

بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی نانوذره نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia khorassanica* و آنالیز بیان ژنهای آپوپتوزی *Bcl2* و *Bax*

شیلا رشیدیان^۱، علی اصغر باقری کشتلی^{۲*}، امیر میرزایی^۳

مقاله پژوهشی

مقدمه: اخیراً بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از گیاهان دارویی به دلیل کم هزینه بودن و سازگار بودن با محیط زیست مورد توجه محققان قرار گرفته است. هدف این مطالعه بیوسنتز نانوذره نقره با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia khorassanica* و بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی بود.

روش بررسی: در این تحقیق تجربی، ابتدا عصاره الکلی گیاه *A. khorassanica* گرفته شد و با استفاده از عصاره گیاه، نانوذرات نقره سنتز شد. در ادامه اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی نانوذرات نقره بر روی رده سلولی سرطان ریه به ترتیب با استفاده از روش میکرودیالوژن و MTT بررسی شد. در انتها، میزان بیان ژنهای آپوپتوزی *Bcl2* و *Bax* با استفاده از روش Real Time PCR بررسی شد. نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SPSS v ۱۶ و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج: نتایج ضد میکروبی نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده دارای اثرات ضد باکتریایی بیشتری بروی باکتریهای گرم منفی بود. همچنین نانوذرات نقره در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تاثیر کشندگی معناداری بر روی رده سلولی سرطان ریه داشت. نتایج Real Time PCR نشان داد که بیان ژنهای *Bax* به اندازه $۰/۶۷ \pm ۳/۰۳$ ($P < 0.001$) افزایش و ژن *Bcl2* به اندازه $۰/۱۵ \pm ۰/۳۸$ ($P < 0.001$) کاهش یافته بود.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه *A. khorassanica* کم هزینه و آسان بوده و به دلیل داشتن اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی می تواند به عنوان یک کاندید دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: نانوذره نقره، گیاه *Artemisia khorassanica*، ضد میکروبی، ضد سرطانی، Real Time PCR

ارجاع: رشیدیان شیلا، باقری کشتلی علی اصغر، میرزایی امیر. بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی نانوذره نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia khorassanica* و آنالیز بیان ژنهای آپوپتوزی *Bcl2* و *Bax*. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۹): ۴۹-۱۰۳۸.

۱- کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

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

۳- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۲۱-۷۶۵۰۵۸۹۱، پست الکترونیکی: Bagheri-ali@riau.ac.ir، کد پستی: ۳۹۷۳۱۸۸۹۸۱

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره نقره سنتز شده دارای میانگین اندازه ۲۲/۸۹ نانومتر است و دارای اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی چشم گیری می باشد (۱۲). به طور کلی، بیش از ۲۰۰۰۰ گونه از جنس آرتمیسیا در سرتاسر جهان وجود دارد. بسیاری از گونه های آرتمیسیا برای اهداف درمانی به عنوان مثال التیام دهنده درد، تسکین سرفه، ضد حساسیت، درمان مالاریا استفاده می شوند. در میان ۲۰۰۰۰ گونه آرتمیسیا، ۳۴ گونه در ایران وجود دارد که یکی از گونه های آن، آرتمیسیا خراسانیکا است که متعلق به خانواده آستراسه (Asteraceae) است و این گیاه دارای محتوای بالای فلاوونوئیدها و ترپنوئیدها و همچنین ماده شیمیایی به نام تانن است که در این مطالعه جهت سنتز نانوذرات نقره استفاده شد (۱۳).

همان طور که اشاره شد یکی از کاربردهای نانوذرات نقره در درمان سرطان است (۱۴). یکی از سرطان های کشنده و رایج دنیا، سرطان ریه است و سالانه شمار زیادی از انسان ها را به کام مرگ می کشاند. سرطان ریه بعد از سرطان پستان دومین عامل مرگ و میر در جهان است. عوامل ژنتیکی، ایمنی شناسی و آلاینده های محیطی مهمترین عوامل ابتلا به سرطان ریه می باشند. امروزه درمان های رایج سرطان شامل جراحی، اشعه درمانی و شیمی درمانی می باشد که این می تواند باعث اثرات سمی و عوارض جانبی در بیمار شود (۱۵). در سال های اخیر، به علت افزایش شیوع مرگ و میر ناشی از سرطان ها و نقص روش های شیمی درمانی و رادیوتراپی در فرم های پیشرفته سرطان، نیاز به یافتن شیوه های جدید برای کنترل سرطان احساس می شود که یکی از این روش ها استفاده از نانوذرات به خصوص نانوذرات نقره است (۱۶).

نانوذرات نقره با اختلال در انتقال پیام سلولی، باعث ایجاد اختلال در شبکه ارتباطی سلولی می شود و در آسیب به DNA و در افزایش بیان مولکول پروتئینی آپوپتوز و به راه انداختن مرگ برنامه ریزی شده سلولی آپوپتوز نقش دارند، بنابراین منجر به ایجاد سیگنال های مرگ می شوند که این امر در درمان سرطان بسیار حائز اهمیت است. همچنین مطالعات نشان داده است که نانوذرات نقره دارای اثرات ضد میکروبی می باشند. به طوری که با تغییر در مورفولوژی غشای باکتریایی باعث افزایش نفوذ پذیری نانوذرات نقره می شود و نفوذ غیر قابل کنترل

نانوتکنولوژی یکی از جدیدترین علوم در حال توسعه می باشد که نتیجه مطالعات فراوان در رابطه با جا به جایی ذرات زیراتمی می باشد. ابعاد ذرات مورد مطالعه در نانو بین ۱ تا اندازه ۱۰۰ نانومتر می باشد. نانوفناوری در واقع یک دانش میان رشته ای است و با رشته های پزشکی، داروسازی، دام پزشکی و زیست شناسی در ارتباط می باشد (۱، ۲). محققان بیان کرده اند که فناوری نانو و فناوری زیستی از قلمروهای علمی هستند که می توانند انقلاب سوم صنعتی را شکل دهند (۳). یکی از پرکاربردترین نانوذرات فلزی نانوذرات نقره می باشند به طوری که امروزه با فناوری نانو توانسته اند نقره فلزی را به شکل ذراتی با سایز کمتر از ۱۰۰ نانومتر به وجود بیاورند (۴). فناوری ساخت نانوذرات نقره باعث به وجود آمدن انقلابی بزرگ در مواد ضدباکتریایی و ضدسرطانی شده است و دارای مزایای بسیاری نسبت به مواد شیمیایی می باشد (۵).

امروزه از روش های مختلف فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی جهت سنتز نانوذرات نقره استفاده می کنند اما روش های بیولوژیک که به روش های زیست سازگار (Eco-friendly) معروف هستند از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند که یکی از این روش ها به اصطلاح روش های سنتز سبز یا بیوسنتز می باشد (۶). در روش های سنتز سبز، از عصاره گیاهان جهت سنتز نانوذرات استفاده می کنند که مزایای بسیاری مانند هزینه کمتر، سازگاری با محیط زیست و امکان تولید آسان در مقیاس بالا را دارند و همچنین در روش های سنتز سبز نیازی به استفاده از دما و فشار بالا و همچنین ترکیبات شیمیایی سمی نیست (۷). در سال های اخیر از عصاره گیاهان مخلف از قبیل کورکورس الیتروس لین (*Corchorus olitorus* Linn) (۸)، آلتنا افیشینالیس رادیکس (*Althaea officinalis* radix) (۹)، کاسیا اکسیدنالیس (*Cassia occidentalis*) (۱۰)، تیموس وولگاریس و ارتیکا دیویکا (*Thymus vulgaris* and *Urtica dioica*) (۱۱) جهت سنتز نانوذرات نقره استفاده شده است. Baghbani-Arani و همکارانش در سال ۲۰۱۷ با استفاده از عصاره گیاه آرتمیسیا تورنفرشیانا (*Artemisia tournefortiana*) (Rchb) نانوذرات نقره را سنتز کردند و اثرات ضد میکروبی و ضدسرطانی آن را مورد مطالعه قرار دادند.

در ولتاژ زیر ۳۰ KV و تحت فشار خلاء (10^{-5} Torr) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مدل XL30 شرکت فیلیپس ساخت کشور ژاپن مورد مطالعه قرار گرفت. نانوذرات در مقداری آب حل شده و سوسپانسیون حاصل روی گرید طلا مورد تصویربرداری SEM قرار گرفت. دستگاه لایه نشانی طلا Sputter coater، ساخت شرکت KYKY ژاپن و مدل دستگاه SBC12 بود.

بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره

جهت بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده از روش رقیق سازی متوالی (Micro-dilution) به صورت ۳ بار تکرار استفاده شد. ابتدا از باکتری‌های استاندارد سودوموناس آرتروینوزا ATCC 15442، کلسیلا پنومونیه ATCC 13883، استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923، انتروکوک فکالیس ATCC 29212 کشت ۲۴ ساعته خالص در محیط کشت مایع لوریا بارتونی آگار (LB) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تهیه شد. ابتدا از کلنی‌های باکتری‌ها بر روی سطح محیط کشت برداشته شده و به صورت مجزا از تمامی باکتری‌ها با استفاده از نرمال سالین سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند (1.5×10^8 CFU/mL) تهیه گردید. به همه چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای مقدار ۵ میکرولیتر از کشت میکروبی سویه‌ها به همراه ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مایع مولر هینتون برات اضافه شد و نانوذرات نقره در غلظت‌های $100 \mu\text{g/mL}$ - $3/125$ به تمامی چاهک‌ها اضافه گردید. مقدار MIC (minimum inhibitory concentration) به عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری محسوب می‌شود (۱۹).

کشت سلول و بررسی سمیت سلولی

به منظور بررسی اثرات کشندگی سلولی نانوذرات نقره سنتز شده بر روی رده سلولی سرطانی ریه (A549) از روش رنگ-سنجی MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-) (diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Aldrich, Germany) استفاده شد. غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذره در فاصله زمانی ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی A549 تیمار شد. بعد از گذشت زمان فوق، محتوای چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای به دقت خارج شد و به آن رنگ MTT (Microculture Tetrazolium Test) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت تحت شرایط

نانوذرات نقره به درون سلول اتفاق می‌افتد و منجر به مرگ سلول می‌گردد (۱۷). با توجه به خاصیت مقرون صرفه بودن و عدم وجود اثرات سمیت زیست محیطی عصاره‌های گیاهی جهت سنتز نانوذرات نقره و همچنین دارا بودن اثرات ضدسرطانی و ضدباکتریایی نانوذرات نقره، هدف از این مطالعه سنتز بیولوژیک نانوذره نقره با استفاده از عصاره گیاه آرتمی‌زیا خراسانیکا و بررسی اثرات ضد میکروبی، ضدسرطانی آن و همچنین بررسی بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* می‌باشد.

روش بررسی

عصاره گیری و سنتز نانوذره نقره

در این مطالعه تجربی، پودر خشک گیاه آرتمی‌زیا خراسانیکا از بانک گیاهی مرکز ذخایر زیستی ایران با شماره هرباریومی ۱۳۴۳ تهیه شد. عصاره‌گیری با استفاده از روش ماسراسیون با حلال اتانول انجام گرفت. برای سنتز نانوذرات نقره میزان ۵ میلی‌لیتر از عصاره به ۹۵ میلی‌لیتر نیترات نقره اضافه شده و به مدت ۲ ساعت بر روی هم‌زن مغناطیسی قرار داده شد. بعد از گذشت دو ساعت از زمان واکنش و تغییر رنگ به قهوه‌ای، سه مرتبه شستشوی رسوب با آب مقطر انجام گرفت. تمام مراحل شستشو با دور 13000 rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت شستشوی انتهایی با اتانول انجام گرفت و محصول حاصل در دمای 75°C طی ۲ ساعت در دستگاه فور یا اون قرار داده شد (۱۸).

تست‌های تاییدی سنتز نانوذره نقره

آنالیز طیف سنجی مرئی فرابنفش

بعد از گذشت ۲ ساعت از زمان افزودن عصاره به نیترات نقره و تغییر رنگ واکنش به قهوه‌ای در مرحله اول آزمایش، آنالیز طیف سنجی مرئی فرابنفش نانوذرات نقره با استفاده از دستگاه طیف سنجی UV-Vis (Agilent, Spectrophotometer, USA) بین ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین اندازه و مورفولوژی نانوذرات نقره سنتز شده

برای تعیین اندازه و شکل ظاهری نانوذرات نقره سنتز شده از روش‌های میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) استفاده شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره و مطالعه نقطه به نقطه، جهت بررسی اندازه و مورفولوژی نانوذرات پس از پوشش دهی با طلا

در نهایت میزان بیان ژن های مورد مطالعه از روی ct های به دست آمده و با استفاده از نرم افزار REST آنالیز گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

داده های به دست آمده در این مطالعه با استفاده از نرم افزار آماری SPSS v ۱۶ و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند. اطلاعات به صورت $\text{mean} \pm \text{standard deviation}$ (SD) نمایش داده شده و $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه آزاد اسلامی تایید شده است (IR.IAU. TMB.REC. 22.340).

نتایج

نتایج تغییر رنگ محلول و طیف سنجی UV-Vis

بیوسنتز نانوذرات با تغییر رنگ محلول طی یک ساعت از زمان واکنش صورت گرفت. عصاره گیاهی به دلیل فراوانی ترکیباتی هم چون آلدهید، کتون، تریپن و آلفا تریپینول منجر به احیای نمک نیترات نقره به نانوذرات نقره می شود. در طی فرایند سنتز، یون های Ag^+ در معرض ترکیبات احیا کننده عصاره قرار گرفته و از این طریق کاهش نمک نیترات نقره شروع می شود. احیای کامل یون های Ag^+ به نانوذرات نقره با تغییر رنگ محیط و طیف سنجی انجام شد. رنگ محلول با افزودن عصاره گیاهی به محلول نیترات نقره از بی رنگ به رنگ قهوه ای طی ۱۲۰ دقیقه تغییر نمود. تغییر رنگ نشان دهنده احیای نیترات نقره و تشکیل نانوذرات نقره در محلول است. هم چنین وجود پیک در طول موج ۴۲۰ نانومتر برای نانوذرات نقره با دستگاه طیف سنجی UV-Vis طی زمان های مختلف واکنش تایید شد (شکل ۱).

میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) و نگاره (SEM)

نتایج میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM نشان داد که نانوذره سنتز شده دارای ساختار کروی می باشد. هم نتایج نشان داد که نانوذره نقره سنتز شده دارای میانگین سایز $10/71$ نانومتر بود (شکل ۲).

CO_2 ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داشته شد. سپس رنگ MTT، جداسازی شد و کریستال های فورمازان تولید شده به وسیله سلول های زنده در ایزوپروپانول حل گردید. در نهایت جذب نمونه ها با استفاده از دستگاه قرائت گر الایزا (ELISA reader, Oraganon Teknika, هلند) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و میزان کشندگی سلول توسط فرمول زیر محاسبه شد (۲۰):

$$\text{میزان بقای سلولی} = (\text{جذب نوری سلول های تیمار شده} / \text{جذب نوری سلول های کنترل}) \times 100$$

اندازه گیری بیان ژنهای Bax و Bcl2

میزان بیان ژن های آپوپتوزی Bax و Bcl2 با استفاده از روش Real Time PCR سنجیده شد. در ابتدا کل RNA سلول های تیمار شده و نشده با نانوذره نقره با استفاده از کیت استخراج RNA (کیاژن، آمریکا) طبق دستورالعمل آن استخراج شد و غلظت آن به وسیله دستگاه فتونانومتر (IMPLENGmbH, آلمان) اندازه گیری شد. ساخت مولکول های DNA مکمل با کیت Revert Aid™ First strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, لیتوانی) انجام گرفت که در آن مخلوط واکنش حاوی ۵ میکرولیتر بافر واکنش ۵x، یک میکروگرم RNA، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر الیگو dT، دو میکرولیتر مخلوط داکسی نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ میلی مولار)، یک میکرولیتر مهارکننده آنزیم RNase (۲۰ واحد در میکرولیتر)، یک میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس و آب مقطر دو بار تقطیر (تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) بود.

برنامه دمایی - زمانی به صورت ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (برای اتصال آغازگر)، ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه (ساخت cDNA)، ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (غیر فعال شدن رونوشت بردار معکوس) و ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. پرایمرهای مورد استفاده برای ژن های هدف Bax و Bcl2 بوده و ژن β -actin به عنوان کنترل داخلی در جدول ۱ آمده است (۲۱).

در نهایت واکنش Real Time PCR با استفاده از دستگاه Bioneer Light cycler (کره) با شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی گراد: ۱ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی گراد ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد ۶۰ ثانیه انجام گرفت (۲۱).

نتایج اثرات ضد میکروبی

در این مطالعه، به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوذره نقره از روش کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) استفاده شد. در روش MIC سوبه های باکتریایی تحت غلظت های ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر قرار گرفتند. نتایج نشان داد که نانوذره نقره روی تمامی باکتری های مورد مطالعه خاصیت ضدباکتریایی دارد، به طوری که کمترین و بیشترین غلظت MIC نانوذره نقره به ترتیب مربوط به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه بود (جدول ۲).

نتایج سمیت سلولی

اثرات نانوذرات نقره سنتز شده بر روی سلول سرطانی ریه (A549) با روش MTT از غلظت ۳/۱۲۵-۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر انجام گرفت و درصد زنده بودن سلول ها پس از ۲۴ ساعت اندازه گیری شد. تیمار سلول های رده سرطان ریه با غلظت های مختلف نانوذرات تجاری ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در مدت ۲۴ ساعت به ترتیب سبب کاهش بقای سلول ها ۸۴/۲۵±۰/۱۸ (P<۰/۰۵)، ۰/۲۱، ۰/۶۶±۰/۰۷، ۷۰/۳۲±۰/۰۷، ۴۷/۲۵±۰/۱۸، ۳۱/۷۵±۰/۲۱، ۲۰/۷۵±۰/۱۳ (P<۰/۰۰۱) و ۱۱/۵±۰/۱۵ (P<۰/۰۰۱) و ۳/۵۶ (P<۰/۰۰۱) می شود (نمودار ۱). نتایج نشان داد که سمیت سلولی نانوذره نقره سنتز شده وابسته به دوز می باشد.

بررسی بیان ژنهای مورد مطالعه در سلول سرطانی A549

تیمار شده با نانوذره نقره

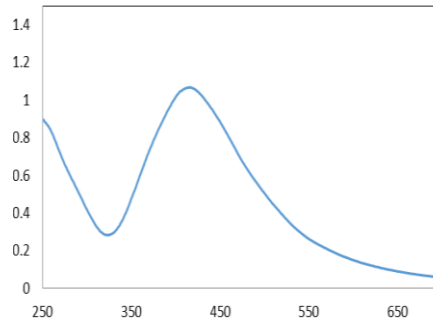
تکثیر اختصاصی ژن های موردنظر، عدم جفت شدن پرایمرها و عدم تکثیر قطعات غیراختصاصی برای هر ژن با استفاده از منحنی ذوب تعیین شد. در شکل ۳ و ۴ منحنی ذوب ژن های *Bax*، *BCL2*، *β-actin*، در رده سلولی A549 نشان داده شده است. ۱- الگوی منحنی ذوب ژن *β-actin* در دمای ۸۲ درجه سانتی گراد، ۲- الگوی منحنی ذوب ژن *Bcl2* در دمای ۸۴/۷۶، ۳- الگوی منحنی ذوب ژن *Bax* در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد. در این واکنش سیگنال فلورسانت به صورت خطی می باشد که بیانگر عدم تکثیر، عدم جفت شدن پرایمرها و فقدان باند غیراختصاصی است (شکل ۳ و ۴). تغییر در بیان ژنهای *Bax* و *Bcl2* در سلول های A549 تیمار شده با نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی طی ۲۴ ساعت ارزیابی شد. بیان ژن *Bax* نسبت به ژن مرجع *β-actin* در رده سلولی سرطانی A549 تیمار شده با نانوذرات نقره زیستی به اندازه ۰/۶۷±۰/۰۳۳ (P<0.001) افزایش و ژن *Bcl2* به اندازه ۰/۳۸±۰/۰۱۵ (P<0.001) کاهش یافته بود که از نظر آماری معنادار می باشد (نمودار ۲).

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Real Time PCR

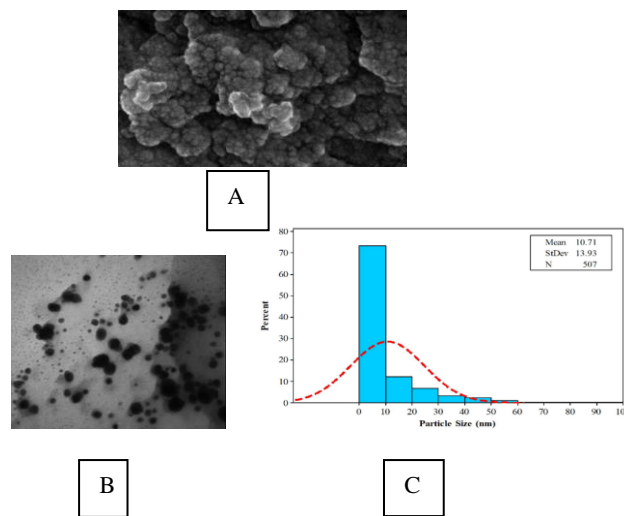
نام ژن	توالی پرایمر (5/-3/)
<i>Bax</i>	F 5'- ATGGGAGCAAGTCAGTGGAC -3'
	R 5'- CGTACCAGAGCGAGATGACA -3'
<i>Bcl2</i>	F 5'-TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC-3'
	R 5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAG-3'
<i>β-actin</i>	F 5'- TCCTCCTGAGCGCAAGTAC -3'
	R 5'- CCTGCTTGCTGATCCACATCT -3'

جدول ۲: بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذره نقره علیه استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیس، سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیا کلی.

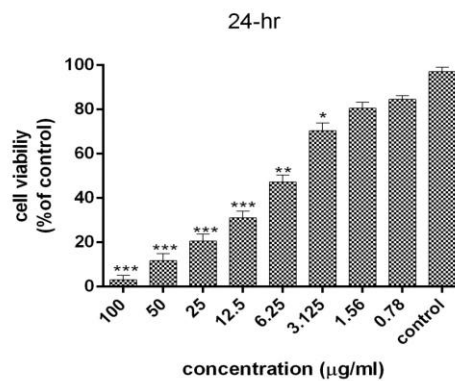
نام باکتری	میزان MIC (میکروگرم در میلی لیتر)
استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923	۲۵
انتروکوکوس فکالیس ATCC 29212	۵۰
سودوموناس آئروژینوزا ATCC 15442	۵۰
کلبسیلا پنومونیه ATCC 13883	۱۰۰



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

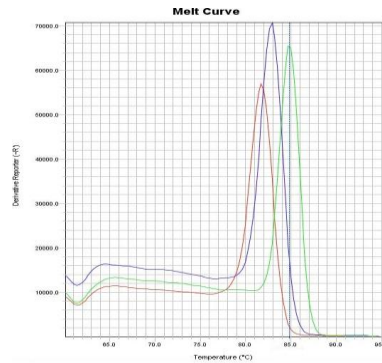


شکل ۲: نتایج میکروسکوپ الکترونی SEM (A) TEM (B) و نمودار میانگین سائز نانوذرات (C). با توجه به نمودار اندازه تقریبی سائز نانوذرات نقره ۱۰/۷۱ نانومتر بود.

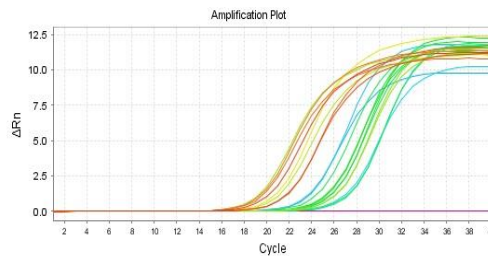


نمودار ۱: درصد بقای سلول های A549 در برابر غلظت های مختلف نانوذره نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت؛ نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه های کنترل گزارش شده است

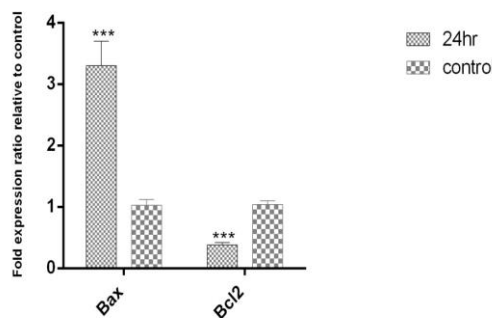
(n=3 : P < 0.001) *** , P < 0.01) **, P < 0.05) #



شکل ۳: نمودار تکثیر ژنهای مورد مطالعه *Bcl2*، *Bax* و β -*actin* همان طور که مشاهده می شود از سیکل ۱۶ به بعد میزان فلورئوسانس نمونه افزایش می یابد که نشان دهنده تکثیر ژن های مدنظر است. رنگ قرمز ژن *Bax*، رنگ سبز ژن *Bcl2* و رنگ آبی ژن β -*actin* بود.



شکل ۴: نمودار منحنی ذوب ژنهای *Bcl2*، *Bax* و β -*actin* پیک قرمز مربوط به ژن β -*actin* با دمای ۸۲ درجه سانتی گراد، پیک آبی مربوط به ژن *Bcl2* با دمای ذوب ۸۴/۷۶ درجه سانتی گراد، پیک سبز مربوط به ژن *Bax* با دمای ذوب ۸۵ درجه سانتی گراد.



نمودار ۲: میزان بیان ژن های *Bcl2* و *Bax* نسبت به ژن کنترل (β -*actin*). نسبت بیان ژن های *Bcl2* و *Bax* نسبت به ژن مرجع در رده سلولی سرطانی A549 تیمار شده با نانوذره طی ۲۴ ساعت.
(n=3 : P < ۰/۰۰۱ *** , P < ۰/۰۱ ** , P < ۰/۰۵ *)

نانومتر بود. استفاده از ظرفیت بالای گیاهان ما را در دست یافتن به نانوذرات با پایداری بالا و فعال از نظر زیستی کمک می کند. سنتز زیستی نانوذرات تولید شده توسط گیاهان دارویی می تواند در موارد مختلف از جمله انتقال داروهای ضد سرطان مورد استفاده قرار گیرد. از مزایای روش زیستی و استفاده از عصاره گیاهان می توان به ساده و کم هزینه بودن

بحث

در این مطالعه با استفاده از عصاره گیاه بومی ایران به نام آرتمیزییا خراسانیکا و بدون استفاده از مواد شیمیایی و خطرناک، نانوذرات نقره سنتز شد. با استفاده از روش میکروسکوپ الکترونی نگاره و گذاره مشخص شد نانوذرات نقره تولید شده دارای ساختار کروی و دارای میانگین اندازه ۱۰/۷۱

این مطالعه بررسی اثرات ضدسمیت سلولی نانوذره نقره سنتز شده با استفاده از روش MTT و هم چنین آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* بود. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات سنتز شده دارای سمیت سلولی وابسته به دوز بوده و دارای اثرات سمیت سلولی معناداری می‌باشد. هم‌چنین نتایج Real Time PCR نشان داد که بیان ژن‌های آپوپتوزی به‌دنبال تیمار سلول‌ها تغییر معناداری داشته‌اند که وقوع آپوپتوز را در سلول‌های تیمار شده نشان می‌دهد. همان‌طور که می‌دانیم بیشتر عوامل ضدسرطانی اثرات درمانی خودشان را با القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده یا آپوپتوز اعمال می‌کنند. در واقع القای مرگ برنامه‌ریزی شده یکی از مهم‌ترین روش‌ها در از بین بردن بدون عارضه سلول‌های سرطانی است. مسیر مرگ سلولی می‌تواند شامل فعال‌سازی رویدادهای پروآپوپتوتیک اندامک میتوکندری در سلول باشد که با آزاد سازی سیتوکروم c از آن آغاز می‌شود.

علاوه بر این اثرات نانوذرات نقره در افزایش بیان ژن پروتئاز کاسپاز ۳ در سلول‌های سرطانی و القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در مطالعات مختلف نشان داده شده است. به طور کلی القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا آپوپتوز یکی از اهداف محققان جهت درمان سرطان به شمار می‌رود که به نظر می‌رسد نانوذرات نقره می‌توانند به‌عنوان یک عامل القا کننده آپوپتوز جهت درمان به‌کار برده شوند (۲۶). Mousavi و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره برگ گیاه آرتمیسیا تورکومونیکا (*Artemisia turcomonica*) سنتز کرده و اثرات ضدسرطانی آن را بر روی رده سلولی سرطان معده مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که اندازه میانگین نانوذره نقره سنتز شده ۲۲ نانومتر است و نانوذره نقره سنتز شده دارای اثرات سمیت سلولی معناداری بر روی رده سلولی سرطان ریه می‌باشد (۲۷).

هم چنین، یکی دیگر از اهداف این مطالعه بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده بود. نانوذرات نقره تولید شده در این مطالعه، دارای اثرات ضد میکروبی معناداری بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی بود. یکی از دلایل اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره می‌تواند آزادسازی یون‌های نقره از نانوذرات نقره باشد که به اکسیژن، گوگرد و نیتروژن

اشاره کرد. روش زیستی نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی دارای راندمان بیشتر و تقریباً فاقد معایب است (۲۲). در این مطالعه با استفاده از روش UV-Vis مشخص شد که نانوذره نقره سنتز شده دارای ماکزیمم جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر است در واقع الکترون‌های آزاد موجود در نانوذرات نقره با جذب نور مرئی برانگیخته می‌شود و به یک تراز انرژی بالاتر می‌روند ولی چون الکترون در حالت برانگیخته ناپایدار است بنابراین دوباره به تراز انرژی پایه برمی‌گردد و یک فوتونی از خود ساطع می‌کند. شکل ۱ نشان داد که ماکزیمم جذب نانوذره نقره در طول موج ۴۲۰ نانومتر است که با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (۲۳). تاکنون مطالعات مختلفی در جهت سنتز نانوذرات نقره با استفاده از گیاهان خانواده آستراسه انجام گرفته است. خلیلی و همکارانش در سال ۲۰۱۷ با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia tournefortiana* نانوذرات نقره را سنتز کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره سنتز شده دارای میانگین اندازه ۲۲/۸۹ نانومتر بوده و دارای خاصیت ضد میکروبی و ضدسرطانی معنادار می‌باشد. هم چنین نانوذره نقره سنتز شده دارای اثرات آپوپتوزی بر روی رده سلول سرطانی سرطان کولون می‌باشد (۲۳). Ghanbar F و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia quttensis podlech* سنتز کردند. این محققان اثرات ضدباکتریایی را با روش میکرودایلوشن، اثرات ضدسرطانی را با روش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-) و اثرات آنتی‌اکسیدانی را با روش DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره نقره دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و ضدسرطانی می‌باشد و بر روی سلول انسانی نرمال تاثیر معناداری ندارد (۲۴). سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاهی آرتمیسیا آنوآ (*Artemisia annua*) توسط باساوگودا و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش شد.

در مطالعه آن‌ها اثرات ضد باکتریایی و ضد آنزیم تیروزیناز نانوذرات نقره مورد مطالعه قرار گرفت. این محققان بیان کردند که نانوذره نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاهی به‌عنوان احیا کننده قوی، مقرون به صرفه می‌باشد (۲۵). یکی از اهداف

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که بیوسنتز نانوذرات نقره به روش زیستی آسان و کم هزینه بوده و دارای اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی می باشد و در نهایت می توان پیشنهاد کرد که با مطالعات بیشتر می توان از این نانوذره نقره سنتز شده به عنوان کاندید دارویی برای اهداف درمانی ضد سرطانی و ضد میکروبی استفاده کرد.

سپاسگزاری

این پژوهش حاصل از پایان نامه کارشناسی ارشد بوده و تمام منافع مالی توسط محققین پژوهش تامین شده است. بدین وسیله از تمامی کسانی که در انجام این تحقیق همکاری نموده اند، به خصوص از آقای حسن نوربازرگان دانشجوی دکتری زیست فناوری پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تشکر و قدردانی به عمل می آید. تعارض در منافع: وجود ندارد.

بیومولکول های عملکردی در سلول می شود که منجر به مرگ سلول های باکتریایی می شود. هم چنین نانوذرات نقره می توانند باعث تولید رادیکال های سمی اکسیژن در سلول های باکتریایی شده و بر روی DNA اثر بگذارند که در این مطالعه نیز نانوذره نقره سنتز شده دارای اثرات ضد میکروبی معناداری بود (۲۸). ویجیاکومار و همکارانش در سال ۲۰۱۳ با استفاده از عصاره گیاه آرتمیزیا نیلگریا (*Artemisia nilagrica*) سنتز نانو ذره نقره را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج مطالعه آن ها نشان داد که این نانونقره تولید شده دارای خواص ضد باکتریایی است (۲۹). سنتز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره گیاهی آرتمیزیا آنوا (*Artemisia annua*) توسط باساوگودا و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش شد. در مطالعه آن ها اثرات ضد باکتریایی و ضد آنزیم تیروزیناز نانو ذرات نقره مورد مطالعه قرار گرفت. این محققان بیان کردند که نانو ذره نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاهی به عنوان احیا کننده قوی، مقرون به صرفه می باشد (۳۰).

References:

- 1-Bunggulawa EJ, Wang W, Yin T, Wang N, Durkan C, Wang Y, et al. *Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems*. J Nanobiotechnology 2018; 16; 16(1): 81.
- 2-Khan I, Khan M, Umar MN, OH DH. *Nanobiotechnology and its applications in drug delivery system: a review*. IET Nanobiotechnol 2015; 9(6): 396-400.
- 3-Peña-Bahamonde J, Nguyen HN, Fanourakis SK, Rodrigues DF. *Recent advances in graphene-based biosensor technology with applications in life sciences*. J Nanobiotechnology 2018; 16(1):75.
- 4-Siddiqi KS, Husen A, Rao RAK. *A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties*. J Nanobiotechnology 2018; 16(1):14.
- 5-Aboelfetoh EF, El-Shenody RA, Ghobara MM. *Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using green algae (Caulerpa serrulata): reaction optimization, catalytic and antibacterial activities*. Environ Monit Assess 2017; 189(7): 349.
- 6-Yasir M, Singh J, Tripathi MK, Singh P1, Shrivastava R. *Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Leaf Extract of Common Arrowhead Houseplant and Its Anticandidal Activity*. Pharmacogn Mag 2018; 13(Suppl 4): S840-44.
- 7-Otunola GA, Afolayan AJ, Ajayi EO, Odeyemi SW. *Characterization, Antibacterial and*

- Antioxidant Properties of Silver Nanoparticles Synthesized from Aqueous Extracts of Allium sativum, Zingiber officinale, and Capsicum frutescens.* Pharmacogn Mag 2017; 13(Suppl 2): S201-S208.
- 8-Meva FE, Segnou ML, Ebongue CO, Ntomba AA, Steve DY, Malolo FAE, et al. *Unexplored vegetal green synthesis of silver nanoparticles: a preliminary study with Corchorus olitorus Linn and Ipomea batatas (L.) Lam.* Afr J Biotechnol 2016; 15(10): 341-49.
- 9-Korbekandi H, Asghari G, Chitsazi MR, Bahri Najafi R, Badii A, Iravani S. *Green biosynthesis of silver nanoparticles using Althaea officinalis radix hydroalcoholic extract.* Artif Cells Nanomed Biotechnol 2016; 44(1): 209-15.
- 10- Udayasoorian C, Kumar R, Jayabalakrishnan M. *Extracellular synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of Cassia auriculata.* Dig J Nanomater Biostruct 2011; 6: 279-83.
- 11- Jadou A, Al-Shahwany AW. *Biogenic Synthesis And Characterization Of Silver Nanoparticles Using Some Medical Plants And Evaluation Of Their Antibacterial And Toxicity Potential.* J AOAC Int 2018;101(6):1905-12.
- 12- Khalili K, Baghbani-arani F. *Green synthesized of silver nanoparticles using Artemisia tschernieviana extract and evaluation of cytotoxicity effects on human colon cancer (HT29) and normal (HEK293) cell Lines* Sjim 2017; 25(2):91-100.
- 13- Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. *The Artemisia L. Genus: a review of bioactive essential oils.* Molecules 2012; 2; 17(3): 2542-66.
- 14- Ong C, Lim JZ, Ng CT, Li JJ, Yung LY, Bay BH. *Silver Nanoparticles In Cancer: Therapeutic Efficacy And Toxicity.* Curr Med Chem 2013; 1; 20(6): 772-81.
- 15- Rebecca L S, Kimberly DM, Ahmedin J. *Cancer Statistics.* CA Cancer J Clin 2018; 68:7-30.
- 16- He Y, Du Z, Ma S, Liu Y, Li D, Huang H, et al. *Effects Of Green-Synthesized Silver Nanoparticles On Lung Cancer Cells In Vitro And Grown As Xenograft Tumors In Vivo.* Int J Nanomedicine 2016; 11: 1879-87.
- 17- Dănilă OO, Berghian AS, Dionisie V, Gheban D, Olteanu D, et al. *The effects of silver nanoparticles on behavior, apoptosis and nitro-oxidative stress in offspring Wistar rats.* Nanomedicine (Lond) 2017 Jun 1.
- 18- Kotakadi VS, Rao YS, Gaddam SA, Prasad TN, Reddy AV, Gopal DV. *Simple and rapid biosynthesis of stable silver nanoparticles using dried leaves of Catharanthus roseus. Linn. G. Donn and its anti microbial activity.* Colloids Surf B Biointerfaces 2013; 105:194-8.
- 19- Salomoni R, Léo P, Montemor AF, Rinaldi BG, Rodrigues M. *Antibacterial effect of silver nanoparticles in Pseudomonas aeruginosa.* Nanotechnol Sci Appl 2017; 10:115-21.
- 20- Buttacavoli M, Albanese NN, Di Cara G, Alduina R. *Anticancer activity of biogenerated silver nanoparticles: an integrated proteomic investigation.* Oncotarget 2017; 9(11): 9685-705.
- 21- M JF, P L. *Apoptotic efficacy of biogenic silver nanoparticles on human breast cancer MCF-7 cell lines.* Prog Biomater 2015; 4(2-4): 113-21.

- 22- Siddiqi KS, Husen A, Rao RAK. *A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties.* J Nanobiotechnology 2018; 16: 14-26.
- 23- Khalili H, Baghbani-arani F. *Green synthesized of silver nanoparticles using Artemisia tschernieviana extract and evaluation of cytotoxicity effects on human colon cancer (HT29) and normal (HEK293) Cell Lines.* Sjim 2017; 25(2): 91-100.[Persian]
- 24- Ghanbar F, Mirzaie A, Ashrafi F, Noorbazargan H, Dalirsaber Jalali M, Salehi S, et al. *Antioxidant, antibacterial and anticancer properties of phyto-synthesized Artemisia quttensis Podlech extract mediated AgNPs.* IET Nanobiotechnol 2017; 11(4):485-92.[Persian]
- 25- Xia QH, Zheng LP, Zhao PF, Wang JW. *Biosynthesis of silver nanoparticles using Artemisia annua callus for inhibiting stem-end bacteria in cut carnation flowers.* IET Nanobiotechnol 2017; 11(2):185-92.
- 26- Rónavári A, Kovács D, Igaz N, Vágvölgyi C, Boros IM, et al. *Biological activity of green-synthesized silver nanoparticles depends on the applied natural extracts: a comprehensive study.* Int J Nanomedicine 2017; 12: 871-83.
- 27- Mousavi B, Tafvizi F, Zaker Bostanabad S. *Green synthesis of silver nanoparticles using Artemisia turcomanica leaf extract and the study of anti-cancer effect and apoptosis induction on gastric cancer cell line (AGS).* Artif Cells Nanomed Biotechnol 2018; 46(sup1): 499-510.
- 28- Patra JK, Baek KH. *Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of silky hairs of corn and investigation of its antibacterial and anti-candidal synergistic activity and antioxidant potential.* IET Nanobiotechnol 2016; 10(5): 326-33.
- 29- Vijayakumar M, Priya K, Nancy FT, Noorlida A, Ahmad ABA. *Biosynthesis characterisation and anti-bacterial effect of plant mediated silver nanoparticles using Artemisia nilagirica.* Ind Crop Prod 2013; 41: 235-40.

Antibacterial and anticancer activities of biosynthesized silver nanoparticles using *Artemisia khorassanica* extract: *Bax* and *Bcl2* apoptosis gene expression analysis

Shila Rashidian¹, Aliasghar Bagheri Keshtali^{*2}, Amir Mirzaie³

Original Article

Introduction: Recently, the biosynthesis of nanoparticles and the use of medicinal plants for the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) has attracted researchers due to its low cost and eco-friendly characteristics. The aim of this study was to synthesis of AgNPs using *Artemisia khorassanica* and analysis of its antibacterial and anti-cancer activities.

Methods: In this experimental study, ethanolic extract of *A. khorassanica* was prepared and AgNPs was synthesized. Subsequently, Antibacterial and anti-cancer activities of AgNPs on lung cancer cell line were assessed using microdilution and MTT methods, respectively. Finally, the *Bax* and *Bcl2* apoptotic gene expression was analyzed via Real Time PCR.

Results: The result of antibacterial activity showed that the AgNPs had a significant effect on gram negative bacteria. In addition to, AgNPs in 100 µg/mL had significant cytotoxic effect to lung cancer cell line. The statistical analysis of Real Time PCR results by one-way ANOVA test indicated that the *Bax* and *Bcl2* gene expression were 3.03 ± 0.67 ($P < 0.001$) up-regulated and 0.38 ± 0.15 ($P < 0.001$) down-regulated, respectively.

Conclusion: The results show that the biosynthesis of AgNPs using *A. khorassanica* extract is low-cost and simple and due to its antibacterial and anticancer activities can be used as drug candidate.

Keywords: Silver nanoparticle, *Artemisia khorassanica*, Antibacterial, Anti-cancer, Real Time PCR.

Citation: Rashidian SH, Bagheri Keshtali A, Mirzaie A. Antibacterial and anticancer activities of biosynthesized silver nanoparticles using *Artemisia khorassanica* extract: *Bax* and *Bcl2* apoptosis gene expression analysis. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2019; 26(9): 1038-49.

¹Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

²Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

³Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

*Corresponding author: Tel: 021-76505891, email: Bagheri-ali@riau.ac.ir