

سنتز سبز نانوذرات اکسید روی توسط عصاره گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و بررسی اثرات ضد میکروبی، سیتوتوکسیک و آپاپتوتیک آن روی رده سلولی HT-29

بشری جهان پیمای ثابت^۱ (M.Sc)، معصومه مهدوی اورتاکنند^{۲*} (Ph.D)، فهیمه باغبانی آرانی^۱ (Ph.D)

۱- گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۹

masumehmahdavi@gmail.com

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۲۶۷۲۵۰۱۱

چکیده

هدف: امروزه نانوذرات اکسید فلزات به عنوان یکی از کاندیدهای درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر بیوسنتز نانوذرات اکسید روی توسط عصاره گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) برای اولین بار انجام شد و سپس اثرات ضد میکروبی، اثرات سیتوتوکسیک و آپاپتوتیک آن روی رده سلولی سرطان کولون مورد بررسی قرار گرفت. مواد و روش‌ها: نانوذرات اکسید روی (ZnO) با استفاده از عصاره آبی سرشاخه‌های گیاه آویشن شیرازی بیوسنتز شد. شکل، اندازه و ساختار نانوذرات سنتز شده توسط آنالیزهای EDS، XRD، FTIR، FE-SEM، ارزیابی شد. اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی به روش MIC و اثرات سیتوتوکسیک آن علیه دو رده سلولی سرطانی کولون HT-29 و نرمال HEK-293 به روش MTT بررسی شد. بیان ژن *p53* و *Casp3* در سلول‌های تیمار شده با دوز IC50 با روش Real time PCR ارزیابی شد. نوع مرگ سلولی با روش فلوسایتومتری مشخص گردید. یافته‌ها: نتایج نشان داد که نانوذرات ZnO با اندازه ۳۵-۹۵ نانومتر و به شکل صفحه‌ای سنتز شده که در اجتماعات ستاره‌ای شکل دیده شد. MIC نانوذرات اکسید روی علیه باکتری‌های مورد مطالعه بین ۱۰۰-۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ گزارش شد. نتایج حاصل از MTT نشان داد که IC50 نانوذرات $282/4 \mu\text{g/ml}$ بوده و در این غلظت بیان ژن *p53* و *Casp3* به ترتیب به میزان ۱/۲۲ و ۳/۸۱ برابر افزایش پیدا کرده است که از لحاظ آماری معنادار بود. نتایج فلوسایتومتری میزان آپاپتوز ۷۶٪ درصدی را نشان داد. نتیجه‌گیری: نانوذرات ZnO سنتز شده توسط عصاره گیاه *Z. multiflora* می‌توانند به عنوان بخشی از فرمولاسیون داروی ضد توموری مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات، اکسید روی، تکنولوژی شیمی سبز، سرطان کولون، آپاپتوز، عصاره‌های گیاهی

مقدمه

شیوه‌های نوین درمانی برای کنترل سرطان ضروری می‌باشد [۳]. در این میان علم نانوتکنولوژی کمک ارزنده‌ای به کشف و توسعه راهکارهای نوین درمانی سرطان نموده است؛ برای مثال، می‌توان به استفاده از نانوذرات اصلاح شده برای تحویل هدفمند و انتخابی دارو به بافت سرطان اشاره کرد [۴، ۵]. نانوذرات فلزی به دلیل خواص فیزیکی منحصر به فرد، به عنوان کاندیدای جذاب درمان دارویی به خدمت گرفته شده‌اند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به نانوذرات اکسید روی اشاره کرد. که توسط وزارت غذا و داروی آمریکا به عنوان یک ماده بی‌خطر شناخته شده است [۶]. اگر چه روش‌های مختلفی برای سنتز نانوذره مطرح است اما روش‌های زیست سازگار مانند سنتز با استفاده از باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان به عنوان روش جایگزین بسیار

سرطان کولورکتال (Colorectal cancer, CRC) یکی از دلایل عمده مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته است [۱]. این سرطان در اثر تجمع پیش‌رونده‌ی تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی که باعث ترنسفورم اپی‌تلیال نرمال کولون به سرطان کولون می‌شوند، رخ می‌دهد [۲]. امروزه بسیاری از گزینه‌های درمانی سرطان شامل جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و مراقبت تسکینی در دسترس است که بسته به محل و درجه سرطان، ترکیبی از روش‌های مختلف جهت درمان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این در حالی است که در بیش‌تر موارد سلول‌های سالم نیز دچار مرگ می‌شوند و می‌تواند عوارض جانبی در بیمار به همراه داشته باشد. بنابراین نیاز به جست‌وجو در

۲۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط شد. برای ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه جوشانده شد و محلول حاوی عصاره را جدا نموده و اجازه داده شد تا رسیدن به دمای اتاق خنک شود. سپس محلول را از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده تا ذرات معلق نداشته باشد. حال ۰/۰۲ مولار از استات روی دو آبه $(Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O)$ را در ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل نموده و به مدت ۳۰ دقیقه روی هم‌زن مغناطیسی هم زده شد. ۱ میلی لیتر عصاره گیاهی (بدون ذرات جامد معلق) به آن اضافه کرده و به مدت ۲ ساعت دیگر هم‌زده شد. سپس قطره قطره سود ۵ مولار را به محلول اضافه نموده و تا جایی که PH محلول حاصل به ۱۲ برسد ادامه داده شد. رنگ مخلوط واکنش پس از ۱ ساعت از زمان انکوباسیون تغییر یافت. هم‌زدن این مخلوط ۳ ساعت دیگر ادامه یافت. مشاهده رنگ زرد پس از زمان انکوباسیون، سنتز نانوذرات ZnO را تایید کرد. نانوذرات ZnO با سانتریفوژ سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه از مخلوط جدا و در آن با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت خشک شدند و در نهایت پودر سفید رنگ حاصل جهت مطالعات بعدی در بطری‌های غیر قابل نفوذ نگهداری شدند. جهت تایید ساختار و ریخت‌شناسی نانوذرات تولید شده از تکنیک‌های مختلفی از جمله: FE-SEM, XRD, FTIR, EDS استفاده گردید. از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (SIGMA VP-500, ZEISS) برای مطالعه ساختار کریستالی، مورفولوژی و اندازه نانوذرات اکسید روی استفاده شد. آنالیز EDS (با دکتور ساخت شرکت Oxford انگلستان) جهت تشخیص ترکیب عناصر موجود در نمونه و خلوص محصول در نقاط معینی از آن و با نقشه‌ای از توزیع عناصر موجود در نمونه با توجه به سطح تصویربرداری شده استفاده شد. همچنین با آنالیز FTIR (دستگاه طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه) ساختار شیمیایی و نوع گروه‌های عاملی نمونه‌ها بررسی شد. در این تحقیق برای آنالیز مورد نظر ۵۰ میلی‌گرم از نمونه در محدوده‌های ۴۰۰ تا 4000 cm^{-1} و محدوده شدت (Intensity) ۲۰-۱۰۰ بررسی گردید. برای تعیین ترکیب شیمیایی، شناسایی فازها و تعیین سایز کریستالی نانوذرات سنتز شده، نمونه‌ی تهیه شده تحت آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD) (X'Pert Pro, Panalitical) قرار گرفت. در این آنالیز نانوذره با پوشش Cu در محدوده ۰-۱۰۰ اندازه‌گیری شد.

بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی به روش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) توسط میکروپلیت ۹۶ چاهکی و به روش میکرودیالوژن برات علیه سویه‌های استاندارد باکتری‌های گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa*

ساده و مقرون به صرفه نسبت به روش‌های شیمیایی و فیزیکی می‌باشد که در این میان گیاهان مورد توجه بیش‌تری قرار گرفته‌اند [۷،۸]. آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* از خانواده نعناعیان است. این گیاه حاوی مقدار بسیار زیادی ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی است. تریپنئیدها نه تنها بزرگ‌ترین گروه از تولیدات طبیعی را تشکیل می‌دهند بلکه از نظر تنوع ساختاری نیز دارای دسته وسیعی می‌باشند که می‌توانند عامل احیاکننده نانوذرات به شمار روند. تیمول، از اصلی‌ترین اجزای گیاه آویشن، ماده‌ای است که با داشتن ساختار فنولی، دارای اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی فراوان است [۹،۱۰]. بنابراین به نظر می‌رسد در سنتز سبز نانوذرات به منظور کاربرد دارویی آن‌ها موثر باشد. مطالعات مختلفی نیز این پتانسیل را نشان داده‌اند به طوری که تاکنون از این گیاه برای سنتز سبز نانوذره نقره [۱۱] و طلا [۱۲] استفاده شده است. چنانچه اثر درمانی و ضد توموری این ترکیبات مورد تایید قرار گیرد، این مساله می‌تواند قدم به‌سزایی در پیشبرد روش‌های درمانی در سرطان باشد. ژن p53 بر روی بازوی کوتاه از کروموزوم ۱۷ در موقعیت P13.1 قرار دارد و دارای ۱۱ اگزون و طول ۲۰ کیلو باز می‌باشد. جهش‌های p53 تقریباً در نیمی از تومورهای انسانی یافت می‌شوند و به نظر می‌رسد که بقیه تومورها نیز به علت نقص در مسیرهای مرتبط با p53 ایجاد می‌شوند [۱۳]. ژن Casp3 بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۴ در موقعیت q34.۴ قرار دارد و دارای ۸ اگزون می‌باشد. کاسپاز ۳ یکی از کاسپازهای اجرایی است که می‌تواند در اثر پروتئولیز فعال شود و سایر پروکاسپازها را فعال کند و در نهایت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی رخ داده و منجر به قطعه قطعه شدن DNA، تجزیه اسکلت سلولی و پروتئین‌های هسته‌ای می‌شود [۱۴].

هدف از این مطالعه سنتز سبز نانو ذرات اکسید روی برای اولین بار توسط عصاره آبی سرشاخه‌های گیاه آویشن شیرازی و بررسی اثر ضد میکروبی، سایتوتوکسیک و آپاپتوتیک نانوذرات سنتز شده روی دو رده سلولی نرمال HEK293 و سرطانی HT29 و ارزیابی تغییرات بیان ژن p53 و Casp3 بود.

مواد و روش‌ها

شناسه مصوبه اخلاق در پژوهش این تحقیق IR.IAU.VARAMIN.REC.1398.015 می‌باشد. جهت سنتز نانوذره اکسید روی، ۲۰ گرم از سرشاخه خشک شده گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، جمع‌آوری شده از استان فارس و تایید شده توسط متخصص سیستماتیک گیاهی، ابتدا با آب شست‌وشو داده شد و سپس با هاون خرد کرده و با

رقت‌ها و بعد از خالی کردن محیط رویی هر چاهک توسط سرنگ استریل ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور قرار گرفتند. محیط کشت و نانوذرات اکسید روی را خارج کرده و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول (MTT (Sigma-Aldrich, USA) در تاریکی به پلیت‌ها اضافه شد و به مدت ۴ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شد. سپس محیط رویی چاهک‌ها برداشته شد و ۱۰۰ میکرولیتر ماده DMSO به چاهک‌ها اضافه شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. سرانجام، جذب نوری رنگ حاصله توسط دستگاه قرائت‌گر الیزا (ELISA reader, Oraganon Teknika, هلند)، در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و میزان بقای سلول‌ها توسط فرمول زیر محاسبه گردید:

$100 \times (\text{جذب نوری کنترل} / \text{جذب نوری تست}) = \text{میزان بقای سلولی}$
 آزمایش‌های این تحقیق به صورت ۸ بار تکرار انجام گرفت و میزان دوز IC_{50} یا Half maximal inhibitory concentration نیز محاسبه گردید.

برای بررسی اثر آپاتوتیک نانوذره سنتز شده بیان دو ژن p53 و Casp3 با استفاده از روش Real Time PCR بررسی شد. بدین منظور ابتدا کل RNA سلول‌های سرطانی و نرمال تیمار شده با نانوذره در غلظت IC_{50} با استفاده از کیت استخراج Transgen Biotech ER101-01 استخراج شد و سپس سنتز cDNA بر اساس پروتکل کیت -Transgen Biotech ER101 (02) انجام شد. به منظور اجرای واکنش PCR حجم نهایی هر میکروتیوب ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد که حاوی ۱۰ پیکومول از پرایمرهای بالادست و پایین دست مربوط به هر ژن، ۴۰ نانوگرم cDNA، ۱۰ میکرولیتر مستر میکس و ۷ میکرولیتر آب RNase free بود. در این واکنش ژن‌های p53 و Casp3 به عنوان ژن هدف و ژن-3 GAPDH (Glyceraldehyde Phosphate dehydrogenase) به عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شدند. تکثیر ژن‌ها با استفاده از دستگاه Real Time PCR مدل ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) انجام گرفت. همچنین برای انجام تست RealTime PCR از کیت سایبر گرین شرکت تاکارا (PrimeScript™ RT Reagent Kit) و کپ استریپ شرکت ABI تولید کشور آمریکا استفاده شد. توالی پرایمرهای به کارگرفته شده در این واکنش در جدول ۱ نمایش داده شده است.

Escherichia coli ATCC 27852، Escherichia coli ATCC 25922، و گرم مثبت Bacillus aureus ATCC 6536 و Staphylococcus cereus ATCC 1247 (خریداری شده از کلکسیون میکروبی ایران) انجام شد. به این ترتیب که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر رقت‌های ۰/۷۸ تا ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات رقیق شده توسط سرم فیزیولوژی، پس از سونیکیت، بر اساس روش سریال دایلوژن به یک ردیف از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای افزوده شد. سپس سوسپانسیون میکروبی از کشت ۲۴ ساعته که با نیم مک فارلند برابر شده بود توسط محیط کشت مولر هینتون براث به میزان ۱/۱۰۰ جهت به دست آوردن غلظت 1×10^6 cfu/ml رقیق شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک افزوده شد. در این بررسی یک چاهک به عنوان کنترل منفی (شاهد نانوذرات و محیط کشت) حاوی نانوذرات و محیط کشت بدون سوسپانسیون میکروبی، یک چاهک به منظور کنترل مثبت (شاهد باکتری) حاوی محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی در نظر گرفته شد. حجم نهایی تمام چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر شد. سپس میکروپلیت‌ها در دمای $37^{\circ}C$ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. بعد از این مدت در مقایسه با ردیف کنترل وجود کدورت حاکی از رشد باکتری و شفافیت نشان‌دهنده عدم رشد باکتری است. اولین چاهک یا پایین‌ترین غلظتی که در آن هیچ‌گونه رشد باکتری مشاهده نشد و فاقد کدورت بود، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین شد. تمام مراحل برای ۴ سویه مورد بررسی با ۳ تکرار انجام شد.

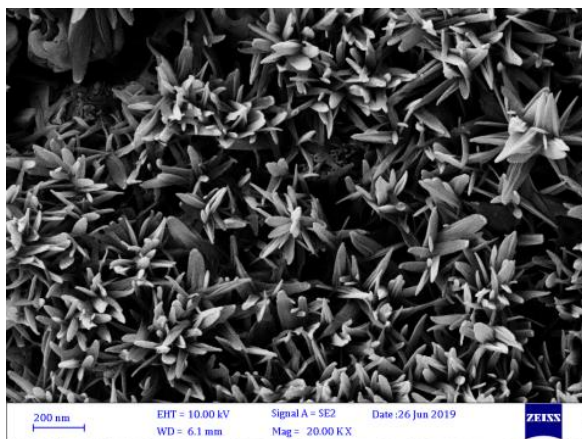
به منظور اثرات سلولی نانوذره سنتز شده رده‌های سلولی HT-29 و HEK-293 از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید و در محیط کشت DMEM غنی شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) (Gibco, Scotland) در دمای $37^{\circ}C$ تحت شرایط ۵ درصدی دی‌اکسیدکربن کشت داده شدند. در این مطالعه جهت بررسی میزان سمیت نانوذره اکسید روی بر رده‌های سلولی از روش MTT که یک روش رنگ‌سنجی است و بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زردرنگ تترازولیوم به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول انجام می‌شود، استفاده گردید. بدین جهت با شمارش سلولی با استفاده از تریپان بلو، حدود 5×10^4 سلول در هر چاهک کشت داده شد. بعد از کشت سلول‌ها پلیت ۹۶ خانه‌ای در انکوباتور $37^{\circ}C$ به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد تا ۶۰٪ سطح چاهک‌ها پر شوند. سپس به تهیه رقت‌های لگاریتمی ($31/25$ تا 1000) از محلول پرداخته شد. بعد از تهیه

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	پرایمرها	اندازه محصول
<i>p53</i>	forward: 5'-CATCTACAAGCAGTCACAGCACAT-3' reverse: 5'-CAACCTCAGGCGGCTCATAG-3'	194 bp
<i>Casp3</i>	forward: 5'- GCCTGCCGTGGTACAGAACT-3' reverse: 5'- GCACAAAGCGACTGGATGAAC-3'	179 bp
<i>GAPDH</i>	forward: 5'- CCCACTCCTCCACCTTTGAC-3' reverse: 5'- CATAACCAGGAAATGACTTGACA-3'	74 bp



شکل ۲. آنالیز FE-SEM مورفولوژی و اندازه نانوذرات توسط



میکروسکوپ الکترونی نگاره: نانوذرات اکسید روی سنتز شده با اجتماعات ستاره‌ای شکل یا گل مانند و اندازه بین ۳۵ تا ۹۵ نانومتر

در پروفایل EDS نانوذرات ZnO در شکل ۳ مربوط به بررسی عناصر تشکیل دهنده و خلوص محصول است. پیک‌های نشان داده شده بیانگر وجود تنها عناصر روی، اکسیژن و طلا در ساختار آن است که طلای به کار برده شده مربوط به آماده‌سازی نمونه برای آنالیز است. مقدار روی موجود در پودر سنتز شده

تجزیه و تحلیل داده‌ها مطابق مقایسه چرخه آستانه صورت گرفت و اختلاف چرخه آستانه به دست آمده از سلول‌های تیمار شده با نانوذره و سلول‌های تیمار نشده با نانوذره محاسبه گردید و با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$ نسبت ژن هدف به ژن مرجع از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مطابق با فرمول زیر محاسبه شد:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{refrence}}$$

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{test sample}} - \Delta Ct_{\text{control sampel}})$$

$$\text{Relative expression: } 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

داده‌های به دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و تست کولموگورف-اسمیرنوف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و محاسبه P با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد. همچنین، مقدار $P < 0.05$ در هر تست معنی‌دار در نظر گرفته شد.

در ادامه بررسی اثر آپتوتیک نانوذره اکسید روی سلول‌های سرطانی کولون (HT29)، این سلول‌ها با استفاده از روش Apoptosis AnnexinV/propidium iodide (PI) detection kit, Roch, Germany و دستگاه فلوسایتومتری (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) بر اساس دستور کار مربوطه مورد مطالعه قرار گرفتند. سلول‌های سرطانی کولون (1×10^5 سلول / چاهک) با غلظت IC50 به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده کولون به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت میزان سلول‌های نکروز / آپتوز شده توسط نرم‌افزار Cell Quest Pro (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) مورد آنالیز قرار گرفتند.

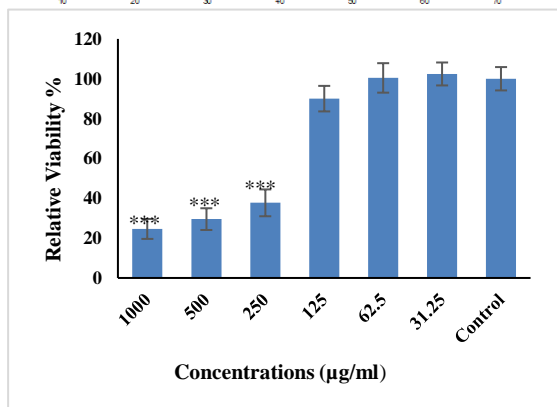
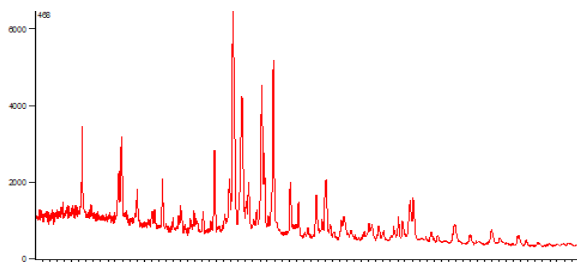
نتایج

مشاهده تغییر رنگ تدریجی محلول واکنش به زرد (شکل ۱)، اولین مرحله در تایید سنتز نانوذرات اکسید روی می‌باشد و در نهایت نانوذرات پس از سنتز شدن به شکل پودر سفید رنگی در آمد. در آنالیز FE-SEM نانوذرات در اجتماعات ستاره‌ای شکل یا گل‌مانند دیده شدند و اندازه بین ۳۵ تا ۹۵ نانومتر تعیین شد (شکل ۲).

شکل ۱. رنگ زرد محلول نشانه سنتز نانوذرات ZnO

غلظت $250 \mu\text{g/ml}$ با $P=0/000$ میزان کشندگی حدود 63% ، در غلظت $500 \mu\text{g/ml}$ با $P=0/000$ میزان کشندگی حدود 71% و در غلظت $1000 \mu\text{g/ml}$ با $P=0/000$ حدود 75% بوده است که از لحاظ آماری تفاوت معناداری را نشان می‌دهد. همچنین IC_{50} برابر $282/4 \mu\text{g/ml}$ محاسبه گردید.

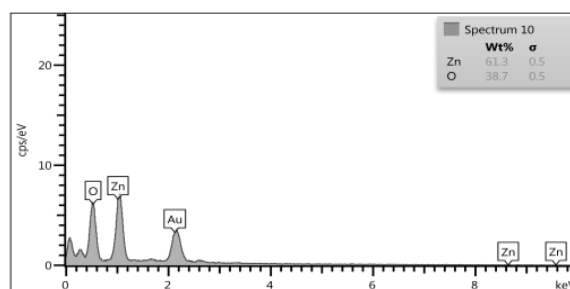
شکل ۵. آنالیز طیف پراش اشعه ایکس (XRD): دارای قله های محکم و واضح که نشان دهنده تبلور و خلوص بالا نانوذرات اکسید روی سنتز شده است.



شکل ۶. بررسی سمیت غلظت‌های متفاوت نانوذرات اکسید روی بر رده سلولی سرطانی HT-29 در تست MTT. داده‌ها به صورت میانگین درصد زنده ماندن \pm انحراف معیار بیان شده است. علامت *** نشان دهنده اختلاف معناداری با گروه کنترل با $P < 0/001$ است.

برای بررسی اثر سمیت غلظت‌های متفاوت نانوذره‌ی اکسید روی، رده سلولی نرمال HEK-293 تحت تیمار با غلظت‌های $24 \mu\text{g/ml}$ ، $31/25 \mu\text{g/ml}$ ، $62/5 \mu\text{g/ml}$ ، $125 \mu\text{g/ml}$ ، $250 \mu\text{g/ml}$ و $500 \mu\text{g/ml}$ به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. با توجه به شکل ۷ آنالیز نتایج MTT نشان داد که میزان کشندگی نانوذره اکسید روی در غلظت $500 \mu\text{g/ml}$ و $250 \mu\text{g/ml}$ کاهش پیدا کرده است به طوری که در غلظت $250 \mu\text{g/ml}$ با $P=0/0015$ میزان کشندگی حدود 32% ، در غلظت $500 \mu\text{g/ml}$ با $P=0/000$ میزان کشندگی حدود 61% بوده است. اما در غلظت $1000 \mu\text{g/ml}$ کشندگی حدود 75% بوده است.

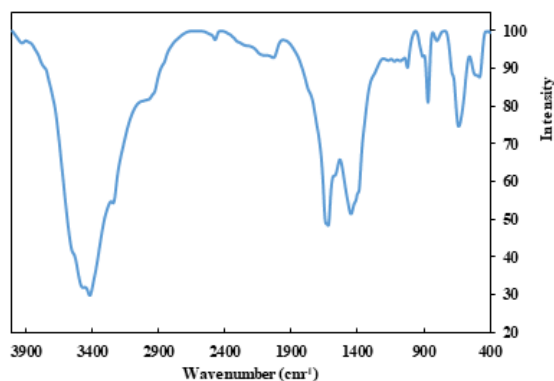
$61\%/3$ و اکسیژن $38\%/7$ است و تأیید می‌کند که نانوذرات سنتز شده خالص است و اثری از ناخالصی عناصر دیگر وجود ندارد.



شکل ۳. آنالیز EDS جهت بررسی عناصر تشکیل دهنده نانوذرات ZnO و خلوص محصول

در آنالیز طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) در محدوده‌های 400 تا 4000 cm^{-1} بررسی و تایید شد (شکل ۴).

شکل ۴. طیف FTIR: آنالیز طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) در محدوده‌های 400 تا 4000 cm^{-1} نانوذرات سنتز شده.

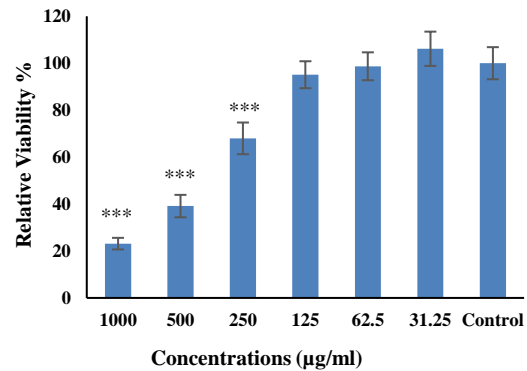
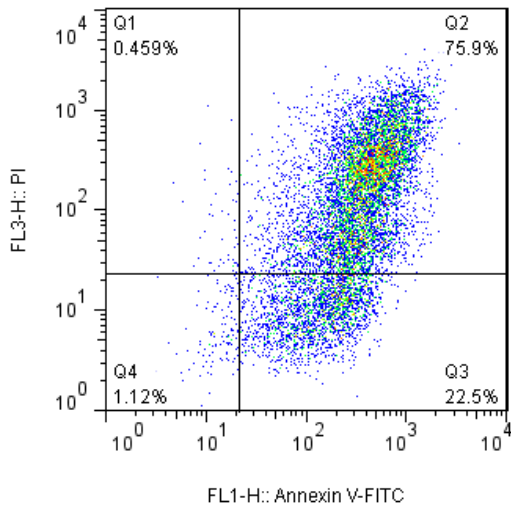


در آنالیز XRD الگوی پراش اشعه ایکس همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود نانوذرات به‌دست آمده دارای ساختار کریستالی تک فاز بوده و هیچ پیکی مربوط به ناخالصی مشاهده نمی‌گردد. طیف XRD دارای قله‌های $11/5$ ، $16/9$ ، $29/7$ ، $32/3$ ، $33/5$ ، 36 ، $37/8$ و 40 درجه 2θ است و به ترتیب، به صفحات بلوری 100 ، 002 ، 101 ، 102 ، 110 ، 103 ، 112 ، 201 و 004 چندوجهی نانوذره ZnO نسبت داده می‌شود و نشان‌دهنده این است که نانوذرات ZnO با تبلور و خلوص بالا تهیه شده‌اند و دارای قله‌های محکم و واضح هستند.

MIC نانوذرات اکسید روی برای باکتری‌های گرم منفی E. coli و P. aeruginos، $200 \mu\text{g/ml}$ و برای باکتری‌های گرم مثبت B. cereus و S. aureus، $100 \mu\text{g/ml}$ گزارش شد.

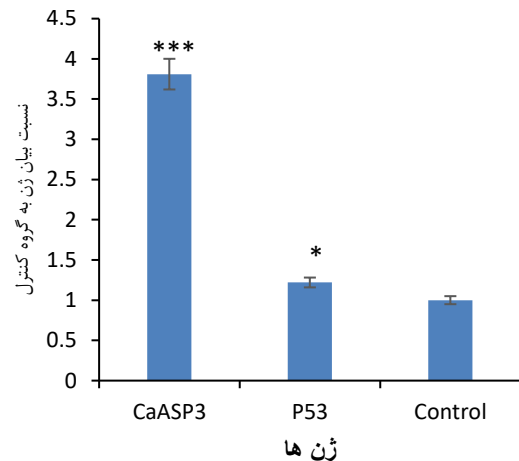
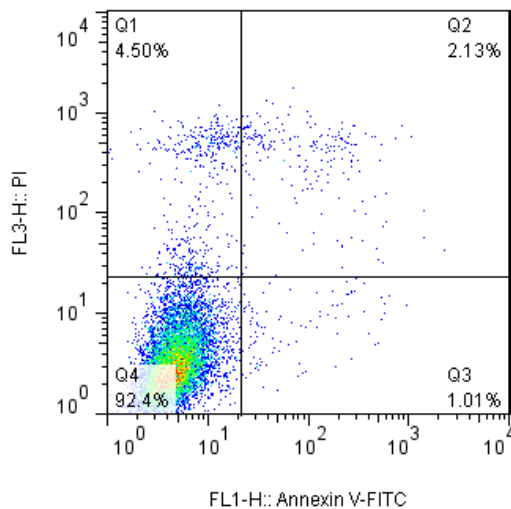
برای بررسی اثرات سلولی نانوذره اکسید روی، رده سلولی سرطانی HT-29 تحت تیمار با غلظت‌های ($31/25 \mu\text{g/ml}$ - $1000 \mu\text{g/ml}$) قرار گرفتند پس از گذشت ۲۴ ساعت با توجه به شکل ۶ مشخص است که غلظت $31/25 \mu\text{g/ml}$ ، $62/5 \mu\text{g/ml}$ و $125 \mu\text{g/ml}$ از نانوذره تأثیری روی بقای سلول‌های HT-29 ندارد اما

سلول‌ها دچار نکروز شده‌اند و تنها ۱٪ از سلول‌ها زنده مانده‌اند. این در حالی است که ۹۳٪ سلول‌های بدون تیمار زنده هستند و ۱٪ از این سلول‌ها دچار آپوپتوز اولیه و ۲٪ سلول‌ها آپوپتوز تاخیری و حدود ۴/۵٪ سلول‌ها هم دچار نکروز شده‌اند (شکل ۹).



شکل ۷. اثر سمیت غلظت‌های متفاوت نانوذرات اکسید روی بر رده سلولی نرمال HEK-293 در تست MTT. داده‌ها به صورت میانگین درصد زنده ماندن \pm انحراف معیار بیان شده است. علامت *** نشان دهنده اختلاف معناداری با گروه کنترل با $P < 0.001$ است.

سپس به منظور بررسی بیان ژن P53 و Casp3 از روش Real Time PCR استفاده شد که بیان ژن P53 نسبت به گروه کنترل به میزان ۱/۲۲ برابر و بیان ژن Casp3 به میزان ۳/۸۱ افزایش یافته است ($P < 0.05$) (شکل ۸).



شکل ۸. تغییر بیان ژن‌های P53 و Casp3 نسبت به گروه کنترل. داده‌ها به صورت میانگین درصد زنده ماندن \pm انحراف معیار بیان شده است. علامت * و *** نشان دهنده اختلاف معناداری با گروه کنترل به ترتیب با $P < 0.05$ و $P < 0.001$ است.

شکل ۹. میزان القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولون تیمار شده با دوز IC50 نانوذره (بالا) و گروه کنترل بدون تیمار (پائین).

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از فناوری نانو در تولید بسیاری از داروها یکی از حوزه‌های امیدوارکننده برای تشخیص و درمان مؤثر بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان است [۱۵، ۱۶]. نانوذرات از طریق فعال‌سازی مسیر تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن یا ROS باعث حذف سلول‌های توموری می‌شوند [۴، ۶].

روش سنتز سبز نسبت به روش‌های شیمیایی دارای مزیت‌هایی است که می‌توان به ساده، کم‌هزینه، غیرسمی، سازگار

به منظور تعیین میزان آپوپتوز القا شده در سلول‌های کولون تیمار شده با نانوذره، این سلول‌ها با FITC Annexin V/PI رنگ‌آمیزی شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری مطالعه شدند. در طی فاز اولیه آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین به خارج از غشا سلولی منتقل شده و توسط Annexin V رنگ می‌شود و رنگ PI به هسته سلول در زمان نکروز متصل می‌شود. بر اساس نتایج به دست آمده از فلوسایتومتری مشخص گردید که ۲۲/۵٪ از سلول‌های تیمار شده با نانوذره دچار آپوپتوز اولیه شده‌اند و ۷۶٪ هم دچار آپوپتوز تاخیری شده‌اند و کم‌تر از ۰/۵٪ این

داشت و بر روی باکتری‌های، *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus* اثر ضد میکروبی قابل توجهی داشت [۲۱]. اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی را می‌توان با مکانیسم‌های القای استرس اکسیداتیو به دلیل تولید رادیکال‌های اکسیژن فعال (ROS)، واکنش این رادیکال‌های اکسیژن فعال با DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها و در نتیجه مرگ سلولی، از بین رفتن آرایش غشا به دلیل تجمع نانوذرات در غشای باکتری و درون سلول و نیز آزاد شدن یون‌های روی ضمن اتصال به غشای میکروارگانیزم‌ها اشاره نمود [۲۲].

در پژوهش حاضر اثر توکسیسیتی نانوذرات اکسید روی سنتز شده از گیاه آویشن شیرازی علیه رده سلولی سرطانی کولون (HT-29) و نرمال HEK-293 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که این نانوذره دارای اثر توکسیک علیه رده سلولی سرطانی است و اثر توکسیکی کمی بر رده سلولی نرمال داشت. این در حالی است که این ویژگی یکی از مشخصه‌های اصلی داروهای ضد توموری باید باشد، به صورتی که این داروها باید تنها بر سلول‌های توموری اثرگذار باشند و بر سلول‌های نرمال این اثرات توکسیک اعمال نشود. به عبارتی نتایج نشان‌دهنده اثرات مهاری بیش‌تر نانوذرات بر روی سلول‌های سرطانی نسبت به سلول نرمال در یک دوز مشخص می‌باشد (دوزهای ۵۰۰ و ۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$). مطابق این نتایج، گزارش‌های مختلفی اثرات نانوذرات را در رده‌های سلولی مختلف بررسی کردند. در سال ۲۰۱۵ Selvakumari و همکارانش روی اثر ضد توموری نانوذرات اکسید روی با نام ZnO-NP مطالعه‌ای انجام دادند. در بخش از این بررسی روی رده‌ی سلولی MCF-7 به‌عنوان یک مدل سلولی سرطان پستان مطالعه‌ای انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد به‌کارگیری ۳۱/۲ میکروگرم از این نانوذره باعث مرگ ۵۰٪ از سلول‌های توموری شده است. این در حالی است که در این مطالعه مقدار IC50 برابر با ۲۸۲/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر شده است [۲۳]. Akhtar و همکارانش در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ بر روی خاصیت القاء آپوپتوزی نانوذرات اکسید روی بر علیه دو رده سرطانی کبد HepG2، و ریه A549 بررسی نمودند. نتایج بیان ژن‌ها در سطح mRNA و پروتئین P53 و Bax افزایش نشان داد و کاهش بیان Bcl-2 در رده سلولی سرطانی کبد HepG2 نشان داده شد [۶]. در تحقیق حاضر نیز افزایش بیان ژن P53 مشاهده گردید که به نوعی تاییدی بر توانایی القا آپاتوز در نانوذره اکسید روی می‌باشد. در مطالعه‌ی دیگری توسط Wahab R و همکاران، روی ZnO-NP ها بر روی رده‌های سلولی MCF-7 به‌عنوان رده‌ی سلولی سرطان پستان و رده‌ی سلولی HepG2 به‌عنوان

با محیط زیست و افزایش مقدار تولید جهت سنتزهای با میزان بالا اشاره نمود. گیاهان به نظر می‌رسد بهترین گزینه برای بیوسنتز نانوذرات هستند. نانوذرات تولید شده توسط گیاهان در مقایسه با دیگر عوامل باثبات‌تر و متنوع‌تر در شکل و اندازه هستند. عصاره برگ گیاهان که غنی از پلی‌فنیل‌هایی مانند فلاونوئیدها هستند، عوامل قدرتمندی برای احیاء در سنتز نانوذرات خواهند بود [۷، ۸]. در تحقیق حاضر از گیاه آویشن شیرازی برای اولین بار جهت سنتز نانوذرات اکسید روی استفاده شد. نانوذرات سنتز شده با اندازه بین ۳۵-۹۵ نانومتر و شکل نانوذرات صفحه‌ای به دست آمد که در تصویر میکروسکوپ الکترونی FE-SEM به صورت ستاره‌ای شکل با گل مانند تجمع یافته بودند. گرچه شکل نانوذرات اکسید روی سنتز شده در بیش‌تر مقالات کروی شکل گزارش شده است، اما عواملی چون غلظت عامل احیاکننده، فرایند واکنش، فرایند خنک‌سازی و تبلور می‌تواند اشکال متفاوتی از نانوذرات را ایجاد نماید که از موضوعات جالب در مطالعات نانومواد است [۱۷]. در مطالعه‌ای که توسط Fakhari و همکاران در سال ۲۰۱۹ برای سنتز سبز نانوذرات اکسید روی از عصاره آبی گیاه برگ بو (*Laurus nobilis*) صورت گرفت و نتایج پتانسیل *L. nobilis* را برای سنتز نانوذرات به روش ساده، سریع و دوست‌دار محیط زیست تایید کرد [۱۸]. Ghayempour و Montazer در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ سنتز درجا نانوذرات ستاره‌ای شکل اکسید روی از صمغ گیاه کتیرا بر روی پارچه نخی با امواج مافوق صوت را بررسی نمودند. در این پژوهش نانوذرات اکسید روی به‌عنوان نانوذرات ستاره مانند با اندازه متوسط ۵۵-۷۰ نانومتر سنتز شد [۱۹]. Ramimoghadam و همکارانش در سال ۲۰۱۳ سنتز هیدروترمال نانوذرات با استفاده از غلظت‌های مختلف عصاره برنج را انجام دادند. نتایج آن‌ها نشان دادند که مورفولوژی‌های مختلف نانوذرات اکسید روی، از جمله ساختارهای پوسته پوسته، گل رز و ستاره با اندازه ذراتی در محدوده میکرو و نانومتر قابل سنتز است [۲۰]. اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش میکروداپلوشن برات بررسی شد. بیش‌ترین اثر ضد میکروبی نانوذرات بر باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus* و *B. cereus* با MIC ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کم‌ترین اثر ضد میکروبی بر باکتری‌های گرم منفی *E. coli* و *P. aeruginosa* با MIC ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. تاکنون مطالعاتی در زمینه خواص ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی صورت گرفته است از جمله مطالعه Rafiee و همکاران با استفاده از استات روی و عصاره برگ گیاه *Eucalyptus melliodora* نانوذرات سنتز کردند که سایز نانوذرات در محدوده ۳۰ تا ۵۰ نانومتر قرار

تفاوت قابل ملاحظه در میزان سمیت نانوذرات بین سلول‌های سرطانی و نرمال در این مطالعه باشد.

مطالعات نشان می‌دهد که باکتری‌ها در طی عفونت و یا التهاب ناشی از آن‌ها و یا با تولید متابولیت‌های ثانویه منجر به تغییر بیان ژن‌های دخیل در سرطان کلون شده و با اختلال در سیکل سلولی باعث شروع، پیشرفت و توسعه سرطان کولورکتال می‌گردد [۲۸، ۲۹]. بنابراین ارزیابی اثر ضد میکروبی همراه با بررسی اثرات سایتوتوکسیک و آپاپتوتیک نانوذرات بسیار حائز اهمیت می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نانوذرات اکسید روی ضمن داشتن تاثیرات ضد میکروبی می‌توانند موجب کاهش ریسک ابتلا به سرطان کولورکتال شوند.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره گیاه آویشن شیرازی به عنوان یک گیاه بومی ایران، به دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه بالا و خواص آنتی‌اکسیدانی، می‌تواند در سنتز نانوذرات اکسید روی استفاده شود. یافته نشان داد که نانوذرات اکسید روی سنتز شده دارای اثرات ضد میکروبی و اثرات سمی و کشنده بر سلول‌های سرطانی کولورکتال می‌باشند و از آن جایی که نانوذرات اکسید روی بر مرگ رده سلولی HEK-293 اثر سمی کمی داشت می‌توان بیان کرد اثرات جانبی آن بسیار پایین می‌باشد. با توجه به این که بسیاری از داروها به علت این که سبب القاء نکروز در سلول می‌شود و دارای اثرات جانبی از جمله التهاب می‌باشند را نمی‌توان داروی مناسبی تلقی کرد. در حالی که نانوذرات اکسید روی سنتز شده در مطالعه حاضر سبب القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شده و از طرفی هم اثر توکسیکی بر سلول‌های نرمال ندارند، می‌توان از آن‌ها استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک، دانشگاه آزاد واحد ورامین-پیشوا می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان مقاله از کمک‌های سرکار خانم دکتر میرعلینقی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

مشارکت و نقش نویسندگان

معصومه مهدوی اورتاکنند و فهیمه باغبانی: ایده و طراحی مطالعه، بشری جهان پیمان ثابت: جمع آوری داده‌ها، معصومه مهدوی اورتاکنند و فهیمه باغبانی: آنالیز و تفسیر داده‌ها، بشری جهان پیمان ثابت: نگارش نسخه اول مقاله. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند.

رده سلولی کارسینوم کبد انجام شد. نتایج نشان داد غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از این نانو ذرات باعث القای مرگ سلولی می‌شود و سلول‌های زنده تا کم‌تر از ۱۰٪ کاهش می‌یابد همچنین نشان دادند که تیمار سلول‌های سرطانی با نانوذرات اکسید روی باعث افزایش ۳ برابری پروتئین P53 و افزایش بیان ژن‌های القاکننده آپوپتوز مانند Bax و Bad و کاهش ژن‌های ضد آپوپتوز Bcl-2 می‌شود [۲۴، ۲۵]. در تحقیق حاضر رده سلولی سرطان کولون (HT-29) مورد بررسی قرار گرفت و در غلظت IC50 تنها ۱٪ از سلول‌ها زنده ماندند که نشان‌دهنده القای آپوپتوز نانوذرات سنتز شده در رده سلولی HT-29 است اما افزایش بیان ژن P53 با تحقیق حاضر هم‌پوشانی دارد.

در مطالعه حاضر مقدار IC50 نانوذره اکسید روی در زمان ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی HT-29 کم‌تر از مقدار محاسبه شده IC50 در رده سلولی HEK-293 بود این نشان‌دهنده اثرات مهاری بیش‌تر نانوذرات اکسید روی بر روی سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال می‌باشد. همچنین بیان ژن‌های آپوپتوتیک P53 و Casp3 به ترتیب ۱/۲۲ و ۳/۸۱ برابر افزایش یافت که می‌توانست فرضیه اثر آپاپتوتیک نانوذره سنتز شده را تقویت کند. در ادامه نتایج بخش فلوسایتومتری، برای ارزیابی میزان آپوپتوز و نکروز القا شده توسط نانوذره، تاییدی دیگر بر این فرضیه بود. در مطالعه Boroumand Moghaddam و همکاران، نتایج فلوسایتومتری نشان داد که نانوذره اکسید روی ۶۸٪ آپوپتوز اولیه ۲۴٪ آپوپتوز تاخیری ایجاد می‌کند و حدود ۶٪ سلول‌ها زنده ماندند [۲۶]. در حالی که نانوذره سنتز شده در تحقیق حاضر سبب ۲۲/۵٪ آپوپتوز اولیه و ۷۶٪ آپوپتوز تاخیری ایجاد کرد و با توجه به تغییرات بیان ژن‌های درگیر در سلول‌های سرطانی تیمار شده با این نانوذره می‌توان گفت القای آپوپتوز یکی از مکانیسم‌های تأثیر نانوذرات سلول‌های سرطانی است و در کل بیانگر موثرتر بودن نانوذرات مطالعه حاضر و بهتر بودن روش سنتز این مطالعه است.

نتایج این مطالعه نشان داد نانوذرات سنتز شده در این مطالعه موجب کاهش بقای سلول‌های سرطانی شده اما اثر سمیت آن روی سلول نرمال کم‌تر است. که با توجه به این که محیط سلول‌های سرطانی اسیدی است (فعالیت سلول‌های سرطانی زیاد می‌باشد و عمدتاً گلایکولیز در آن شدید است و میزان بیش‌تری اسید در آن تولید می‌شود) و این اسیدی بودن محیط سلول‌های سرطانی باعث فعال شدن نانوذرات می‌شود و مرگ سلول‌های سرطانی را ایجاد می‌کند [۲۷]، بنابراین تأثیر بیش‌تر نانوذره در سلول سرطانی نسبت به نرمال قابل پیش‌بینی بود. تفاوت‌های ریخت‌شناسی بین غشاء سلول‌های سرطانی و طبیعی از لحاظ تفاوت اندازه منافذ می‌تواند عامل دیگری در

منابع

- [16] Yu MK, Park J, Jon S. Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Theranostics* 2012; 2: 3.
<https://doi.org/10.7150/thno.3463>
PMid:22272217 PMCID:PMC3263514
- [17] Li X L, Zhang F Q, Ma C, Deng Y, Wang ZF, Elingarami S, He NY. Controllable synthesis of ZnO with various morphologies by hydrothermal method. *J Nanosci Nanotechnol* 2012; 2: 2028- 2036.
<https://doi.org/10.1166/jnn.2012.5177>
PMid:22755016
- [18] Fakhari S, Jamzad M, Kabiri Fard H. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: a comparison. *Green Chem Lett Rev* 2019; 12: 19-24.
<https://doi.org/10.1080/17518253.2018.1547925>
- [19] Ghayempour S, Montazer M. Ultrasound irradiation based in-situ synthesis of star-like Tragacanth gum/zinc oxide nanoparticles on cotton fabric. *Ultrason Sonochem* 2017; 34: 458-465.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.019>
PMid:27773269
- [20] Ramimoghdam D, Hussein MZ, Taufiq-Yap YH. Hydrothermal synthesis of zinc oxide nanoparticles using rice as soft biotemplate. *Chem Cent J* 2013; 7: 136.
<https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-136>
PMid:23919386 PMCID:PMC3751658
- [21] Rafiee B, Ghani S, Sadeghi D, Ahsani M. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using eucalyptus mellidora leaf extract and evaluation of its antimicrobial effects. *J Babol Univ Med Sci* 2018; 20: 28-35. (Persian).
- [22] Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, de Aberasturi DJ, de Larramendi IR, Rojo T, et al. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol* 2012; 30: 499-511.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>
PMid:22884769
- [23] Selvakumari D, Deepa R, Mahalakshmi V, Subhashini P, Lakshminarayan N. Anti-cancer activity of ZnO nanoparticles on MCF7 (breast cancer cell) and A549 (lung cancer cell). *Asian Res Publish Net J Engin Appl Sci* 2015; 10: 5418-5421.
- [24] Wahab R, Kaushik NK, Kaushik N, Choi EH, Umar A, Dwivedi S, et al. ZnO nanoparticles induces cell death in malignant human T98G gliomas, KB and non-malignant HEK cells. *J Biomed Nanotechnol* 2013; 9: 1181-1189.
<https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1652>
PMid:23909132
- [25] Wahab R, Siddiqui MA, Saquib Q, Dwivedi S, Ahmad J, Musarrat J, et al. ZnO nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 and MCF-7 cancer cells and their antibacterial activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014; 117: 267-276.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.038>
PMid:24657613
- [26] Boroumand Moghaddam A, Moniri M, Azizi S, Abdul Rahim R, Bin Ariff A, Navaderi M, Mohamad R. Eco-friendly formulated zinc oxide nanoparticles: induction of cell cycle arrest and apoptosis in the MCF-7 cancer cell line. *Genes* 2017; 8: 281.
<https://doi.org/10.3390/genes8100281>
PMid:29053567 PMCID:PMC5664131
- [27] Sharifian A, Baghbani-Arani F, Sahebajami H. Effect of topotecan and zinc oxide nanoparticles combination on cytotoxicity and P53 gene expression against breast cancer (MCF-7) cell line. *Koomesh* 2020; 22: 192-197. (Persian).
<https://doi.org/10.29252/koomesh.22.1.192>
- [28] Dastjani farahani F, Mohammad Ganji S, Sohrabi M. Study of relationship between a strain of E.coli and colorectal cancer. *Iran J Med Microbiol* 2015; 9: 26-31. (Persian).
- [29] Jahani-Sherafat S, Azimirad M, Ghasemian-Safaei H, Amoli HA, Moghim S, Sherkat G, Zali MR. The effect of intestinal microbiota metabolites on HT29 cell line using MTT method in patients with colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2019; 12: S74.
- [1] Lizarbe MA, Calle-Espinoza J, Fernández-Lizarbe E, Fernández-Lizarbe S, Robles M.Á, Olmo N, Turnay J. Colorectal cancer: From the genetic model to posttranscriptional regulation by noncoding RNAs. *Biomed Res Int* 2017; 217: 7354260.
<https://doi.org/10.1155/2017/7354260>
PMid:28573140 PMCID:PMC5442347
- [2] García-Figueiras R, Baleato-González S, Padhani AR, Marhuenda A, Luna A, Alcalá L, et al. Advanced imaging of colorectal cancer: from anatomy to molecular imaging. *nsights Imaging* 2016; 7: 285-309.
<https://doi.org/10.1007/s13244-016-0465-x>
PMid:27136925 PMCID:PMC4877344
- [3] Prabhu V, Uzzaman S, Grace VM, Guruvayoorappan C. Nanoparticles in drug delivery and cancer therapy: the giant rats tail. *J Cancer Ther* 2011; 2: 325-334.
<https://doi.org/10.4236/jct.2011.23045>
- [4] Wahab R, Dwivedi S, Umar A, Singh S, Hwang IH, Shin HS, et al. ZnO nanoparticles induce oxidative stress in Cloudman S91 melanoma cancer cells. *J Biomed Nanotechnol* 2013; 9: 441-449.
<https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1593>
PMid:23621000
- [5] Abbai R, Mathiyalagan R, Markus J, Kim YJ, Wang C, Singh P, et al. Green synthesis of multifunctional silver and gold nanoparticles from the oriental herbal adaptogen: Siberian ginseng. *Int J Nanomed* 2016; 11: 3131.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S108549>
PMid:27468232 PMCID:PMC4946861
- [6] Akhtar MJ, Ahamed M, Kumar S, Khan MM, Ahmad J, Alrokayan SA. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *Int J Nanomed* 2012; 7: 845.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S29129>
PMid:22393286 PMCID:PMC3289443
- [7] Mahdavi-Ourtakand M, Jafari P, Safaeijavan R. Antibacterial activity of biosynthesized silver nanoparticles from fruit extracts of Bunium persicum Boiss. *Int J Bio Inorg Hybr Nanomater* 2017; 6: 245-251.
- [8] Behzad J, Sani AM. Antimicrobial effect of nanofluid including zinc oxide (ZnO) nanoparticle and trachyspermum copticum essential oils on food borne pathogens. *Biotechnol Ind J* 2016; 12: 1-9.
- [9] Mahboubi M, Bidgoli FG. Antistaphylococcal activity of Zataria multiflora essential oil and its synergy with vancomycin. *Phytomedicine* 2010; 17: 548-550.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.11.004>
PMid:20171067
- [10] Punjabi K, Choudhary P, Samant L, Mukherjee S, Vaidya S, Chowdhary A. Biosynthesis of nanoparticles: a review. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2015; 30: 219-226.
- [11] Khorasani N, Baharara J, Iranbaksh A, Ramezani T. Apoptotic effects of silver nanoparticles coated with Zataria multiflora leaves extract on HepG2 cell line. *KAUMS J (FEYZ)* 2016; 19: 457-467. (Persian).
- [12] Baharara J, Ramezani T, Divsalar A, Mousavi M, Seyedarabi A. Induction of apoptosis by green synthesized gold nanoparticles through activation of caspase-3 and 9 in human cervical cancer cells. *Avicenna J Med Biotechnol* 2016; 8: 75-83.
- [13] Dehghan R, Hosseinpour Feizi MA, Pouladi N, Babaei E, Montazeri V, Fakhrrjoo A. Association of P53 (-16ins-Pro) haplotype with the decreased risk of differentiated thyroid carcinoma in Iranian-Azeri patients. *Pathol Oncol Res* 2015; 21: 449-454.
<https://doi.org/10.1007/s12253-014-9846-y>
PMid:25410025
- [14] KhorshidiPachi M, Shokrzadeh M. Association between Caspase-3 gene polymorphysm G> A (rs4647603) and gastric adenocarcinoma in North of Iran. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2018; 27: 20-27. (Persian).
- [15] Shamsi F. Nanotechnology application in cancer treatment. *Koomesh* 2019; 21: 579-589. (Persian).

Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by *Zataria multiflora* extract and evaluation of its antimicrobial, cytotoxic and apoptotic effects on HT-29 cell line

Boshra Jahan peymay sabet (M.Sc)¹, Masoumeh Mahdavi-Ourtakand (Ph.D)^{*2}, Fahimeh Baghbani-Arani (Ph.D)¹
1- Dept. of Genetics and Biotechnology, School of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
2- Dept. of Biology, School of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

* Corresponding author. +98 21 36725011

masumehmahdavi@gmail.com

Received: 27 Apr 2021; Accepted: 31 Aug 2021

Introduction: Metal oxide nanoparticles have long been challenged as a candidate for cancer treatment. In the present study, for the first time, biosynthesis of zinc oxide nanoparticles was performed by *Zataria multiflora* extract and then their antimicrobial, cytotoxic and apoptotic effects on colon cancer cell lines were investigated.

Materials and Methods: The zinc oxide (ZnO) nanoparticles were biosynthesized using an aqueous extract of *Z. multiflora* shoots. The shape, size and structure of the synthesized nanoparticles were evaluated by EDS, XRD, FE-SEM and FTIR analysis. The antimicrobial effect of ZnO nanoparticles was investigated by the MIC method and their cytotoxic effects against two colorectal cancer cell lines HT-29 and normal HEK-293 were evaluated by the MTT method within 24 hours. The expression of p53 and Casp3 gene in cells treated with IC50 dose was then evaluated by Real-time PCR. Also, the type of cell death was determined by flow cytometry.

Results: Findings showed that ZnO nanoparticles were star-shaped and were synthesized with a size of 35-95 nm. MIC of ZnO nanoparticles was reported for the studied bacteria between 100-200 µg/ml. The results of MTT showed that the IC50 of nanoparticles was 282.4 µg/ml and in this concentration, the expression of p53 and Casp3 genes increased by 1.22 and 3.81 fold, respectively, which in terms of it was statistically significant. In addition, flow cytometry results showed an apoptosis rate of 76%.

Conclusion: ZnO nanoparticles synthesized through *Z. multiflora* plant extract showed antimicrobial effect and can be used as part of antitumor drug formulation.

Keywords: Zinc Oxide, Nanoparticles, Green Chemistry Technology, Colonic Neoplasms, Apoptosis, Plant Extracts.

