

Investigation of the anti-amyloidogenic and antioxidant effects of silver nanoparticles synthesised with leaf extract of *Thymus kotschyanus Boiss*

Zolfaghar Lotfi ¹ , Fatemeh Maleki ¹ , Somayeh Farhamand ^{1*} 

¹Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:

Received: 15 April 2023
Revised: 04 July 2023
Accepted: 24 October 2023
Published Online: 26 November 2023

* Correspondence to:

Somayeh Farhamand
Dept of Biology, Faculty of
Basic Sciences, Payame Noor
University (PNU), Tehran,
Iran
Email:
s.farahmand@pnu.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: The extract of *Thymus kotschyanus Boiss*, in addition to its antioxidant properties, also has a marvellous anti-amyloidogenic effect that can be used for the treatment of amyloidosis. The aim of this study was to prepare silver nanoparticles from the aqueous extract of mountain thyme (*Thymus kotschyanus Boiss*), to investigate its antioxidant and inhibitory effect on the production of amyloid nanofibrils (bovine serum albumin (BSA) as a model protein).

Material & Methods: This study was conducted experimentally in the laboratory of Payam Noor University in Qom Province in 2022. First, nanoparticles were prepared from aqueous thyme extract and added to AgNO₃ silver nitrate solution (one millimolar). Then FTIR, EDX, DLS and SEM methods were used to study the properties and size of the nanoparticles. The removing of free radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method was used to study the antioxidant effects of the extract and the Concorde absorption method was used to study the production of amyloid nanofibrils. The chemical composition of the extract was analysed using the gas chromatography method. For statistical analysis, descriptive statistics and ANOVA tests were used with SPSS software version 23.

Findings: The phytochemical analysis of the extract revealed seven compounds. Most compounds were associated with 5,4- α -epoxy-3-methoxy (43.53%), 2-ethyl-piperidine-1-methyl (31.02%) and thymol (23.65%). The UV-Vis spectrum showed the highest absorbance at 460 nm. The SEM results confirmed the production of spherical nanoparticles with a size of 70-93 nm. The concentrations of 0.8 and 1 mg/ml of the extract were able to inhibit DPPH by more than 50%. The highest antioxidant activity in the sample containing 2 ml of the nanoparticle solution (sample 5) was 56.82%. The highest inhibition of amyloid nanofibril production was observed at a concentration of 2 mg/ml with 95%.

Discussion & Conclusion: Thus, the synthesized nanoparticles have potent antioxidant and anti-amyloidogenic properties and can be used as antioxidants.

Keywords: Alzheimer, Amyloid nanofibrils, Anti-amyloidogenic, Antioxidant, Silver nanoparticle, *Thymus kotschyanus Boiss*

➤ How to cite this paper

Lotfi Z, Maleki F, Farhamand S. Investigation of the anti-amyloidogenic and antioxidant effects of silver nanoparticles synthesised with leaf extract of *Thymus kotschyanus Boiss*. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2023;31(5): 1-13.

بررسی ویژگی‌های آنتی‌آمیولیدوزنیک و آنتی‌اکسیدانی نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره برگ آویشن کوهی (*Thymus kotschyanus* Boiss)

ذوالفقار لطفی^۱، فاطمه ملکی^۱، سمیه فرهمند^{۱*} ID

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۶

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۴/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۲

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۹/۰۵

نویسنده مسئول:

سمیه فرهمند

گروه زیست شناسی، دانشکده

علوم پایه، دانشگاه پیام نور،

تهران، ایران

Email:

s.farahmand@pnu.ac.ir

مقدمه: عصاره آویشن کوهی علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی مناسب، اثر آنتی‌آمیولیدوزنیک فوق‌العاده‌ای دارد که از این خاصیت می‌توان برای درمان انواع بیماری‌های آمیولیدوز استفاده کرد. هدف از این مطالعه تولید نانوذرات نقره از عصاره آبی آویشن کوهی (*Thymus kotschyanus* Boiss)، بررسی آثار آنتی‌اکسیدانی و مهارت آن بر تولید نانوفیبریل‌های آمیولیدی (آلبومین سرم گاوی (BSA) به‌عنوان یک پروتئین مدل) بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به روش تجربی در آزمایشگاه دانشگاه پیام نور استان قم در سال ۱۴۰۱ انجام شده است. ابتدا نانوذرات از عصاره آبی آویشن تهیه گردید و به محلول نیترات نقره AgNO₃ (یک میلی‌مولار) اضافه شد؛ سپس از روش‌های طیف‌سنجی (مادون‌قرمز)، پراکندگی انرژ، پراکندگی نور دینامیکی و میکروسکوپ الکترونی (SEM) برای بررسی ویژگی‌ها و اندازه نانوذرات استفاده گردید. برای بررسی آثار آنتی‌اکسیدانی عصاره از روش حذف رادیکال آزاد ۲,۲-DPPH) diphenyl-1-picrylhydrazyl) و برای بررسی میزان تولید نانوفیبریل‌های آمیولیدی از روش جذب‌سنجی کنگورد استفاده شد. ترکیبات شیمیایی عصاره با روش کروماتوگرافی گازی ارزیابی گردید. از آمار توصیفی و آزمون آماری ANOVA برای تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS vol.23 استفاده شد.

یافته‌های پژوهش: آنالیز فیتوشیمیایی عصاره هفت ترکیب را نشان داد. بیشترین ترکیبات عصاره ۴، ۵ آلفا-پوکسی-۳-متوکسی (۴۲/۵۳ درصد)، ۲-اتیل-پی پیریدین-۱-متیل (۳۱/۰۲ درصد) و تیمول (۲۳/۶۵ درصد) بودند. طیف (UV-Vis) بیشترین جذب را در ۴۶۰ نانومتر نشان داد. نتایج SEM تولید نانوذراتی کروی با اندازه ۹۳-۷۰ نانومتر را تأیید کرد. غلظت‌های ۰/۸ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره توانست DPPH را بیش از ۵۰ درصد مهار کند. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه حاوی ۲ میلی‌لیتر از محلول نانوذره (نمونه ۵)، به میزان ۵۶/۸۲ درصد و بیشترین میزان مهار تولید نانوفیبریل‌های آمیولیدی در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به میزان ۹۵ درصد مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد، نانوذرات سنتز شده خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آمیولیدوزنیک قوی دارند که می‌توان از آن‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آلزایمر، آنتی‌آمیولیدوزنیک، آنتی‌اکسیدان، آویشن کوهی، نانوذره نقره، نانوفیبریل‌های آمیولیدی

استناد: لطفی، ذوالفقار؛ ملکی، فاطمه؛ فرهمند، سمیه. بررسی ویژگی‌های آنتی‌آمیولیدوزنیک و آنتی‌اکسیدانی نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره برگ آویشن کوهی (*Thymus kotschyanus* Boiss). مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، آذر ۱۴۰۲؛ ۳۱(۵): ۱-۱۳.

بیماری آلزایمر یا فراموشی نوعی اختلال عملکردی مغز است. این اختلال در مغز غیرقابل برگشت است و بر عملکرد شناختی مغز مثل حافظه، تصمیم‌گیری، ادراک و رفتار تأثیر دارد. این بیماری توسط تجمع پلاک‌های آمیلوئیدی و کلاف‌های رشته‌ای داخل نورونی ایجاد می‌شود؛ بنابراین، باعث از بین رفتن سیناپس و مرگ نورون می‌گردد و در نتیجه آن، حافظه بیمار از میان می‌رود (۱). چند سال پس از بیماری آلزایمر، زوال عقل در بیمار ایجاد می‌شود که بر فعالیت‌های رفتاری و شناختی آن اثر دارد و در نهایت، باعث مختل شدن اندام‌های حرکتی بدن و مرگ بیمار می‌گردد (۲). تاکنون درمان قطعی برای بیماری آلزایمر به دست نیامده است و درمان‌های فعلی، تنها برای جلوگیری از پیشرفت این بیماری است؛ به همین علت، درمان اثربخش و قطعی برای این بیماری ضروری است (۱).

نانوتکنولوژی دانش استفاده از مواد در ابعاد نانو است و در زمینه‌های مختلفی از جمله پزشکی و... کاربرد دارد (۳). در میان نانوذرات، نانوذره نقره به علت ویژگی‌های منحصر به فرد (خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی بالا) در زمینه پزشکی و درمانی کاربرد فراوانی دارند. در حال حاضر، سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره‌های گیاهی به سبب سادگی، کم‌هزینه بودن و سازگاری با محیط زیست، نسبت به سایر روش‌های بیولوژیکی قابل توجه است (۴).

آویشن یکی از گیاهان تیره نعنائیان است. این گیاه از مهم‌ترین و شناخته‌شده‌ترین گیاهان دارویی در ایران است که به علت داشتن دو ترکیب تیمول و کارواکرول، خواص دارویی و ضدباکتریایی و ضدنفخ دارد. آویشن کوهی *Thymus kotschyanus* Boiss یکی از گونه‌های آویشن است. این گیاه ساختار بوته‌ای، ساقه چوبی-علفی، تقریباً راست، کوتاه‌قد و پرشاخه دارد و زمان گلدهی آن اواخر بهار تا اواسط تابستان است (۵). روغن آویشن خواص نظیر ضد اسپاسم، ضدقارچ، ضد عفونی‌کننده ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و... دارد (۶). در این تحقیق، از عصاره آویشن کوهی به عنوان یک عامل احیاکننده برای بیوسنتز نانوذرات

با توجه به اینکه هنوز درمان قطعی برای بیماری آلزایمر وجود ندارد و درمان‌های فعلی، تنها برای جلوگیری از پیشرفت این بیماری است؛ بنابراین، کشف مواد دارویی با کارایی بیشتر و عوارض کمتر در درمان بیماری آلزایمر اهمیت دارد. از سوی، گیاه آویشن به علت ترکیبات فنلی دارای ویژگی‌های دارویی و درمانی مناسبی است؛ در نتیجه، هدف از این تحقیق تعیین ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آمیلوئیدوژنیک نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آویشن کوهی و استفاده از آن در کاهش بیماری آلزایمر است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به روش تجربی در آزمایشگاه دانشگاه پیام نور استان قم در سال ۱۴۰۱ انجام شده است. با توجه به استفاده نکردن از نمونه انسانی-حیوانی، نیاز به تهیه کد اخلاق نبود. همه مواد شیمیایی استفاده شده با خلوص بالا تهیه گردید. نمک نترات نقره ($AgNO_3$)، هیدروکلریک اسید (HCl) و سدیم هیدروکسید (NaOH) از شرکت مرک (Merck) و سیگما (Sigma) تهیه شد و برای محلول‌سازی و شستشو از آب دوبار تقطیر استفاده گردید.

جمع‌آوری نمونه و تهیه عصاره آبی گیاه: آویشن کوهی با نام علمی *Thymus kotschyanus* Boiss در مرحله گل‌دهی، در اوایل خردادماه، از ارتفاعات زاگرس (استان کرمانشاه)، گیلان‌غرب، دهستان ویزنان، منطقه سرپالک با ارتفاع ۸۱۰ متر از سطح دریا، به طول و عرض جغرافیایی ۴۵ ۴۶ ۵۵ و ۳۴ ۸ ۴۲ جمع‌آوری شد. پس از تهیه کد هر بار بوم به شماره ۱-۲۲۷ از مرکز تحقیقات باریج، مقداری از برگ تازه آن با آب دو بار تقطیر شستشو گردید؛ سپس در دمای اتاق و دور از نور خورشید خشک شد. گیاه خشک شده با هاونگ دستی، پودر و تا زمان استفاده در محیط مناسب نگهداری گردید. پودر آویشن کوهی (۴۰ گرم) در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد. عصاره حاصل از طریق کاغذ صافی و ایتمن صاف و وارد دستگاه روتاری گردید

شناسایی ترکیبات استخراج شده از برگ گیاه: برای شناسایی ترکیبات عصاره، از دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی (Aglient، آمریکا) شامل ردیاب جرمی Agilent HP-5973 با منبع یونیزاسیون الکترونی با انرژی ۷۰ الکترون ولت کوبل شده با دستگاه کروماتوگرافی گازی Agilent HP-6890 دارای ستون cp-sil 8cb-ms با طول ۵۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. برنامه ریزی حرارتی ستون از ۱۰۰ تا ۳۰۰ درجه سانتی گراد با سرعت افزایش دمای پنج درجه سانتی گراد در دقیقه و توقف در این دما به مدت دو دقیقه صورت گرفت. دمای محل تزریق دستگاه کروماتوگرافی گازی و دمای آنالیز روی ۲۳۰ درجه سانتی گراد با گستره جرمی m/z 40-500 تنظیم گردید. گاز حامل هلیوم ۹۹/۹۹ درصد و مقدار تزریق و سرعت جریان گاز یک میلی لیتر در دقیقه تنظیم شد. حجم ۰/۵ ماکرولیت از عطرمایه گیاه به دستگاه GC-MS تزریق گردید. در نهایت، نتایج به دست آمده از دستگاه بر اساس اندیس کوتاهس و مراجعه به فرهنگ طبیعی ترکیبات طبیعی شناسایی شد. تفسیر طیف های GC-MS با استفاده از دیتابیس های National Institute Standard and Technology با بیش از ۶۲۰۰۰ الگو و کتابخانه طیفی جرمی ویلی انجام گردید. نام، ساختار ترکیب و وزن مولکولی مواد جداسازی شده تأیید شد.

بیوسنتز نانوذرات نقره: برای تولید نانوذرات نقره، ۹۰ میلی لیتر از محلول نترات نقره به همراه ۱۰ میلی لیتر از عصاره گیاه آویشن کوهی در داخل ارلن ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد گرم گردید. در این زمان، رنگ محلول از قهوه ای زرد به رنگ قهوه ای تیره تبدیل شد که نشان دهنده تولید نانوذرات نقره بود.

روش های شناسایی و تعیین اندازه نانوذرات نقره: به منظور شناسایی نانوذرات نقره، تغییر رنگ نمونه ها به طور عینی مشاهده گردید. برای اطمینان از تشکیل نانوذره، طیف جذبی آن ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Uv-Vis) مدل shimadzu UV2550 ساخت ژاپن، در طول موج بین ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر بررسی شد. محلول حاوی نانوذرات

ساخته شده با دور 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید؛ سپس محلول رویی دور ریخته شد (۷).

با هدف بررسی شکل و ابعاد نانوذرات سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (روبنده یا نگاره) (SEM) مدل MIRA III ساخت شرکت Tescan کشور چک استفاده گردید؛ همچنین از روش تفرق دینامیک نور ((DLS مدل Nano-flex شرکت سازنده Particle Matrix کشور آلمان برای تعیین اندازه نانوذرات سنتز شده و از طیف سنجی مادون قرمز ((FTIR مدل IR Tracer 100 محصول کمپانی Shimadzu ژاپن برای بررسی پوشش سطحی نانوذرات نقره سنتز شده، اندازه گیری، شناسایی مولکول ها و گروه های عاملی استفاده شد (۸).

نانوذرات نقره سنتز شده خشک و به پودر تبدیل گردید. از نمونه های پودری به همراه ماده مرجع پتاسیم برمید ((KBr قرصی ساخته شد و تحت تابش نور قرار گرفت. برای هر نمونه، طیف عبور نوری اندازه گیری و به صورت یک فایل عددی گزارش گردید. برای ارزیابی با روش DLS، ابتدا با به دست آوردن وزن ماده برای حجم مشخصی از سوسپانسیون، مقداری از ماده با ترازو وزن و درون دیسپرسانت ریخته شد. در پایان مرحله آماده سازی، نمونه درون کووت تزریق و آنالیز انجام گردید. برای عکس برداری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM، مقدار ۲۰ میلی گرم اورانیل استات با یک میلی لیتر الکل ۵۰ درصد مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۸۰۰ rpm سانتریفیوژ و از فیلتر ۰/۲ میکرونی عبور داده شد؛ سپس روی گریدهای پوشیده شده از کربن، میزان ۵ میکرولیتر از نمونه با غلظت نهایی یک میلی گرم بر میلی لیتر به مدت ۴۵ ثانیه قرار داده شد و با محلول اورانیل استات به مدت یک دقیقه شستشو انجام گردید. از گرید آماده پس از خشک شدن در آزمایشگاه، با میکروسکوپ الکترونی روبشی با ولتاژ ۷۵ کیلوولت برای گسیل اشعه الکترونی تصویر برداری شد.

اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی و قابلیت حذف رادیکال DPPH: به منظور اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی هر عصاره از روش DPPH استفاده گردید. این

شاهد است که حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر محلول DPPH میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد به جای محلول نانوذره نقره است و جذب و واکنش نشان دهنده جذب محلول محتوای نمونه نانوذره نقره است.

اندازه‌گیری خصوصیات آنتی‌آمیلوئید و ژنیک: برای تهیه غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلومین، ۲۰ میلی‌گرم پودر آلومین سرم گاوی (BSA) به همراه یک میلی‌لیتر بافر سیترات فسفات (pH=۳) در میکروتیوب مخلوط شد (رشته‌های آمیلوئیدی در این pH بیشترین تولید را دارند) (۱۱)؛ سپس در ۶ میکروتیوب دیگر به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول ریخته و ۳۰۰ میکرولیتر بافر سیترات - فسفات اضافه گردید (۱۱). میکروتیوب‌ها با شماره ۱ تا ۶ شماره‌گذاری شد و مطابق جدول شماره ۱ سوسپانسیون تهیه گردید (۱۲). میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی در هر میکروتیوب با استفاده از روش طیف‌سنجی کنگورد اندازه‌گیری شد. برای انجام طیف‌سنجی کنگورد ۶ میکروتیوب انتخاب و در هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های آمیلوئیدی ریخته و ۱۹۰۰ میکرولیتر بافر کنگورد به آن‌ها افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد؛ سپس میزان جذب توسط اسپکتروفتومتر در محدوده بین ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر به همراه بافر سیترات فسفات به‌عنوان بلانک اندازه‌گیری و ثبت گردید (۱۳).

جدول شماره ۱. تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره در فرایند تولید نمونه‌های آمیلوئیدی

شماره میکروتیوب	استوک ۲۵ میلی-گرم بر میلی‌لیتر از BSA (میکرولیتر)	بافر سیترات-فسفات pH=3 (میکرولیتر)	نمونه نانوذره (میکرولیتر)	بافر سیترات-فسفات pH=3 (میکرولیتر)	غلظت BSA در محلول (میلی-گرم بر میلی-لیتر)	ضریب رقت نمونه
۱	۱۰۰	۳۰۰	-	۳۰۰	۵	۰
۲	۱۰۰	۳۰۰	۲۰	۳۰۰	۵	۰/۰۴
۳	۱۰۰	۳۰۰	۴۰	۳۰۰	۵	۰/۰۸
۴	۱۰۰	۳۰۰	۶۰	۳۰۰	۵	۰/۱۲
۵	۱۰۰	۳۰۰	۸۰	۳۰۰	۵	۰/۱۶
۶	۱۰۰	۳۰۰	۱۰۰	۳۰۰	۵	۰/۲

آزمایش با کمی تغییرات در روش جانسون و همکاران صورت گرفت (۹). ۱۰۰ میکرولیتر محلول نانوذره نقره تولید شده از عصاره گیاه آویشن یا استاندارد با ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار تهیه شده در اتانول ۹۵ درصد مخلوط شد. محلول به‌وجود آمده در تاریکی و دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۳۱ دقیقه قرار گرفت؛ سپس جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. از اتانول به‌عنوان کنترل منفی و از ترکیب آنتی‌اکسیدانی آسکوربیک اسید نیز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. برای تعیین مقدار IC50 (غلظتی از ماده که سبب مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد می‌شود) برای نانوذرات نقره تولید شده از عصاره گیاه آویشن کوهی و ترکیب استاندارد، آزمایش در پنج غلظت ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از محلول نانوذره مدنظر و استاندارد آسکوربیک اسید انجام شد. آزمایش در سه تکرار انجام گردید و مقادیر میانگین، ملاک محاسبات قرار گرفت (۱۰). از محلول بلانک برای صفر کردن دستگاه استفاده شد. درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی} = 100 \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{sampe}}}{A_{\text{Control}}}$$

در این رابطه، جذب کنترل نشان دهنده جذب محلول

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: تحلیل آماری داده‌ها، انحراف معیار و انحراف از میانگین داده‌ها با نرم‌افزار SPSS vol.23 محاسبه شد. برای بررسی تفاوت معنی‌داری میان داده‌های به دست آمده، از آزمون آماری ANOVA ($P \leq 0.01$) استفاده گردید. نتایج آزمایشگاهی به صورت مقدار میانگین \pm انحراف معیار برای سه آزمایش مستقل نشان داده شد. آزمون Duncan برای مقایسه صورت گرفت.

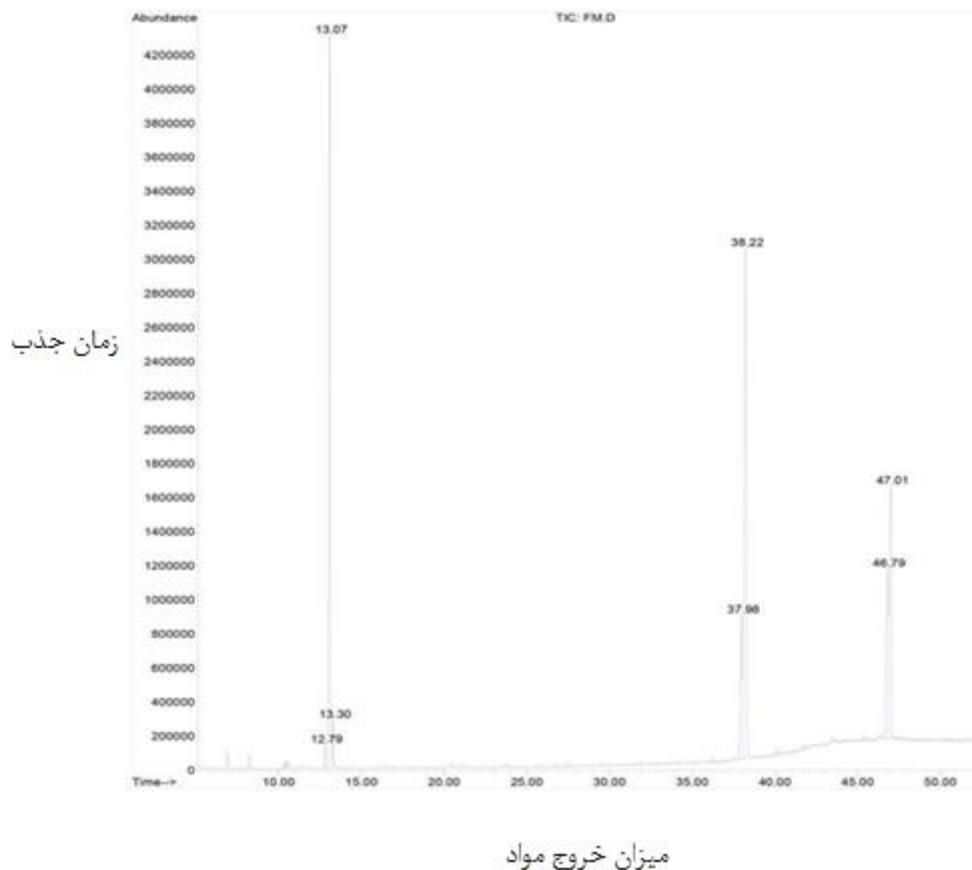
یافته های پژوهش

بررسی ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره گیاه آویشن کوهی به روش GC-MS: ترکیبات تشکیل دهنده

موجود در عصاره آویشن کوهی، زمان شناسایی و درصد هریک از اجزای تشکیل دهنده آن با روش کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی در جدول شماره ۲ نشان داده شده است؛ همچنین بیشترین میزان از کل ترکیبات عصاره را ۴، ۵ آلفا-اپوکسی-۳-متوکسی-۱۷-متیل-۷-آلفا با ۴۳/۵۳ درصد حضور (در زمان‌های ۳۷/۹۸ و ۳۸/۲۲ دقیقه)، ۳- (۲- اتیل-پی پریدین-۱-متیل)-۸-آ-متیل-۵-متیل با ۳۱/۰۲ درصد حضور (در زمان‌های ۴۶/۷۹ و ۴۷/۰۱ دقیقه) و تیمول با ۲۳/۶۵ درصد حضور به خود اختصاص دادند. در کل ۹۹/۹۹ درصد از مواد مؤثر گیاه با استفاده از کروماتوگرافی گازی جدا و شناسایی شد (شکل شماره ۱؛ جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲. ترکیبات تشکیل دهنده عصاره گیاه آویشن کوهی

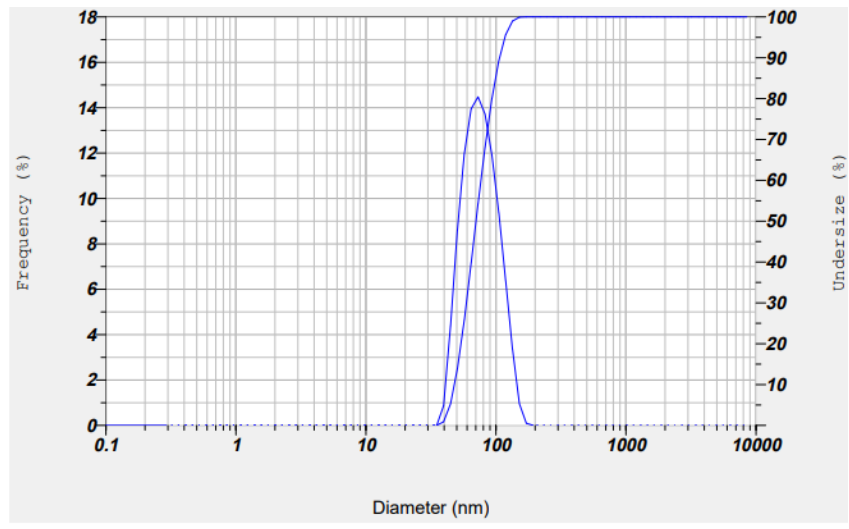
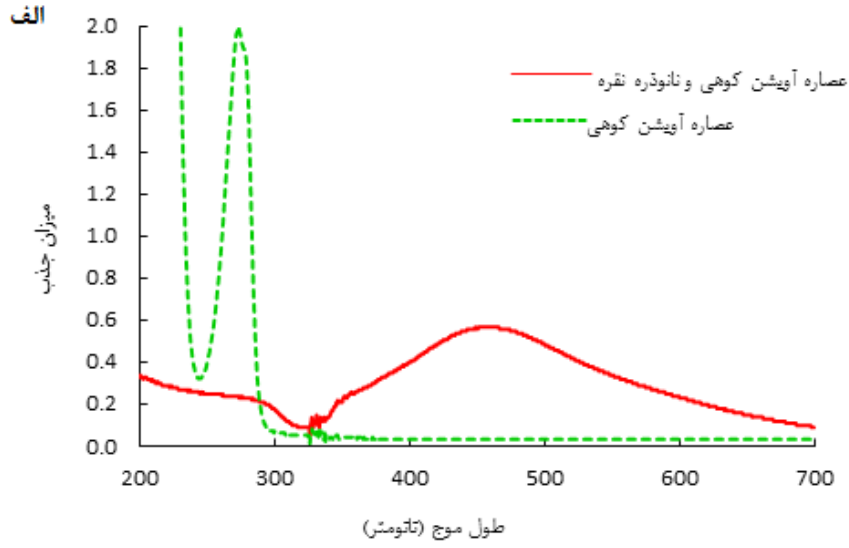
پیک	ترکیبات شیمیایی	زمان شناسایی	احتمال حضور (درصد)	در صد حضور
۱	تیمول ۲- (۱- متیل اتیل)- ۵- متیل - فنول	۱۲/۷۹	۹۵	۰/۶۲
۲	تیمول	۱۳/۰۷	۹۵	۲۳/۶۵
۳	فنول، ۲- متیل- ۵- (۱- متیل اتیل)	۱۳/۳۰	۹۵	۱/۱۷
۴	۴، ۵ آلفا- اپوکسی- ۳- متوکسی- ۱۷- متیل- ۷- آلفا	۳۷/۹۸	۷۸	۹/۴۸
۵	۴، ۵ آلفا- اپوکسی- ۳- متوکسی- ۱۷- متیل- ۷- آلفا	۳۸/۲۲	۷۸	۳۴/۰۵
۶	۳- (۲- اتیل- پی پریدین- ۱- متیل)- ۸- آ- متیل- ۵- متیل	۴۶/۷۹	۲۸	۱۰/۸۰
۷	۳- (۲- اتیل- پی پریدین- ۱- متیل)- ۸- آ- متیل- ۵- متیل	۴۷/۰۱	۲۸	۲۰/۲۲



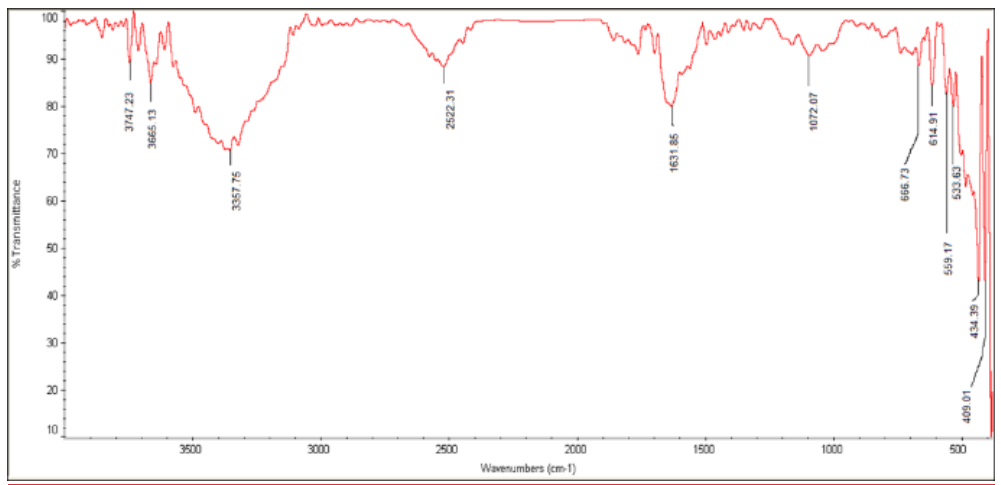
شکل شماره ۱. کروماتوگرام گازی حاصل از بررسی ترکیبات موجود در عصاره آویشن کوهی توسط GC-MS

کوهی و نیترات نقره را نشان می‌دهد. پیک‌های با اندازه‌های متفاوت در طول موج‌های مختلف بیان‌کننده تعامل و گروه‌های عاملی مؤثر در تشکیل نانوذرات نقره است. این پیک‌ها در ۱۳/۳۶۶۵، ۳۳۵۷/۷۵، ۲۵۲۲/۳۱، ۱۶۳۱/۸۵، ۱۰۷۲/۰۷، ۶۶۶/۷۳ به ترتیب مربوط به گروه‌های OH، NH، آلیفاتیک، C-H، C-N، C-O، C=C، C=O و ارتعاشات خمشی خارج صفحه است. این گروه‌های عاملی باعث احیای یون‌های نقره و تثبیت و تشکیل نانوذرات نقره می‌شوند (شکل شماره ۲. ب). نتیجه توزیع اندازه نانوذرات سنتز شده با مقادیر متفاوت عصاره گیاه آویشن کوهی در پایان واکنش برحسب درصد پراکندگی، در شکل شماره ۲ (ج) ارائه شده است. پیک این نمودار بیان می‌کند که میانگین اندازه نانوذرات نقره تولید شده از عصاره آویشن برابر با ۷۴/۲ نانومتر است.

نتایج حاصل از بررسی نانوذرات نقره با روش UV-Vis، FTIR و DLS: در سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آویشن کوهی، گیاه به عنوان عامل احیاکننده عمل می‌کند. در نتیجه احیای یون‌های نقره و ایجاد نانوذرات، رنگ نمونه‌ها از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای تیره تغییر کرد. این تغییر رنگ پس از حرارت دیدن در دمای ۸۰ درجه، نشانگر سنتز نانوذرات نقره است. نتایج طیف‌سنجی ماوراء بنفش-مرئی عصاره گیاه آویشن کوهی پیش و پس از سنتز نانوذرات نقره در شکل شماره ۲ (الف) آورده شده است. پیک جذب حداکثری در منحنی به دست آمده از عصاره آویشن کوهی پس از سنتز نانوذرات نقره در طول موج ۴۶۰ نانومتر مشاهده گردید که بیان‌کننده سنتز نانوذرات نقره است. یافته‌های به دست آمده از این روش تعامل میان عصاره برگ آویشن



(ب)

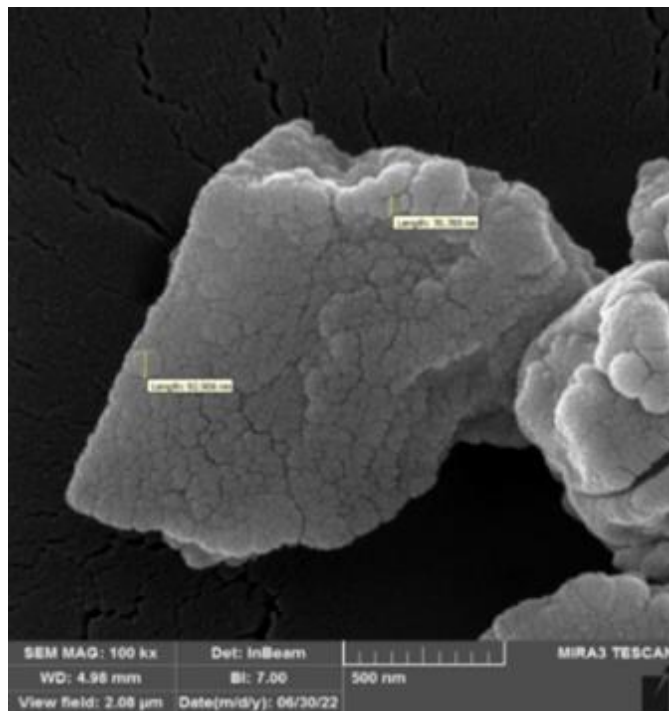


(ج)

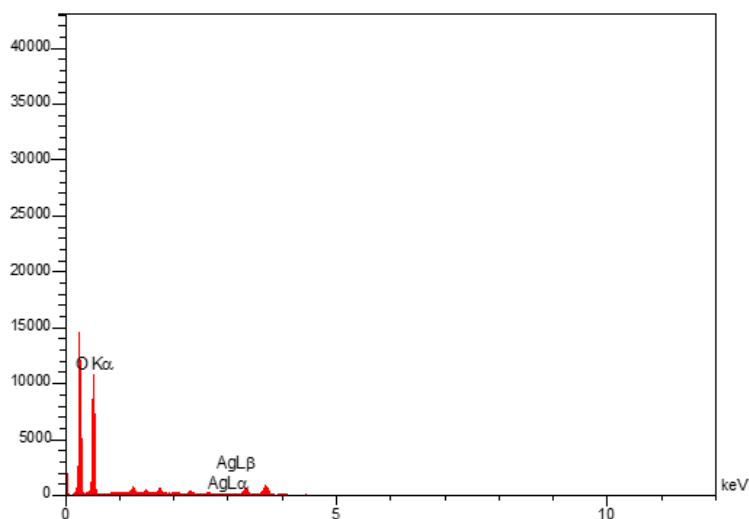
شکل شماره ۲. الف. طیف اسپکتروفتومتر UV-Vis نانوذرات نقره بیوسنتز شده؛ ب. طیف FTIR نانوذره نقره بیوسنتز شده؛ ج. بررسی اندازه نانوذره به روش DLS

توجه به حضور عصاره گیاهی نقره بودن نانوذرات به درستی تأیید می‌شود (شکل شماره ۳. ب). همان‌گونه که نمودار اسپکتروفتومتری محلول کلئیدی نانوذرات نشان می‌دهد، سنتز و توزیع آن‌ها مناسب است و با نتایج همخوانی لازم را دارد؛ بنابراین، عمل سنتز با موفقیت منجر به تولید نانوذرات شده است.

نتایج سنجش میکروسکوپ الکترونی روشی (SEM): تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM بیان‌کننده توزیع مناسب نانوذرات در بستر عصاره گیاهی موجود است. بر اساس این تصاویر، نانوذرات نقره با اندازه مناسب و در محدوده کمتر از ۱۰۰ نانومتر تشکیل شدند که عمدتاً کروی شکل و با اندازه ۷۰ تا ۹۳ نانومتر بودند (شکل شماره ۳. الف). نمودار Edx.SEM توضیح‌دهنده جنس نانوذرات است که با



(الف)



(ب)

شکل شماره ۳. الف. تصویر SEM؛ ب. طیف حاصل از آنالیز نمونه با روش طیف‌سنجی پراکندگی انرژی پرتو ایکس (EDX) در این نمودار نانوذره نقره مشهود است

آنتی‌اکسیدانی نانوذره افزایش می‌یابد و بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده می‌شود.

نتایج سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی: روند افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره، اثر

جدول شماره ۳. درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) در غلظت‌های مختلف عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). حروف a تا e اختلاف میان درصد تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی را نشان می‌دهد.

درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی	غلظت عصاره در محلول (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
۴۲/۰۴±۱/۶۷ ^a	۰/۲
۴۹/۰۵±۱/۵۱ ^b	۰/۴
۵۳/۴۱±۰/۶۹ ^c	۰/۶
۵۶/۰۸±۰/۶۵ ^d	۰/۸
۵۶/۸۲±۰/۲۷ ^d	۱
۹۱/۰۸ ^e	کنترل مثبت

گیاه آویشن کوهی، حدود ۹۶ درصد از ایجاد رشته‌های آمیلوئیدی خودداری شد (جدول شماره ۴). این نکته بیان‌کننده کاهش تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی در حضور نانوذرات نقره است.

نتایج سنجش فعالیت آنتی‌آمیلوئیدوزنیک: پس از خوانش جذب کنگورد در طول موج‌های ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر، نتایج نشان داد که بیشترین جذب برای هر ضریب رقت در ناحیه ۴۸۰ تا ۵۴۰ است، به‌گونه‌ای که در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره

جدول شماره ۴. درصد تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی در غلظت‌های مختلف عصاره (حروف a تا f اختلاف میان درصد تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی را نشان می‌دهد).

درصد تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی	غلظت عصاره در محلول (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
۱۰۰ ^a	۰
۷۹±۲ ^b	۰/۰۴
۵۵±۲/۵۱ ^c	۰/۰۸
۳۵±۱/۵۳ ^d	۰/۱۲
۲۲±۲/۵۱ ^e	۰/۱۶
۴±۱ ^f	۰/۲

آن‌ها ایجاد می‌کند و به علت نسبت سطح به حجم بالای نانوذرات، واکنش‌پذیری بالایی دارند. روش‌های بیولوژیکی برای تولید نانوذرات معمولاً با استفاده از گیاهان یا عصاره‌های گیاهی، آنزیم‌ها و میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها انجام می‌گیرد و جایگزینی مناسب برای روش‌های

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه با استفاده از فناوری نانو توانسته‌اند فلز نقره را به نانوذرات نقره با اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر تبدیل کنند. اندازه نانوذرات خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی در

نانوذره تولید شده با گیاه روناس توانایی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS را دارد (۳). نتیجه مطالعه قندهاری و همکاران با مطالعه حاضر همسو است.

بررسی‌های حاصل از این تحقیق بر روی ترکیبات شیمیایی عصاره آویشن کوهی با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی نشان داد که ترکیبات ۵۴-آلفا پوکسی ۳-متوکسی (۴۳/۵۳ درصد)، ۳- (۲- اتیل پی پریدین -۱- متیل) - ۸ آ- متیل - ۵- متیل (۳۱/۰۲ درصد حضور) و تیمول (۲۳/۶۵ درصد)، به ترتیب بیشترین میزان از کل ترکیبات عصاره را شامل می‌شوند (جدول شماره ۲). بررسی‌ها نشان داده است که بیشتر گیاهان از جمله آویشن، به علت داشتن ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند. در پژوهش محمدی غلامی و همکاران نشان داده شد که بیشترین ترکیبات شیمیایی عطرمایه آویشن کارواکرول، تیمول و گاماترپین است و قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره مربوط به وجود ترکیبات فنلی است (۵). نتیجه این پژوهش با مطالعه حاضر مطابقت دارد.

از تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM برای ارزیابی اندازه و شکل نانوذرات استفاده شد و نشان می‌دهد که نانوذرات تولید شده کروی هستند و اندازه آن‌ها بین ۷۰ تا ۹۳ نانومتر است. در مطالعه کاویانی و همکاران، توزیع اندازه نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره گیاه دارویی درمنه (*Artemisia sieberi*) با سنجش DLS مشخص شد و نشان داد که میانگین اندازه نانوذرات نقره ۷۰ نانومتر و پراکندگی نانوذرات نقره در گستره ۴۰ تا ۱۴۰ نانومتر است؛ بنابراین، نتایج توزیع اندازه نانوذرات در این مطالعه مشابه با نتایج مطالعه حاضر است (۱۵). البته باید توجه داشت که تغییرات دما، pH، مدت زمان و غلظت‌های مختلف برهم کنش محلول نمکی و عصاره گیاهی می‌تواند روی اندازه نانوذرات تأثیر بگذارد.

در این تحقیق از آلبومین سرم گاوی به عنوان یک پروتئین مدل، تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی و عوامل مؤثر بر تشکیل آن استفاده شد. بر اساس مطالعات محمودی و همکاران ثابت گردید که نانوذرات در غلظت پایین، به

شیمیایی و فیزیکی است. در روش سنتز سبز، از هیچ ماده شیمیایی مضر استفاده نمی‌شود و تولید نانومواد با استفاده از بسترهای گیاهی سازگار با محیط‌زیست صورت می‌گیرد (۸). متابولیت‌های ثانویه در عصاره گیاهان به عنوان عامل پایدارکننده و کاهنده عمل می‌کنند. از مزیت‌های دیگر استفاده از گیاهان، تولید نانوذراتی با اندازه مناسب و شکل‌های متفاوت، کامل و کوتاه بودن زمان واکنش است (۴). به این علت، در این تحقیق روش سنتز سبز نانوذره نقره با عصاره گیاه آویشن کوهی و آثار آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آمیلوئیدوزنیک آن بررسی شد.

از میان خواص نانوذرات فلزی، خاصیت نوری آن بیشتر مورد توجه است که با تغییر در شکل و اندازه نانوذرات تغییر می‌کند. خواص نوری نانوذرات فلزی به سبب پدیده‌ای به نام تشدید پلاسمونیک سطحی است. طیف UV-visible گرفته شده از نانوذرات نقره نشان می‌دهد که بیشترین ارتعاشات پلاسمون سطحی در طول موج ۴۶۰ نانومتر است. در مطالعه‌ای که اختیاری و همکاران انجام دادند، طیف UV-visible برای نانوذرات نقره پیکی را در طول موج ۴۷۰ نانومتر نشان داد که بیان‌کننده حضور نانوذرات است (۴). نتایج پژوهش حاضر با مطالعه اختیاری و همکاران مطابقت دارد.

آمیلوئیدوز نوعی بیماری است که در آن پروتئین‌های آمیلوئیدی در بافت‌ها و اندام‌های بدن انباشته می‌شوند و عملکرد آن اندام را مختل می‌کنند (۱۴). نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره گیاه آویشن آثار آنتی‌اکسیدانی مناسبی دارد و از این نظر، با پژوهش‌هایی که پیش‌تر در این زمینه انجام شده است، همسو است. در این تحقیق، خصوصیات آنتی‌اکسیدانی نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از گیاه آویشن کوهی با استفاده از مهار رادیکال DPPH بررسی شد و نتایج نشان داد که میزان مهار رادیکال آزاد DPPH با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد.

در پژوهش قندهاری و همکاران که روی میزان مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS با استفاده از نانوذرات نقره سنتز شده از گیاه روناس انجام شد، مشخص گردید که میزان مهار رادیکال‌های آزاد به غلظت نانوذرات بستگی دارد و

جایگاه‌های مخصوص در هسته‌های اولیه پروتئین می‌چسبند و مانع از اتصال هسته‌ها به همدیگر می‌شوند و با این روش، فیبریلایسیون را مهار می‌کنند. آنان نشان دادند که اضافه کردن نانوذرات در زمان شروع تشکیل فیبر ممکن است روند فیبریلایسیون را معکوس و یا فیبرها را نابود کند (۱۲). اضافه کردن نانوذرات در غلظت‌های پایین باعث افزایش در فاز تأخیر و کاهش در مرحله طویل شدن می‌شود. برهم کنش قوی میان پپتیدها و نانوذرات توسط جذب نانوذرات به هسته‌ها در جایگاه‌های ویژه روی آن‌ها، مانع پیوستن هسته‌ها به همدیگر می‌گردد؛ در نتیجه، پدیده فیبریلایسیون کاهش می‌یابد؛ به‌عنوان مثال، کابالیرئو-لاگو و همکاران شرح دادند که تعامل میان نانوذرات و پروتئین می‌تواند با مسدود کردن جایگاه‌های اتصال هسته‌ها، باعث تشکیل فیبریل-شود و نیز کاهش غلظت پروتئین مستعد به تجمع در محیط سبب کاهش فیبریلایسیون گردد؛ همچنین این دانشمندان و دیگران اظهار کردند که اتصال نانوذرات به موتیف‌های آب‌گریز (فوق ساختار دوم آب‌گریز) یک پپتید، باعث مهار تشکیل تجمع پروتئین می‌شود (۱۶).

فرضیه آبخاری آمیلوئید بتا بیان می‌کند که تشکیل پروتئین آمیلوئید بتا آغازگر اولیه بیماری آلزایمر است و تجمع آن عامل اصلی بیماری است. درمانی که تولید آمیلوئید بتا را کاهش دهد، باعث بهبود علائم بیماری آلزایمر می‌گردد؛ بنابراین، اگر ترکیبی از تولید نانورشته‌های آمیلوئیدی جلوگیری کند، می‌تواند عوارض ناشی از آن را کاهش دهد و باعث بهبود بیماری آلزایمر شود. در این مطالعه، با بررسی نتایج به‌دست آمده از سنجش کنگورد تشخیص داده شد که عصاره آویشن کوهی می‌تواند تشکیل پروتئین آمیلوئید بتا را کاهش دهد. نتایج ما نشان داد که عصاره در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، بیشترین میزان مهار

رشته‌های آمیلوئید را در حدود ۹۶ درصد دارد. این موضوع آثار مهارتی ترکیبات موجود در عصاره بر تولید رشته‌های آمیلوئیدی را تأیید می‌کند (جدول شماره ۴). بر اساس نتایج تحقیقات راجا و همکاران در سال ۲۰۲۰، این آثار کاهش می‌تواند به علت وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره باشد (۱۷).

تحلیل نتایج به‌دست آمده از پژوهش نشان داد که تغییرات دما، pH، مدت زمان و غلظت‌های مختلف برهم کنش محلول نمکی و عصاره گیاهی می‌تواند بر اندازه نانوذرات و سمیت آن تأثیر بگذارد. در این تحقیق، از عصاره آویشن کوهی به‌عنوان یک عامل احیاکننده برای بیوسنتز نانوذرات استفاده شد. این نانوذرات سنتز شده از عصاره آویشن کوهی علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی مناسب، اثر آنتی‌آمیلوئید و ژنیک فوق‌العاده‌ای دارند. با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی نانوذرات نقره تولید شده از عصاره گیاه آویشن کوهی و توان مهارکنندگی فراوان این عصاره در تشکیل نانورشته‌های آمیلوئیدی، احتمالاً این نانوذرات می‌توانند برای جلوگیری از تجمع رشته‌های آمیلوئیدی در مغز و جلوگیری یا حتی درمان احتمالی بیماری آلزایمر استفاده گردند. پیشنهاد می‌شود که در کنار سنجش‌های عصاره و تأثیر آن، آزمایش‌های سلولی و مولکولی روی حیوانات آزمایشگاهی انجام گردد تا گیاه از نظر عوارض جانبی نیز ارزیابی شود.

سپاس‌گزاری

نویسندگان این مقاله از دانشگاه پیام نور استان قم برای در اختیار قرار دادن امکانات و دستگاه‌های مختلف آزمایشگاه قدردانی و تشکر می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی وجود ندارد.

References

1. Khaledi Sh, Ahmadi Sh. Disease s' Alzheimer in Pathology to Physiology from: Tau and Beta Amyloid. Shefaye Khatam 2016; 4:67-88. (Persian). doi: 10.18869/acadpub.shefa.4.4.67.
2. Soltani MR. The most important factors of dementia or Alzheimer's disease. National

Conference of Physical Education 2019; (Persian).

3. Ghandehari S, Homayounitabrizi M, Ardalan P. Investigating the antioxidant and toxicity effects of green synthesized silver nanoparticles by aqueous extract of Ronas plant on liver cancer cells (HepG2) compared to normal skin fibroblast (HDF) cells. JIUMS 2018; 26:57-67. (Persian). doi: 10.29252/sjimu.26.2.57.

4. Ekhtiari-yengejeh S, Ezzatzadeh E. Rapid and eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using *Thymus trautvertteri* leaf extract and evaluation of their antimicrobial activity. *JARC* 2017; 11:51-59. (Persian).
5. Mohammadigholami A. Study of antifungal properties and chemical composition of essential oil of *Thymus kotsucyanus* Boiss. *Iran J Plant Physiol* 2016; 1:52-62. (Persian).
6. Kaeidi A, Rahmani MR, Hassanshahi J. The Protective Effect of Carvacrol and Thymol as Main Polyphenolic Compounds of Thyme on Some Biologic Systems in Disease Condition: A Narrative Review. *JRUMS* 2020; 19:81-96. doi: 10.29252/jrums.19.1.81.
7. Mansouri H, Arasteh A, Khavari-Nejad RA. Phytochemical evaluation and antioxidant and inhibitory effects of *Citrullus colocynthis* L. extract on the production of amyloid nano-biofibrils from bovine serum albumin as a model protein. *EJMP* 2021; 8:34-48. (Persian). doi:20.1001.1.23223235.1399.8.4.3.9.
8. Haji Rustamlo B, Zhiani R, Omrani S. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Salvia officinalis* Extract and Evaluation of their Antioxidant and Antimicrobial Activity Against Bacteria of Food Corruption. *JIFST* 2018; 11:107-18. doi:10.30495/jfst.2019.543963 (Persian).
9. Johnson I, Prabu HJ. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles by leaf extracts of *Cycas circinalis*, *Ficus amplissima*, *Commelina benghalensis* and *Lippia nodiflora*. *Int Nano Lett* 2015; 5:43-51. doi:10.1007/s40089-014-0136-1.
10. Dousti B, Nabipour F, Hajiamraei A. Green synthesis of silver nanoparticle by using the aqueous extract of *Fumaria Parviflora* and investigation of their antibacterial and antioxidant activities. *RJMS* 2019; 26:105-17. (Persian). doi: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.11.1.
11. Kalhor HR, Ashrafian H. Identification of an aspidospermine derivative from borage extract as an anti-amyloid compound: A possible link between protein aggregation and antimalarial drugs. *J Phytochem* 2017; 140:134-40. (Persian). doi: 10.1016/j.phytochem.2017.05.001.
12. Mahmoudi M, Quinlan-Pluck F, Monopoli MP, Sheibani S, Vali H, Dawson KA, et al. Influence of the physiochemical properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on amyloid β protein fibrillation in solution. *ACS Chem Neurosci* 2013; 4:475-85. doi: 10.1021/cn300196n.
13. Cabaleiro-Lago C, Lynch I, Dawson KA, Linse S. Inhibition of IAPP and IAPP (20–29) fibrillation by polymeric nanoparticles. *Langmuir* 2010; 26:3453-61. doi.org/10.1021/la902980d.
14. Baker KR, Rice L. The amyloidoses: clinical features, diagnosis and treatment. *Methodist Debakey Cardiovasc J* 2012; 8:3-7. doi: 10.14797/mdcj-8-3-3.
15. Kaviani N, Asfour M. Biological Preparation of Silver Nanoparticles Using *Artemisia sieberi*. *JMBS* 2018; 9:23-27. (Persian).
16. Cabaleiro-Lago C, Szczepankiewicz O, Linse S. The effect of nanoparticles on amyloid aggregation depends on the protein stability and intrinsic aggregation rate. *Langmuir* 2012; 28:1852-57. doi.org/10.1021/la203078w.
17. Raja A, Ahmadi S, de Costa F, Li N, Kerman K. Attenuation of oxidative stress by cannabinoids and cannabis extracts in differentiated neuronal cells. *Pharmaceuticals* 2020; 13:328. doi: 10.3390/ph13110328.