

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.



© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

ستز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره مтанولی گیاه زیره سیاه و ارزیابی میزان سمیت، فعالیت ضد لیشمایی و ضد میکروبی آن

فاطمه شریفی^۱ ، ندا محمدی^۲ ، سارا سلطانیان^۳ ، محسن دوست محمدی^۴ 

^۱ مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرسیری، 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، انسیتو 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، دانشکده علوم

پایه، دانشگاه شهید باهنر کرمان،

کرمان، ایران.

Email:

n_mohammadi@kmu.ac.ir;

soltanian@uk.ac.ir

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 مтанولی زیره سیاه به عنوان عامل احیاکننده و پایدارکننده برای ستز نانوذرات نقره استفاده شد و سپس ویژگی‌های ساختاری و خصوصیات بیولوژی آن بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: نانوذرات نقره به وسیله عصاره زیره سیاه ستز شد. طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش برای بررسی حضور نانوذرات صورت گرفت و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، مورفلوژی سطح نانوذرات بسیار حساس است 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 سرتانی و خاصیت ضد لیشمایی با استفاده از روش MTT بررسی گردید و روش انتشار از چاهک برای بررسی ویژگی ضدباکتریالی نانوذرات ستزشده انجام شد.

یافته‌ها: طول موج ۴۰۰-۴۵۰ نانومتر در طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش بر تشكیل نانوذرات نقره گواهی می‌دهد. میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان‌دهنده شکل کروی و قطر بین ۲۰-۷۰ نانومتر هستند. مقدار IC50 بر رده سلول انسانی گلبوبلاستوم A-172 و سرطان سینه MCF-7 میکروگرم در میلی‌لیتر بود. نانوذره نقره فعالیت ضدباکتریالی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد. مطالعه حاضر فعالیت ضد لیشمایی مناسبی را علیه مراحل پرماستیگوت و آماتیگوت لیشمایی ماذور تأیید کرد. مقادیر IC50 نانوذره و گلوکاتئین به ترتیب ۷۳/۸۹ و ۱۶/۱۷ میکروگرم در میلی‌لیتر برای پرماستیگوت و ۱۷۱/۰۲ و ۳۹۸/۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای آماتیگوت بود.

بحث و نتیجه‌گیری: عصاره زیره سیاه توانایی احیای یون‌های نقره به نانوذرات نقره را دارد و سمیت و فعالیت ضدباکتریالی و ضد لیشمایی مناسبی نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: آثار ضد لیشمایی، زیره سیاه، ستز سبز، سمیت سلولی، فعالیت ضدباکتریالی، نانوذره نقره

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

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

انتشار میدانی (Emission Scanning Electron Field) (Microscope, FESEM فوریه Fourier transform infrared) (FTIR) بود؛ سپس میزان سمیت آن روی رده سلول های سلطانی، میزان خاصیت ضدبacterیایی و آثار ضد لیشمایی آن با استفاده از روش های مختلف بررسی گردید.

مواد و روش ها

جمع آوری و عصاره گیری گیاه: گیاه زیره سیاه از ارتفاعات جوپار استان کرمان، در ژوئیه سال ۲۰۱۹ جمع آوری شد و یک گیاه شناس آن را شناسایی کرد. یک نمونه به مرکز هرباریوم در بخش فارماکوگنوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران (KF1432) سپرده شد. قسمت های هوایی گیاه خشک گردید و عصاره گیری با استفاده از روش ماسراسیون با متابولیت های مانند فنول ها، آلkalوئیدها و ترپن ها به عنوان عوامل پایدار کننده و احیا کننده در سنتر نانوذرات عمل می کنند و بنابراین، روشی مفرونه صرف، با بازدهی بالا و غیرسمی است (۵).

سنتر نانوذرات نقره: به منظور سنتر نانوذرات نقره، از نیترات نقره به عنوان منبع فلز استفاده گردید. برای این کار، ۳۰۰ میکرولیتر نیترات نقره (۰/۱ درصد) و ۱۰ میلی لیتر از عصاره گیاه (۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر) مخلوط شدند. این مخلوط با آب دیونیزه چندین بار خوب شستشو داده و در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

بررسی خصوصیات نانوذرات نقره: تشکیل نانوذره نقره با استفاده از روش طیف سنجی مرئی- فرابنفش و دستگاه اسپکترو فوتومتر (PerkinElmer)، آلمان در طول موج ۶۰۰-۳۰۰ نانومتر کنترل شد. برای تعیین گروه های عملکردی موجود، نانوذره تحت تجزیه و تحلیل طیفی FTIR قرار گرفت. برای بررسی اندازه، مورفو لوژی و

نانوذرات نقره به علت کاربرد وسیعی که در صنعت داروسازی و پزشکی دارد و همچنین به سبب ویژگی های زیستی از جمله خواص ضدسرطانی، ضدبacterیایی، ضدقارچی، ضدپیروسی و ضدالتهابی، توجه بسیاری را به خود جلب کرده است (۲، ۱). در بسیاری از تحقیقات از ترکیبات طبیعی میکرو اگانیسم ها و بهوژه گیاهان برای سنتر نانوذرات استفاده می شود (۴، ۳). در این روش، گروه های عملکردی متابولیت های گیاهی مانند فنول ها، آلkalوئیدها و ترپن ها به عنوان عوامل پایدار کننده و احیا کننده در سنتر نانوذرات عمل می کنند و بنابراین، زیره سیاه گیاه چند ساله و خودگشتن از خانواده چتریان Boiss Bunium (Apiaiceae) است که با نام علمی Persicum معروف است. این گیاه یکی از مهم ترین و ارزشمند ترین گیاهان دارویی است که به طور وحشی در مناطقی از ایران که آب و هوای خشک دارند، مانند استان های کرمان، فارس، اصفهان و یزد می رویند (۷، ۶). دانه زیره سیاه در طب سنتی به عنوان ضد نفخ، ضد تشنج، ضد صرع، ضد اسهال، تب بر، کاهنده چربی و کلسترول خون، ضد آرثربی، تقویت کننده معده، ادرار آور و برطرف کننده سوء هاضمه به کار می رود (۱۲، ۱۳). دانه زیره سیاه غنی از عطر مایه گیاهی است و از دیرباز، به عنوان چاشنی و طعم دهنده در انواع غذا مانند نوشابه، شکلات و پنیر استفاده شده است. تولید عطر مایه در زیره سیاه بیش از ۳ برابر زیره سبز است. زیره سیاه حاوی ترکیبات فراوانی از جمله ترپن ها، فللهای، فلاونوئیدها و آلkalوئیدها است که کاربردهای بسیاری در صنایع دارویی و غذایی دارد و همچنین خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدان مناسبی در آن دیده شده است (۸-۱۱).

هدف اولیه این مطالعه سنتر نانوذرات نقره با استفاده از عصاره متابولی زیره سیاه و تعیین ویژگی های نانوذره سنتر شده با استفاده از طیف سنجی مرئی- فرابنفش UV-Vis (spectroscopy)، میکروسکوپ الکترونی روبشی

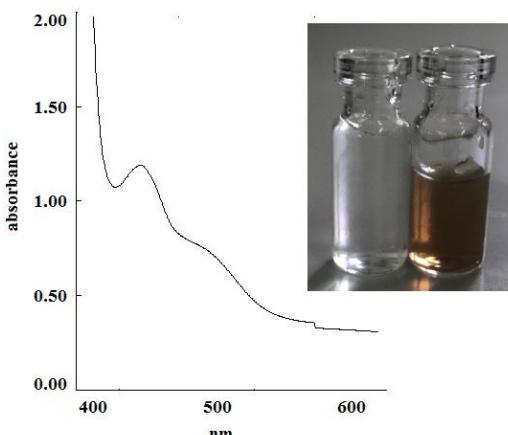
توزیع نمونه‌های استتشده از میکروسکوپ FESEM

نقره بر میانگین جذب سلوول های کنترل تقسیم و عدد به دست آمده در ۱۰۰ ضرب گردید. نتایج به دست آمده برای هر رده سلوولی استفاده شد تا غلطت موردنیاز برای مهار رشد سلوولی تا میزان ۵۰ درصد (IC_{50}), توسط برنامه probit در نرم افزار SPSS vol. 18 محاسبه گردد.

فعالیت خلدباکتریایی نانوذره سنتزشده: بررسی آثار خلدباکتریایی نانوذره نقره سنتزشده علیه باکتری های *(Staphylo-coccus aureus)*, استافیلوکوس اورئوس *(Bacillus subtilis)*, ATCC 6538، باسیلوس سوبتیلیس *(Escherichia coli)* ATCC 6051 و اشرشیاکلای (ATCC 11303) با روش انتشار از چاهک در آگار صورت گرفت. بدین منظور از سوپسانسیون هر میکروب به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر روی پلیت حاوی مولر هیستون آگار ریخته و با سواپ استریل در سه چهت 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 میکرو گرم 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 آثر کشنندگی رقت های مختلف نانوذره نقره روی انگل لیشمانیا ماذور به روش MTT تهیه و کشت انگل: در این تحقیق از پروماستیگوت های لیشمانیا ماذور (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 ماذور در محیط کشت RPMI 1640 حاوی سرم جنین گوساله کشت داده شد.

بررسی آثار ضد پروماستیگوتوی (Anti-*promastigotes*) نانوذره: اثر کشنده نقره سنتز شده توسط گیاه زیره سیاه روی پروماستیگوت های انگل لیشمانيا مازور در شرایط

اولین نشانه تولید نانوذرات نقره تغییر رنگ محلول است. تغییر رنگ نیترات نقره از زرد کم رنگ 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 ماوراء بنفش نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه زیره

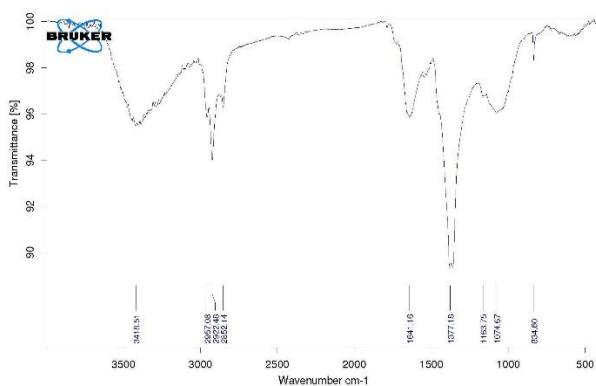
خصوصیات نانوذرات با استفاده از FTIR مشخص گردید. شکل شماره ۲ نمودار حاصل از طیف‌سنجی نانوذرات را نشان می‌دهد. طیف حاصل از رسوب نانوذرات به دست آمده توسط عصاره گیاه زیره، پیک‌هایی در محدوده ۳۴۱۸، ۳۴۱۸، ۲۹۵۷، ۲۹۵۷، ۲۸۵۲، ۲۸۵۲، ۱۳۷۷، ۱۳۷۷، ۱۱۶۳، ۱۱۶۳، ۱۰۷۴ و ۱۰۷۴ Cm⁻¹ نشان داد. باند جذب در ۳۴۱۸ ممکن است به علت فرکانس‌های هیدروکسیل (OH) باشد. ظاهر قله در ۲۹۵۷، ۲۹۵۷ و ۱۶۴۱ مربوط به ارتعاشات کششی C-H ۲۸۵۲ و ۱۶۴۱ مربوط به ارتعاشات کششی آلفا- گروه‌های آلفا- گروه‌های آلفا- گیاهی موجود در عصاره گیاه است؛ همچنین پیک‌های موجود در ۱۳۷۷، ۱۳۷۷، ۱۱۶۳، ۱۱۶۳، ۱۰۷۴ و ۱۰۷۴ Cm⁻¹ مربوط به ارتعاشات 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 ۲۰-۷۰ 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 ۱۰^۶ سلول از پروماستیگوت‌های لیشمانیا مژوز در فاز ثابت رشد در ۱۰۰ × ۲/۵ از میکرولیتر محیط کشت RPMI 1640 در هر چاهک از میکرولیت 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، میکرولیت 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 میلی لیتر در بافر فسفات به هر چاهک اضافه شد. میزان رنگی که تولید می‌شود، با میزان زنده بودن سلول‌ها و فعالیت متابولیکی سلول‌ها متناسب است. درنهایت، میزان جذب توسط دستگاه قرائت گر الایزا (BioTek- ELx800) در ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ۵۰ درصد غلظت مهاری (مقادیر IC₅₀) نیز توسط برنامه probit در نرم‌افزار SPSS vol.18 محاسبه گردید (۱۲).

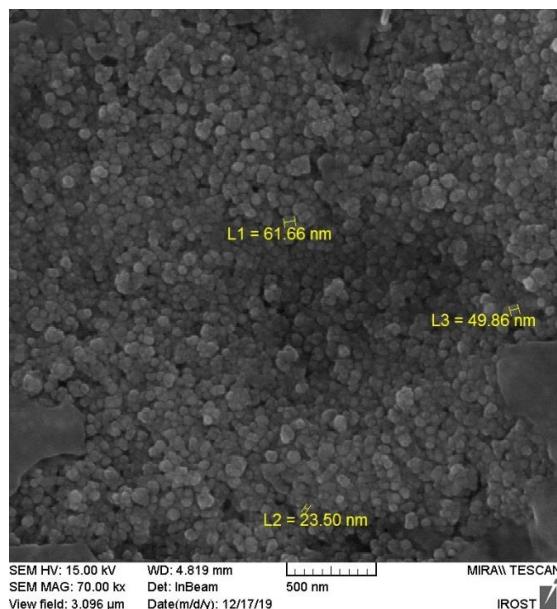
آنالیز آماری داده‌ها: همه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از بسته آماری SPSS vol.18 انجام شد. تفاوت میان گروه‌های آزمون و کنترل با استفاده از آزمون t و ANOVA تجزیه و تحلیل گردید. علاوه بر این، P<0.05 به عنوان آماری معنی دار تعریف شد. مقادیر IC₅₀ (غلظت مهاری ۵۰ درصد) با استفاده از 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 Cm-1۴۰۰۰-۴۰۰

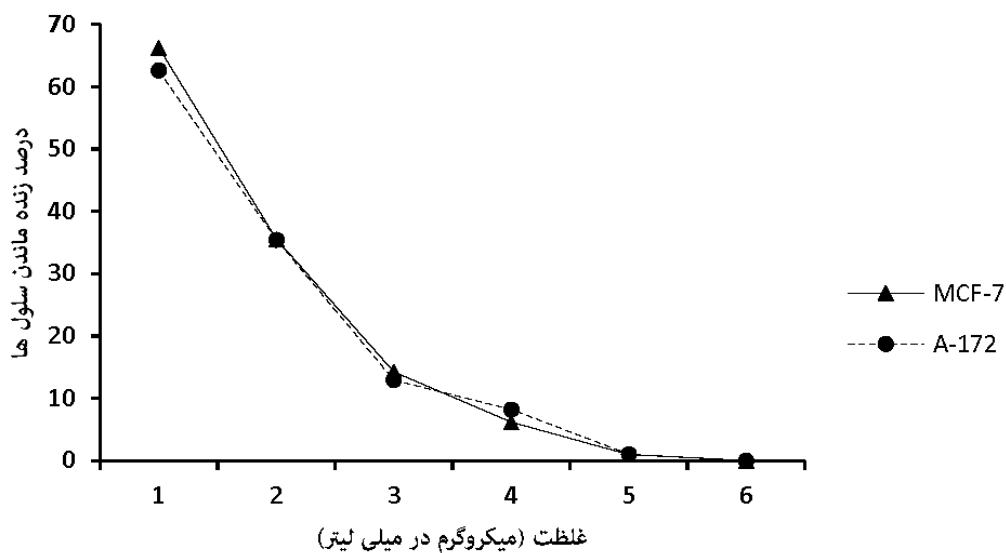


شکل شماره ۳. تصویر و توزیع ذرهای نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه زیره به وسیله میکروسکوپ الکترونی SEM

فعالیت خلبداکتریایی نانوذرة نقره: بررسی فعالیت خلبداکتریایی نانوذرة نقره سنتز شده بر سه گونه باکتری استافیلکوکوس اورئوس، اشرشیاکلای و باسیلوس سوبتیلیس نشان داد که غلظت ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر نانوذرة نقره هیچ اثر مهاری بر رشد باکتری های بررسی شده ندارد؛

همچنین مطالعات نشان داد، در حالی که آنتی بیوتیک سیپروفلاکسین کمترین اثر مهاری را در رشد باسیلوس سوبتیلیس در مقایسه با دو باکتری دیگر دارد، غلظت ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نانوذرة اثر مهاری بسیار بیشتری روی رشد باسیلوس سوبتیلیس، در مقایسه با استافیلکوکوس اورئوس و اشرشیاکلای نشان می دهد (جدول شماره ۱).

بررسی میزان سمیت نانوذرة نقره: به منظور بررسی آثار نانوذرات نقره سنتز شده 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 میلی لیتر، پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان تیمار گزارش شد. نتایج سنجش میزان زنده ماندن سلول ها در غلظت های مختلف نانوذرة نقره بر اساس رنگ سنجی MTT در شکل شماره ۴ ارائه گردید. نتایج مهار رشد سلول ها را به صورت وابسته به غلظت، پس از گذشت زمان ۴۸ ساعت نشان داد. بدین ترتیب با تعیین مقدار IC₅₀ مشخص شد که به ترتیب غلظت ۷/۲ و ۷/۶ میکروگرم در میلی لیتر در ۴۸ ساعت، به مرگ ۵۰ درصد از سلول های MCF-7 و A-172 منجر شده است.



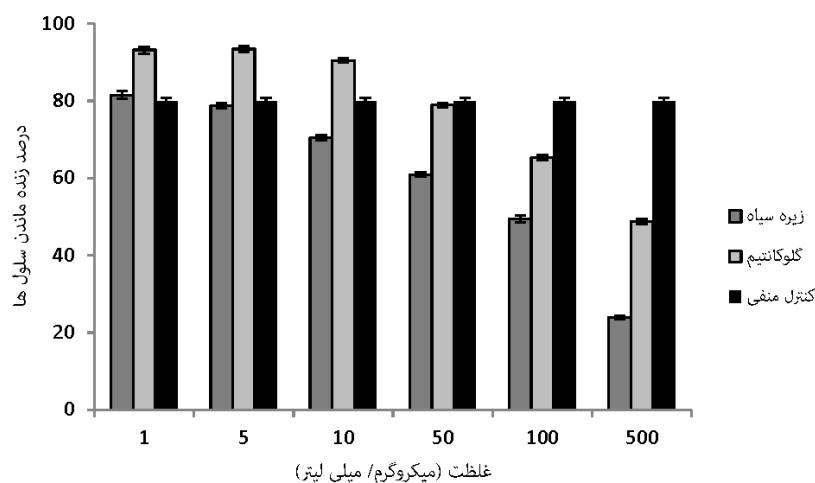
شکل شماره ۴. اثر سمیت نانوذره نقره سنتز شده روی رده سلول های گلیوبلاستومای انسانی A-172 و سینه انسان 7 MCF-7. سلول ها با غلظت های مختلف نانوذره به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و آزمون رنگ سنجی MTT روی آن ها انجام گردید و میزان درصد زنده ماندن سلول ها در غلظت های مختلف محاسبه شد

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

غلظت های نانوذره نقره (میکروگرم در میلی لیتر)						میکروارگانیسم
سپروفلاکسین	۱۰۰	۷۵	۵۰	۲۵	۰	
۲۱۵	۲۶/۶۶±۳/۲	۱۱±۰/۸۱	۰	۰		استافیلوکوکوس اورئوس
۱۷۳	۳۳/۳۳±۲/۳	۷±۰/۸	۰	۰		اشرشیاکلای
۱۱/۶	۹۱/۳۳±۱/۸	۴۳±۳	۰	۰		پاسیلوس سوبتیلیس

نانوذره نقره و گلوکانتیم به ترتیب $73/89\pm 2/32$ و $398/51\pm 21/2$ 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 مقابله کنترل تیمار شده 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 مژوز

بحث و نتیجه‌گیری

(۲)؛ همچنین بررسی اثر سمیت نانوذره نقره سنتزشده با عصاره گیاه *Semenovia suffruticosa* نشان داد که میزان IC₅₀ آن روی چند رده سلولی سرطانی ۱۵ الی ۲۶ میکروگرم در میلی لیتر است (۱). در مطالعه دیگری، نانوذرات نقره سنتزشده به وسیله عصاره برگ گیاه *Annona Squamosa*، اثر سمیت بر رده سلولهای سرطان سینه MCF-7 و سلولهای اپیتیال نرمال سینه HBL-100 IC₅₀ با میزان ۵۰ و ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر نشان داد و این نتایج نیز نشان دهنده آن است که سلولهای طبیعی در برابر نانوذرات نقره مقاومت بیشتری نسبت به سلولهای سرطانی ندارند (۱۳). در مقایسه با مطالعات اخیر، نانوذرات نقره ساخته شده با عصاره زیره سیاه IC₅₀ 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 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 نقره سنتزشده با گیاهان مختلف فعالیت های ضد باکتریایی نشان می دهند (۱۸، ۱۹، ۱)، بنابراین، نانوذرات نقره به طور گسترده در پزشکی، صنایع غذایی و دارویی استفاده می شوند (۲۰، ۱۹، ۱۴). چندین سازو کار برای اثر ضد باکتریایی نانوذره نقره پیشنهاد شده است. به نظر می آید که یون های نقره رها شده 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 (۲۱، ۲۲). انواع مختلف آنتی بیوتیک ها نیز با سازو کارهای 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 جیاز در باکتری متوقف می کند (۲۳).

تاکنون مطالعات بسیاری روی فعالیت های زیستی نانوذرات نقره سنتز شده توسط سنتر سبز انجام شده و ویژگی های مختلفی از جمله اثر سمیت آنها بر رده های سلول های سرطانی و اثر ضد میکروبی آنها 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*, *Semenovia suffruticosa*, *citrifolia* و *quttensis* آثار سمیت چشمگیری علیه رده های سلول های سرطانی نشان داده اند (۱۳-۱۵). اندازه، شکل و بار نانوذرات فلزی عامل های مهمی هستند که بر میزان سمیت آنها 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 آنها 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، ۱۸).

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 سازو کارهای مختلف جذب می شود؛ مانند پینوسیتوز، فاگو سیتوز و اندو سیتوز (۱۹).

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 $50/4$ میکرو گرم در میلی لیتر است.

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

لیشمانيوز 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 لیشمانيوزها 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 لیشمانيایی آن با گلوكانتیم، از روش رنگ سنجی ضد لیشمانيایی MTT استفاده گردید که نتایج نشان داد، با افزایش غلظت، موجب افزایش مهار رشد پروماستیگوت‌های لیشمانيایی مژوز می‌شود و کاهش جذب نوری بیانگر این اثر مهاری است؛ همچنین در مقایسه میانگین جذب نوری میان داروی کنترل و نانوذره نقره بررسی شده، اختلاف آماری معنی داری مشاهده گردید. در ایران، در مطالعات متعددی از این روش رنگ سنجی برای بررسی اثر ضد لیشمانيایی نانوذره‌ها و عصاره‌های گیاهی، به علت فوایدی از جمله سادگی، سهولت، تکرار پذیری، 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 سنتزشده به روش بیولوژیکی، به‌سبب آثار منحصر به‌فرد آن‌ها علیه فرایندهای نامطلوب زیستی مانند خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی، به عنوان روش جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها برای مقابله با عفونت‌ها می‌تواند مؤثر باشد (۲۴، ۲۵). بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتزشده با عصاره برگ گیاه کرفس کوهی علیه استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرثوس، اشرشیاکلای، سالمونلا تیفی موریوم، لیستریا مونوستوتوزن، آسپرژیلوس فلاووس، پنی‌سیلیوم اکسپانسوم و کلاویسپس پورپورا، نشان‌دهنده فعالیت ضد میکروبی بالای آن علیه همه میکروارگانیسم‌های مطالعه شده بود (۲۶)؛ همچنین نانوذرات نقره سنتزشده با عصاره تهیه شده از گیاهان *Brassica nigra*, *Berberis vulgaris* و *Lavandula angustifolia*, *Capsella bursa-pastoris*, *Origanum vulgare*, *S. suffruticosa*, *S. officinalis*، فعالیت ضد میکروبی بالاتری نسبت به آنتی‌بیوتیک *gentamicin sulphate* نشان داد (۲۶). در مطالعه دیگر مشاهده شد که نانوذرات نقره سنتزشده با عصاره گیاه *S. suffruticosa* فعالیت ضد باکتریایی مناسبی علیه باکتری‌های گرم منفی مانند اشرشیاکلای و سودومonas اورئوس نشان می‌دهد؛ اما در مقابل، این نانوذرات فعالیت ضد باکتریایی 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 سنتزشده با عصاره *S. officinalis* در غلظت بالا فعالیت ضد باکتریایی علیه استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سابتیلوس نشان می‌دهد (۲). مطالعه اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتزشده با عصاره برگ گیاه چای pu-erh نیز نشان‌دهنده فعالیت ضد میکروبی

ضد میکروبی 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، به عنوان مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی طبیعی با اثربخشی بیشتر استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

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

تعارض منافع

مقاله نویسنده‌گان مقاله هیچ گونه تعارض منافعی با همدیگر ندارند.

کد اخلاق:

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

References

- 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.
- Sharifi F, Sharififar F, Soltanian S, Doostmohammadi 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
- Gour A, Jain NK. Advances in green synthesis of nanoparticles. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2019; 47: 844-51. doi: 10.1080/21691401.2019.1577878.
- 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.
- Soltanian S, Sheikbahaei M, Mohamadi N.

مواد ضد لیشمانیابی در شرایط آزمایشگاهی استفاده می‌شود. در این زمینه، اثر ضد لیشمانیابی عصاره‌های آویشن شیرازی و اسپند در مقایسه با داروی کنترل بررسی شد، به طوری‌که عصاره‌ها و داروی کنترل تأثیر مناسبی بر مهار رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا مأذور نشان دادند (۳۰)؛ همچنین در مطالعه دیگری، عصاره‌های درمنه کوهی، آنقوزه و قوزه پنبه رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا مأذور در شرایط آزمایشگاهی را مهار کردند (۳۱). با توجه به نتایج این مطالعه و مقایسه با مطالعات گذشته، این نانوذره به صورت آزمایشگاهی تأثیر مناسبی بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا مأذور 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 تولید شده دارای پتانسیل زیستی چشمگیری از نظر سمیت روی رده سلول‌های سرطانی، آثار

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, Sheikbahaei 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, Sheikbahaei 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 antimicrobial 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.00000000000008273.
 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.

- 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 assafoetid and Gossypium hirsutum extracts on Leishmania major promastigotes in vitro. *Ann Military Health Sci Res* 2011; 8:166-72.