

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

Fatemeh Sharifi¹ , Neda Mohamadi^{2*} , Sara Soltanian^{3*} , Mohsen Doostmohammadi⁴ 

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

ABSTRACT

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 16.17 µg/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.



سنتر نانوذرات نقره با استفاده از عصاره متانولی گیاه زیره سیاه و ارزیابی میزان سمیت، فعالیت ضد لیشمانیا و ضد میکروبی 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، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

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

چکیده

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، دانشکده علوم

پایه، دانشگاه شهید باهنر کرمان،

کرمان، ایران.

Email:

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

واژه‌های کلیدی: آثار ضد لیشمانیا، زیره سیاه، سنتر سبز، سمیت سلولی، فعالیت ضدباکتریایی، نانوذره نقره

استناد: شریفی، فاطمه؛ محمدی، ندا؛ سلطانیان، سارا؛ دوست محمدی، محسن. سنتر نانوذرات نقره با استفاده از عصاره متانولی گیاه زیره سیاه و ارزیابی

میزان سمیت، فعالیت ضد لیشمانیا و ضد میکروبی آن. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، بهمن ۱۴۰۱؛ ۳۰(۶): ۲۰-۹.

مقدمه: ویژگی‌های منحصر به فرد نانوذرات نقره که به وسیله عصاره‌های گیاهی تولید می‌شود، به استفاده چشمگیر آن‌ها در کاربردهای پزشکی و صنعتی منجر شده است. گیاه *Bunium Persicum* از خانواده *Apiaceae*، بومی ایران، افغانستان، پاکستان و برخی از کشورهای آسیای شرقی است که نام محلی آن در ایران، زیره سیاه است. در این مطالعه، برای اولین بار از عصاره متانولی زیره سیاه به عنوان عامل احیاکننده و پایدارکننده برای سنتر نانوذرات نقره استفاده شد و سپس ویژگی‌های ساختاری و خصوصیات بیولوژی آن بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: نانوذرات نقره به وسیله عصاره زیره سیاه سنتر شد. طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش برای بررسی حضور نانوذرات صورت گرفت و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، مورفولوژی سطحی، شکل و اندازه 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 سنتر شده انجام شد.

یافته‌ها: طول موج ۴۵۰-۴۰۰ نانومتر در طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش بر تشکیل نانوذرات نقره گواهی می‌دهد. میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان‌دهنده شکل کروی و قطر بین ۷۰-۲۰ نانومتر هستند. مقدار IC_{50} بر رده سلول انسانی گلیوبلاستوما A-172 و سرطان سینه MCF-7 طی ۴۸ ساعت، به ترتیب ۷/۶ و ۷/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. نانوذره نقره فعالیت ضدباکتریایی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد. مطالعه حاضر فعالیت ضد لیشمانیایی مناسبی را علیه مراحل پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا ماژور تأیید کرد. مقادیر IC_{50} نانوذره و گلوکانتیم به ترتیب 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 زیره سیاه توانایی احیای یون‌های نقره به نانوذرات نقره را دارد و سمیت و فعالیت ضدباکتریایی و ضد لیشمانیایی مناسبی نشان می‌دهد.

انتشار میدانی (Emission Scanning Electron Field Microscope, FESEM)، طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه (Fourier transform infrared) FTIR بود؛ سپس میزان سمیت آن روی رده سلول‌های سرطانی، میزان خاصیت ضدباکتریایی و آثار ضدلشمانیایی آن با استفاده از روش‌های مختلف بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و عصاره‌گیری گیاه: گیاه زیره سیاه از ارتفاعات جویبار استان کرمان، در ژوئیه سال ۲۰۱۹ جمع‌آوری شد و یک گیاه‌شناس آن را شناسایی کرد. یک نمونه به مرکز هرباریوم در بخش فارماکونوزی، 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. عصاره تغلیظ‌شده در آون خلأ (Vacucell, Einrich-tungen GmbH)، در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس تا زمان آزمایش، در فریزر دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

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

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

نانوذرات نقره به علت کاربرد وسیعی که در صنعت داروسازی و پزشکی دارد و همچنین به‌سبب ویژگی‌های زیستی از جمله خواص ضدسرطانی، ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی و ضدالتهایبی، توجه بسیاری را به خود جلب کرده است (۱، ۲). در بسیاری از تحقیقات از ترکیبات طبیعی میکروارگانسیم‌ها و به‌ویژه گیاهان برای سنتز نانوذرات استفاده می‌شود (۳، ۴). در این روش، گروه‌های عملکردی متابولیت‌های گیاهی مانند فنول‌ها، آلکالوئیدها و ترپن‌ها به‌عنوان عوامل پایدارکننده و احیاکننده در سنتز نانوذرات عمل می‌کنند و بنابراین، روشی مقرون‌به‌صرفه، با بازدهی بالا و غیرسمی است (۵).

زیره سیاه گیاه چندساله و خودگشن از خانواده چتریان (Apiaceae) است که با نام علمی Boiss Bunium Persicum معروف است. این گیاه یکی از مهم‌ترین و ارزشمندترین گیاهان دارویی است که به‌طور وحشی در مناطقی از ایران که آب‌وهوای خشک دارند، مانند استان‌های کرمان، فارس، اصفهان و یزد می‌رویند (۶، ۷). دانه زیره سیاه در طب سنتی به‌عنوان ضدنفخ، ضدتشنج، ضدصرع، ضداسهال، تب‌بر، کاهنده چربی و کلسترول خون، ضدآلرژی، تقویت‌کننده معده، ادرارآور و برطرف‌کننده سوءهاضمه به‌کار می‌رود (۱۲، ۱۳). دانه زیره سیاه غنی از عطرمایه گیاهی است و از دیرباز، به‌عنوان چاشنی و طعم‌دهنده در انواع غذا مانند نوشابه، شکلات و پنیر استفاده شده است. تولید عطرمایه در زیره سیاه بیش از ۳ برابر زیره سبز است. زیره سیاه حاوی ترکیبات فراوانی از جمله ترپن‌ها، فنل‌ها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها است که کاربردهای بسیاری در صنایع دارویی و غذایی دارد و همچنین خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدان مناسبی در آن دیده شده است (۸-۱۱).

هدف اولیه این مطالعه سنتر نانوذرات نقره با استفاده از عصاره متانولی زیره سیاه و تعیین ویژگی‌های نانوذره سنتز شده با استفاده از طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش (UV-Vis spectroscopy, Uv-Vi)، میکروسکوپ الکترونی روبشی

توزیع نمونه‌های سنتز شده از میکروسکوپ FESEM استفاده گردید.

کشت سلول و تعیین میزان سمیت: در این مطالعه، دو رده سلولی گلیوبلاستوما انسان (A-172) و سرطان سینه 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 آنتی بیوتیک کشت داده شدند و در انکوباتور دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و فشار ۵ درصد CO₂ نگهداری گردیدند. میزان زنده ماندن سلول پس از قرارگیری در معرض غلظت های مختلف نانوذره نقره توسط روش رنگ سنجی MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide تعیین شد. به منظور پاساژ سلولی، ابتدا سلول ها به مدت ۳-۵ دقیقه در معرض آنزیم تریپسین قرار گرفتند و پس از تک سلولی 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 میلی لیتر در آب مقطر استریل و سپس با استفاده از محیط کشت، غلظت های مختلف ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر 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 میلی گرم در میلی لیتر به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه اضافه گردید و ظرف حاوی سلول ها به مدت ۳ ساعت انکوبه شد؛ سپس محتوای چاهک ها به دقت خارج گردید و بلورهای فورمازان نامحلول بنفش با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide, DMSO) حل و در نهایت، جذب نوری به وسیله دستگاه قرائت گر الیزا (BioTek- ELx800) در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه درصد زنده ماندن سلول ها، میانگین جذب پس تیمار با غلظت های مختلف نانوذره

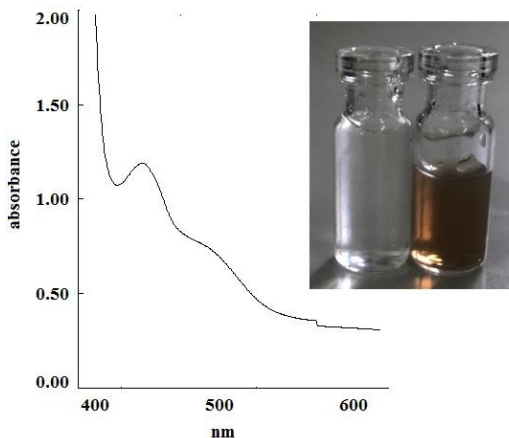
نقره بر میانگین جذب سلول های کنترل تقسیم و عدد به دست آمده در ۱۰۰ ضرب گردید. نتایج به دست آمده برای هر رده سلولی استفاده شد تا غلظت مورد نیاز برای مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد (IC₅₀)، توسط برنامه probit در نرم افزار SPSS vol.18 محاسبه گردد.

فعالیت ضدباکتریایی نانوذره سنتز شده: بررسی آثار ضدباکتریایی نانوذره نقره سنتز شده علیه باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylo-coccus aureus*, ATCC 6538)، باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*, ATCC 6051) و اشرشیاکلاهی (*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 هیتون آگار ریخته و با سواپ استریل در سه جهت به صورت انبوه کشت داده شد؛ سپس در سطح هریک از پلیت های کشت داده شده چاهک هایی به قطر ۶ میلی لیتر ایجاد گردید و درون هر چاهک مقدار ۵۰ میکرولیتر از رقت های مختلف (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) نانوذره نقره ریخته شد. از آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین (Ciprofloxacin) (۲۵ میلی گرم در میلی لیتر) و آب دیونیزه به عنوان کنترل مثبت و منفی به ترتیب استفاده گردید. آزمایش ها سه بار تکرار شد.

بررسی اثر کشندگی رقت های مختلف نانوذره نقره روی انگل لیشمانیا ماژور به روش MTT: تهیه و کشت انگل: در این تحقیق از پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور (Promastigotes of *Leishmania. Major*) سویه MRHO/IR/75/ER تهیه شده از مرکز آموزش و پژوهش بیماری های 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 نانوذره نقره سنتز شده توسط گیاه زیره سیاه روی پروماستیگوت های انگل لیشمانیا ماژور در شرایط

اولین نشانه تولید نانوذرات نقره تغییر رنگ محلول است. تغییر رنگ نیترا نقره از زرد کم‌رنگ به زرد مایل به قهوه‌ای پس از ۲۴ ساعت مشاهده گردید. همان‌طور که در شکل شماره ۱ دیده می‌شود، طیف جذبی نانوذره در محدوده ۴۰۰-۴۵۰ نانومتر توسط طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش ظاهر شد.



شکل شماره ۱. طیف اشعه ماوراءبنفش نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه زیره

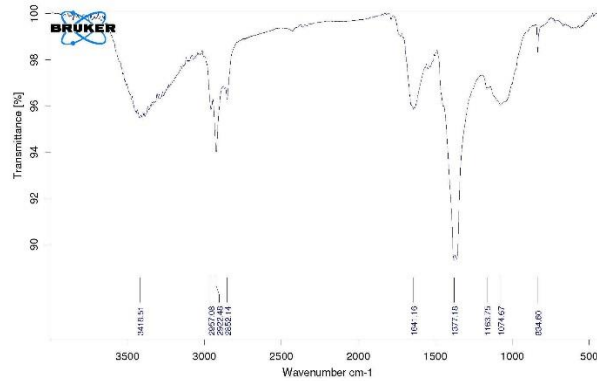
خصوصیات نانوذرات با استفاده از FTIR مشخص گردید. شکل شماره ۲ نمودار حاصل از طیف‌سنجی نانوذرات را نشان می‌دهد. طیف حاصل از رسوب نانوذرات به دست آمده توسط عصاره گیاه زیره، پیک‌هایی در محدوده ۳۴۱۸، ۲۹۵۷، ۲۹۲۲، ۲۸۵۲، ۱۶۴۱، ۱۳۷۷، ۱۱۶۳، ۱۰۷۴ و ۸۳۴ Cm^{-1} نشان داد. باند جذب در ۳۴۱۸ ممکن است به علت فرکانس‌های هیدروکسیل (OH) باشد. ظاهر قله در ۲۹۲۲، ۲۹۵۷، ۲۸۵۲ و ۱۶۴۱ مربوط به ارتعاشات کششی C-H گروه‌های آلیفاتیک موجود در عصاره گیاه است؛ همچنین پیک‌های موجود در ۱۳۷۷، ۱۱۶۳، ۱۰۷۴ و ۸۳۴ Cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی آلکن‌ها و ارتعاشات خمشی C-H و پیک موجود در ۸۳۴ Cm^{-1} مربوط به فرکانس‌های C-Cl است. تصاویر SEM تشکیل نانوذره نقره به شکل کروی در اندازه بین ۷۰-۲۰ نانومتر را نشان داده است (شکل شماره ۳).

آزمایشگاهی بررسی گردید. بدین منظور، رقت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذره نقره تهیه شد. تعداد 10^6 سلول از پروماستیگوت‌های لیسمانیا ماژور در فاز ثابت رشد در $100 \times 2/5$ از میکرولیتر محیط کشت RPMI 1640 در هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ چاهکی کشت گردید. حجم ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های 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 درجه سانتی‌گراد، با دور ۲۷۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی به آرامی 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 سلول‌ها و فعالیت متابولیکی سلول‌ها متناسب است. در نهایت، میزان جذب توسط دستگاه قرائت گر الیزا (BioTek- ELx800) در ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ۵۰ درصد غلظت مهار (مقادیر IC_{50}) نیز توسط برنامه probit در نرم‌افزار SPSS vol.18 محاسبه گردید (۱۲).

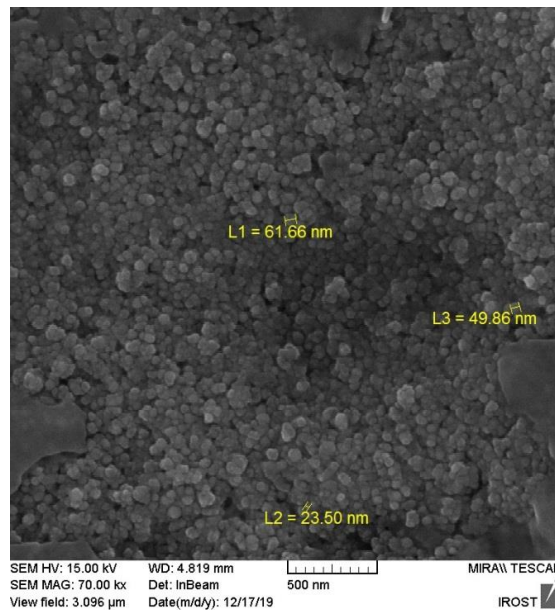
آنالیز آماری داده‌ها: همه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از بسته آماری SPSS vol.18 انجام شد. تفاوت میان گروه‌های آزمون و کنترل با استفاده از آزمون t و ANOVA تجزیه و تحلیل گردید. علاوه بر این، $P < 0.05$ به عنوان آماری معنی‌دار تعریف شد. مقادیر IC_{50} (غلظت مهار ۵۰ درصد) با استفاده از آزمون Probit در SPSS محاسبه گردید.

یافته‌ها

بررسی خصوصیات نانوذرات نقره تولید شده با گیاه زیره: روش سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از احیای یون‌های نقره به وسیله عصاره گیاه زیره انجام شد.



شکل شماره ۲. طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) در نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه زیره در محدوده ۴۰۰-۱۴۰۰- Cm^{-1}

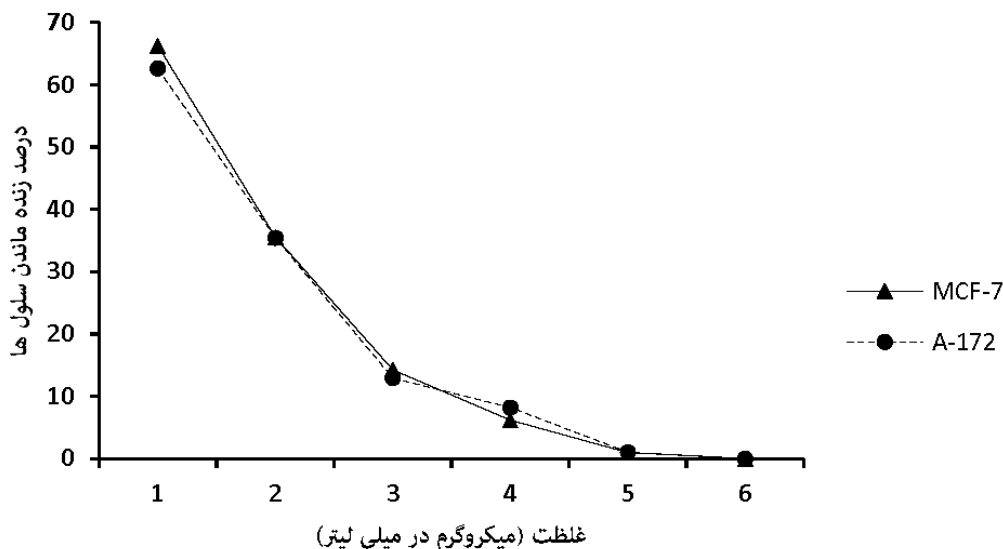


شکل شماره ۳. تصویر و توزیع ذره‌ای نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه زیره به وسیله میکروسکوپ الکترونی SEM

فعالیت ضدباکتریایی نانوذره نقره: بررسی فعالیت ضدباکتریایی نانوذره نقره سنتز شده بر سه گونه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلائی و باسیلوس سوبتیلیس نشان داد که غلظت ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذره نقره هیچ اثر مهاري بر رشد باکتری‌های بررسی شده ندارد؛

همچنین مطالعات نشان داد، درحالی که آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسین کمترین اثر مهاري را در رشد باسیلوس سوبتیلیس در مقایسه با دو باکتری دیگر دارد، غلظت ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذره اثر مهاري بسیار بیشتری روی رشد باسیلوس سوبتیلیس، در مقایسه با استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلائی نشان می‌دهد (جدول شماره ۱).

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



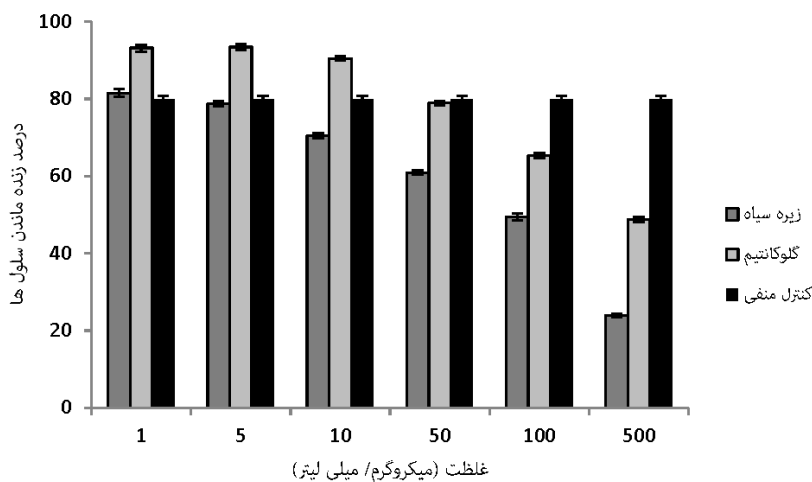
شکل شماره ۴. اثر سمیت نانوذره نقره سنتز شده روی رده سلول های گلیوبلاستوما ی انسانی A-172 و سینه انسان MCF-7. سلول ها با غلظت های مختلف نانوذره به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و آزمون رنگ سنجی MTT روی آن ها انجام گردید و میزان درصد زنده ماندن سلول ها در غلظت های مختلف محاسبه شد

جدول شماره ۱. قطر هاله عدم رشد میکروبی در غلظت های مختلف نانوذرات نقره با روش انتشار از چاهک (برحسب میلی متر)

میکروارگانسم	۲۵	۵۰	۷۵	۱۰۰	سیپروفلاکسین
استافیلوکوکوس اورئوس	۰	۰	۱۱±۰/۸۱	۲۶/۶۶±۳/۲	۲۱۵
اشرشیا کلای	۰	۰	۷±۰/۸	۳۳/۳۳±۲/۳	۱۷۳
باسیلوس سوبتیلیس	۰	۰	۴۳±۳	۹۱/۳۳±۱/۸	۱۱/۶

نانوذره نقره و گلوکانتیم به ترتیب $۷۳/۸۹±۲/۳۲$ و $۳۹۸/۵۱±۲۱/۲$ میکروگرم بر میلی لیتر بود. میان نانوذره نقره و گلوکانتیم تفاوت معنی داری وجود داشت.

اثر ضد پروماستیگوت نانوذره نقره: شکل شماره ۵، درصد زنده ماندن سلول (درصد) برای نانوذره نقره و گلوکانتیم در مقابل کنترل تیمار نشده را نشان می دهد. مقادیر IC_{50} برای



شکل شماره ۵. تأثیر غلظت های مختلف نانوذره نقره و گلوکانتیم (داروی کنترل) بر درصد زنده ماندن پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور

بحث و نتیجه گیری

تاکنون مطالعات بسیاری روی فعالیت های زیستی نانوذرات نقره سنتز شده توسط سنتز سبز انجام شده و ویژگی های مختلفی از جمله اثر سمیت آن ها بر رده های سلول های سرطانی و اثر ضد میکروبی آن ها به اثبات رسیده است؛ به عنوان مثال، نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره های گیاهی مختلف مانند *Salvia officinalis*، *Morinda-Piper longum*، *Annona squamosa*، *Artemisia* و *Semenovia suffruticosa citrifolia* *quttensis* آثار سمیت چشمگیری علیه رده های سلول های سرطانی نشان داده اند (۱۳-۱۵، ۲). اندازه، شکل و بار نانوذرات فلزی عامل های مهمی هستند که بر میزان سمیت آن ها اثر می گذارد؛ به عنوان مثال، شکل و اندازه نانوذرات با تولید گونه های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species, ROS) مرتبط است (۱۶). علاوه بر این، ترکیبات مختلف گیاهی که روی سطح نانوذرات متصل اند، عامل مؤثری در القای آثار سمیت آن ها هستند؛ در نتیجه، نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره های گیاهان مختلف می تواند به آثار سمی مختلفی منجر شود؛ بنابراین، آثار سمیت بالاتر نانوذرات سنتز شده با عصاره گیاهان در مقایسه با عصاره 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، به طور انتخابی اثر نمی گذارد و این مسئله سبب می گردد آثار جانبی بسیاری داشته باشد و استفاده 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 مطالعه انجام شده روی اثر سمیت نانوذره نقره سنتز شده با عصاره گیاه *Salvia officinalis* مشاهده شد که میزان IC_{50} آن روی رده سلول های MCF-7 و A-172 به ترتیب $58/6$ و $50/4$ میکروگرم در میلی لیتر است

(۲)؛ همچنین بررسی اثر سمیت نانوذره نقره سنتز شده با عصاره گیاه *Semenovia suffruticosa* نشان داد که میزان IC_{50} آن روی چند رده سلولی سرطانی ۱۵ الی ۲۶ میکروگرم در میلی لیتر است (۱). در مطالعه دیگری، نانوذرات نقره سنتز شده به وسیله عصاره برگ گیاه *Annona Squamosa*، اثر سمیت بر رده سلول های سرطان سینه MCF-7 و سلول های اپی تلیال نرمال سینه HBL-100 با میزان IC_{50} ۵۰ و ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر نشان داد و این نتایج نیز نشان دهنده آن است که سلول های طبیعی در برابر نانوذرات نقره، مقاومت بیشتری نسبت به سلول های سرطانی ندارند (۱۳). در مقایسه با مطالعات اخیر، نانوذرات نقره ساخته شده با عصاره زیره سیاه IC_{50} تقریباً ۷ میکروگرم در میلی لیتر را روی دو رده سلولی گلیوبلاستوما و سرطان سینه انسان نشان داد که نشان دهنده سمیت بسیار بالای آن است. مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها و یون های 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 نقره سنتز شده با گیاهان مختلف فعالیت های ضد باکتریایی نشان می دهند (۱۸، ۲، ۱)؛ بنابراین، نانوذرات نقره به طور گسترده در پزشکی، صنایع غذایی و دارویی استفاده می شوند (۲۰، ۱۹، ۱۴). چندین سازوکار برای اثر ضد باکتریایی نانوذره نقره پیشنهاد شده است. به نظر می آید که یون های نقره رهاسده از نانوذره نقره فعالیت ضد باکتریایی را افزایش می دهد و همچنین تکثیر DNA، عملکرد تنفس، سنتز ATP و رشد باکتری را مهار می کند و در نهایت، به مرگ سلول منجر می شود (۲۲، ۲۱). انواع مختلف آنتی بیوتیک ها نیز با سازوکارهای مختلف باعث مهار رشد باکتری ها می گردند؛ به عنوان مثال، سیپروفلوکساسین که در این آزمایش به عنوان 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 می کند (۲۳). محدودیت استفاده از بسیاری از

قوی آن علیه پاتوژن‌های مواد غذایی است (۲۷)؛ بنابراین، نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گیاهان مختلف طیف گسترده‌ای از آثار ضد میکروبی ضعیف و قوی نشان دادند.

لشمانیوز جلدی یکی از بیماری‌های مهم و اندمیک در برخی از کشورهای مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری از جمله ایران به حساب می‌آید. این بیماری در سال‌های اخیر در برخی استان‌های ایران روند افزایشی به خود گرفته است (۲۸). درمان معمول لشمانیوزها 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 گزارش شده است که کارایی درمانی آن‌ها زیر سؤال می‌برد (۲۹).

برای تعیین آثار نانوذره نقره روی پروماستیگوت‌های لشمانیا ماژور و مقایسه بررسی اثر ضد لشمانیایی آن با گلوکانتیم، از روش رنگ سنجی MTT استفاده گردید که نتایج نشان داد، با افزایش غلظت، موجب افزایش مهار رشد پروماستیگوت‌های لشمانیا ماژور می‌شود و کاهش جذب نوری بیانگر این اثر مهاری است؛ همچنین در مقایسه میانگین جذب نوری میان داروی کنترل و نانوذره بررسی شده، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده گردید. در ایران، در مطالعات متعددی از این روش رنگ‌سنجی برای بررسی اثر ضد لشمانیایی نانوذره‌ها و عصاره‌های گیاهی، به علت فوایدی از جمله سادگی، سهولت، تکرارپذیری، ارزانی، ایمن و قابل اطمینان بودن، استفاده شده است.

درباره 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 پروماستیگوت‌ها برای بررسی تأثیر

آنتی‌بیوتیک‌ها به علت عوارض جانبی ناشی از مصرف آن‌ها است؛ بنابراین، یافتن جایگزین‌های مناسب با عوارض جانبی کمتر نیاز است. استفاده از نانوذرات نقره سنتز شده به روش بیولوژیکی، به سبب آثار منحصربه‌فرد آن‌ها علیه فرایندهای نامطلوب زیستی مانند خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی، به عنوان روش جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها برای مقابله با عفونت‌ها می‌تواند مؤثر باشد (۲۴، ۲۵). بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره برگ گیاه کرفس کوهی علیه استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلائی، سالمونلا تیفی موریوم، لیستریا مونوسیتوژنز، اسپرئیلوس فلاووس، پنی‌سیلیوم اکسپانوم و کلایسپس پورپورا، نشان‌دهنده فعالیت ضد میکروبی بالای آن علیه همه میکروارگانیسم‌های مطالعه شده بود (۲۶)؛ همچنین نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره تهیه شده از گیاهان *Brassica nigra*، *Berberis vulgaris*، *Lavandula angustifolia*، *Capsella bursa-pastoris* و *Origanum vulgare*، فعالیت ضد میکروبی بالاتری نسبت به آنتی‌بیوتیک gentamicin sulpha نشان داد (۲۶). در مطالعه دیگر مشاهده شد که نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گیاه *S. suffruticosa* فعالیت ضدباکتریایی مناسبی علیه باکتری‌های گرم منفی مانند اشرشیاکلائی و سودوموناس اورئوس نشان می‌دهد؛ اما در مقابل، این نانوذرات فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت نشان نمی‌دهد. آثار متفاوت این نانوذره روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، به علت ساختار دیواره سلول باکتری‌های گرم منفی است که انتقال یون‌های نقره را به غشای پلاسمایی باکتری‌های گرم منفی تسهیل می‌کند (۱). نتایج مطالعه دیگر نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره *S. officinalis* در غلظت بالا فعالیت ضدباکتریایی علیه استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سابتیلوس نشان می‌دهد (۲). مطالعه اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره برگ گیاه چای pu-erh نیز نشان‌دهنده فعالیت ضد میکروبی

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 صمیمانه خانم دکتر میترا مهربانی، رییس مرکز تحقیقات داروهای گیاهی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمان، برای در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌کنیم.

تعارض منافع

مقاله نویسندگان مقاله هیچ گونه تعارض منافی با همدیگر ندارند.

کد اخلاق:

در این تحقیق مطالعه‌ای بر روی انسان و حیوان انجام نشده و فاقد کد اخلاق می‌باشد.

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: 10.22034/nmrj2020.04.005
3. Gour A, Jain NK. Advances in green synthesis of nanoparticles. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2019; 47: 844-51. doi: 10.1080/21691401.2019.1577878.
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, Sheikhabaei 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, Sheikhabaei M, Mohamadi N. Characterization and biological activities of synthesized zinc oxide nanoparticles using the extract of *Acantholimon serotinum*. *Green Process Synth* 2020; 9: 722-33. doi: org/10.1515/gps-2020-0058.
7. Soltanian S, Sheikhabaei 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*

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 عصاره‌ها و داروی کنترل تأثیر مناسبی بر مهار رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور نشان دادند (۳۰)؛ همچنین در مطالعه دیگری، عصاره‌های درمنه کوهی، آنقوزه و قوزه پنبه رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی را مهار کردند (۳۱). با توجه به نتایج این مطالعه و مقایسه با مطالعات گذشته، این نانوذره به‌صورت آزمایشگاهی تأثیر مناسبی بر پروماستیگوت‌ها لیشمانیا ماژور دارد.

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

مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره بذر زیره توانایی مناسبی برای تولید نانوذرات نقره دارد. عصاره و نانوذرات تولیدشده دارای پتانسیل زیستی چشمگیری از نظر سمیت روی رده سلول‌های سرطانی، آثار

- Forsch 1977; 164: 194-200. doi: 10.1007/BF01263030.
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: 10.1007/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: 10.2144/97233pf01.
 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/mmb.61.3.377-392.1997.
 24. Black B, Beadle K, Harding SJ. Out of sight, out of mind: Impact of an antimicrobia stewardship initiative 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 L, 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.