021; 11:245-55. doi: org/10.1007/s12668-020-00816-z.
8. Kunzemann J, Herrmann K. Isolation and identification of flavon (ol)-O-glycosides in caraway (Carum carvi L.), fennel (Foeniculum vulgare Mill.), anise (Pimpinella anisum L.), and coriander (Coriandrum sativum L.), and of flavon-C-glycosides in anise. I. Phenolics of spices (author's transl). Z Lebensm Unters

Forsch 1977; 164: 194-200. doi: 10.1007/BF 01263030.
9. Sekine T, Sugano M, Majid A, Fujii Y. Antifungal effects of volatile compounds from black zira (Bunium persicum) and other spices and herbs. J Chem Ecol 2007; 33: 2123-32. doi: 0.1007/s10886-007-9374-2.
10. Hassanzad Azar H, Taami B, Aminzare M, Daneshamooz S. Bunium persicum (Boiss.) B. Fedtsch: An overview on Phytochemistry, Therapeutic uses and its application in the food industry. J Appl Pharm Sci 2018; 8: 150-58. doi:10.7324/JAPS.2018.81019.
11. Khan I, Bawazeer S, Rauf A, Qureshi MN, Muhammad N, Al-Awthan YS, et al. Synthesis, biological investigation and catalytic application using the alcoholic extract of Black Cumin (Bunium Persicum) seeds-based silver nanoparticles. J Nanostructure Chem 2022; 12: 59-77. doi: 10.1007/s40097-021-00402-z.
12. Bamorovat M, Sharifi I, Aflatoonian MR, Sharifi H, Karamoozian A, Sharifi F, et al. Risk factors for anthroponotic cutaneous leishmaniasis in unresponsive and responsive patients in a major focus, southeast of Iran. PloS one 2018; 13: e0192236. doi: 10.1371/ journal.pntd.0000639.
13. Vivek R, Thangam R, Muthuchelian K, Gunasekaran P, Kaveri K, Kannan S. Green biosynthesis of silver nanoparticles from Annona squamosa leaf extract and its in vitro cytotoxic effect on MCF-7 cells. Process Biochem 2012; 47: 2405-10. doi: 10.1016/ j.procbio.2012.09.025.
14. Mohanta YK, Panda SK, Jayabalan R, Sharma N, Bastia AK, Mohanta TK. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of silver nanoparticles synthesized by leaf extract of Erythrina suberosa (Roxb.). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of silver nanoparticles synthesized by leaf extract of Erythrina suberosa (Roxb.) Front Mol Biosci 2017; 4: 14. doi: 10.3389/fmolb.2017. 00014/full.
15. Soltanian S, Mahboubeh S, Fatemeh S, Mohamadi N. Synthesis and Biological Characterization of Silver Nanoparticles Biosynthesized by Semenovia suffruticosa. J Nano Res 2021; 66: 45-60. doi: 10.4028/www.scientific.net/JNanoR.66.45.
16. Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. Biotechniques 1997; 23 (3): 525-531. doi: 10.2144/97233pf01.
17. Kajani AA, Zarkesh-Esfahani SH, Bordbar A-K, Khosropour AR, Razmjou A, Kardi M. Anticancer effects of silver nanoparticles encapsulated by Taxus baccata extracts. J Mol Liq 2016; 223: 549-56. doi: 10.2144/97233 pf01.
18. Sivanandam V, Purushothaman M, Karunanithi M. Green synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extract and evaluation of their antibacterial and in vitro antioxidant activity. Asian Pac J Trop Biomed 2020; 6: 100086. doi: 10.1016/j.rinma.2020.100086.
19. Ghanbar F, Mirzaie A, Ashrafi F, Noorbazargan H, Jalali MD, Salehi S, et al. Antioxidant, antibacterial and anticancer properties of phyto-synthesised Artemisia quttensis Podlech extract mediated AgNPs. IET nanobiotechnol 2017; 11: 485-92. doi: 10.1049/iet-nbt.2016.0101.
20. Gao X, Yourick JJ, Topping VD, Black T, Olejnik N, Keltner Z, et al. Toxicogenomic study in rat thymus of F1 generation offspring following maternal exposure to silver ion. Toxicol rep 2015; 2: 341-50. doi: 10.1016/j. toxrep.2014.12.008.
21. Feng QL, Wu J, Chen G, Cui F, Kim T, Kim J. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. J Biomed Mater Res 2000; 52: 662-8. doi: 10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::AID-JBM10>3.0. CO;2-3
22. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 2005; 16: 2346. doi: 10.1088/ 0957-4484/16/10/059/meta
23. Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microbiol Mol Biol Rev 1997; 61: 377. doi: 10.1128/mmbr.61.3. 377-392.1997.
24. Black B, Beadle K, Harding SJ. Out of sight, out of mind: Impact of an antimicrobia stewardshipinitiative to reduce fluoroquinolone utilization. J Clin Pharm Ther 2022; 5: 668-73.doi: doi.org/10.1002/jac5.1658.
25. Liu X, Huang L, Zhu W, Yuan P, Wan R, et al. Fluoroquinolones increase the risk of serious arrhythmias: a systematic review and meta-analysis. Medicine 2017; 96 :44. doi: 10.1097/MD.0000000000008273.
26. Salayová A, Bedlovičová Z, Daneu N, Baláž M, Lukáčová Bujňáková Z, Balážová Ľ, et al. Green synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity using various medicinal plant extracts: Morphology and antibacterial efficacy. Nanomaterials 2021; 11:1005. doi:10. 3390/nano11041005.
27. Loo YY, Rukayadi Y, Nor-Khaizura MAR, Kuan CH, Chieng BW, Nishibuchi M, et al. In vitro antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles against selected gram-negative foodborne pathogens. Front microbiol 2018; 9: 1555. doi: 10.3389/fmicb.2018.
28. Foroutan M, Khademvatan S, Majidiani H, Khalkhali H, Hedayati-Rad F, Khashaveh S, et

al. Prevalence of Leishmania species in rodents: a systematic review and meta-analysis in Iran. Acta tropica 2017; 172: 164-72. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.04.022.
29. Piroozi B, Moradi G, Alinia C, Mohamadi P, Gouya MM, Nabavi M, et al. Incidence, burden, and trend of cutaneous leishmaniasis over four decades in Iran. Iran J Public Health 2019; 48: 28-35.
30. Barati M, Sharifi I, Sharififar F, Hakimi Parizi M, Shokri A. Anti-leishmanial activity of gossypium hirsutum L. Ferula assa-foetida L. and Artemisia aucheri Boiss. Extracts by colorimetric assay. Antiinfec Agents 2014; 12: 159-164.
31. Barati M, Sharifi L,Sharififar F. Antileishmanial activity of Artemisia aucheri, Ferula asafoetid and Gossypium hirsutum extracts on Leishmania major promastigotes in vitro. Ann Military Health Sci Res 2011; 8:166-72.