

## **Evaluation of antioxidant, antibacterial and anticancer effects of the Zinc oxide nanoparticles biosynthesized by *Amaranthus cruentus* L.**

**Behjati-Moghaddam M, Neamati A\*, Yousefi-Rad H**

Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I.R. Iran.

Received: 2019/05/26 | Accepted: 2020/05/2

### **Abstract:**

**Background:** Nanoparticles are effective in treating the cancer disease due to their antioxidant, Antibacterial and the ability to produce toxicity in the cancer cells. This study aimed to evaluation of cytotoxic, antioxidant and antibacterial effects of zinc oxide nanoparticles synthesized by *Amaranthus cruentus*.

**Materials and Methods:** This study was performed *in vitro*. The cytotoxic effects of biosynthesized ZnO nanoparticles were evaluated against the cancer cell line MDA-MB-231 and the normal cell line HUVEC by MTT assay. Also, antioxidant properties of these nanoparticles were evaluated by assays the DPPH and ABTS. Statistical analysis was performed by SPSS software and one way ANOVA. Antibacterial activity was also evaluated by the disc diffusion method on the gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and gram-negative *Pseudomonas aeruginosa*.

**Results:** The result of MTT assay showed that IC<sub>50</sub> was about 32 $\mu$ g/ml in 48 hours after treatment of the breast cancer cells by nanoparticles while the viability of the normal cell line was 94% in the similar concentration of nanoparticles. The results of the antioxidant test showed that nanoparticles at a concentration of 1000 $\mu$ g/ml were able to inhibit 50% of ABTS free radicals, but they exhibited a slight potential for DPPH free radicals inhibition. Also, they had an inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* growth.

**Conclusion:** The results showed that ZnO nanoparticles biosynthesized by *Amaranthus cruentus* can have antioxidant, antibacterial and anti- cancer activities.

**Keywords:** Zinc oxide, Nanoparticle, Antioxidant, Antibacterial, Anticancer, *Amaranthus cruentus*.

**\*Corresponding Author:**

**Email:** neamati.ali@gmail.com

**Tel:** 0098 915 504 6940

**Fax:** 0098 513 843 5050

Conflict of Interests: No

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2020; Vol. 24, No 2, Pages 133-141*

Please cite this article as: Behjati-Moghaddam M, Neamati A, Yousefi-Rad H. Evaluation of antioxidant, antibacterial and anticancer effects of the Zinc oxide nanoparticles biosynthesized by *Amaranthus cruentus* L. *Feyz* 2020; 24(2): 133-41.

# بررسی اثر آنتی اکسیدانی، آنتی باکتریایی و ضدسرطانی نانوذرات اکسید روی سنتز شده

## توسط گیاه تاج خروس *Amaranthus cruentus L.*

مهسا بهجتی مقدم<sup>۱</sup> ، علی نعمتی<sup>۲\*</sup> ، حبیله یوسفی راد<sup>۳</sup>

### خلاصه:

سابقه و هدف: نانوذرات بدليل خواص آنتی اکسیدانی، آنتی باکتریایی و توانایی ایجاد سمیت در سلول‌های سرطانی در درمان بیماری‌ها مؤثر هستند. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات سمیت سلولی، آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط گیاه تاج خروس *Amaranthus cruentus L.* می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی که به صورت *in vitro* انجام شد، به منظور بررسی اثر سمیت نانوذرات اکسید روی بر روی رده سلولی سرطان پستان MDA-MB-231 و نرمال HUVEC از آزمون MTT استفاده شد. خواص آنتی اکسیدانی این نانوذرات نیز به کمک آزمون‌های ABTS و DPPH مورد سنجش قرار گرفت. خاصیت آنتی باکتریایی نیز به کمک روش دیسک دیفیوژن بر روی باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و گرم منفی سودوموناس آنروژینوزا مشخص گردید. آنالیز آماری توسط نرم‌افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام شد.

نتایج: نتیجه آزمون MTT IC<sub>50</sub> را در ۴۸ ساعت بعد از تیمار نانوذره برای سلول سرطان سینه، حدود ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد. در حالی که در غلظت مشابه برای رده سلولی نرمال، میزان زیستی ۹۴ درصد بود. نتایج آزمون آنتی اکسیدانی نشان داد نانوذرات در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد ABTS هستند؛ اما توانایی کمی در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH دارند. همچنین این نانوذرات دارای اثر مهاری بر روی رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آنروژینوزا بودند.

نتیجه‌گیری: نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش سبز توسط گیاه *Amaranthus cruentus* دارای فعالیت آنتی اکسیدانی، آنتی باکتریایی و ضدسرطانی است.

واژگان کلیدی: نانوذره، اکسید روی، آنتی اکسیدان، آنتی باکتریایی، ضدسرطان، گیاه تاج خروس

دو ماهنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۹، صفحات ۱۴۱-۱۳۳

همچنین در خصوص فعالیت‌های ضدمیکروبی نانوذرات اکسید روی نیز در سال‌های اخیر گزارشاتی ارائه شده است [۳]. نانوذرات اکسید روی در درمان بیماری‌ها و سرطان‌های مختلف، از جمله سرطان سینه مورد استفاده قرار گرفته است. نانوذرات اکسید روی جهت تولید آپتامرهاز الیگونوکلوتیدی به عنوان حامل‌های دارویی و در تصویربرداری مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۴]. دانشمندان نشان داده‌اند که نانوذرات اکسید روی با آزاد کردن Zn<sup>2+</sup> سبب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و در نتیجه مرگ سلول‌ها می‌شوند [۵]. امروزه متداول‌ترین راه درمان سرطان، شیمی‌درمانی است که علی‌رغم همه پیشرفت‌های صورت گرفته در این زمینه، می‌تواند سرطان‌های ثانویه را به همراه داشته باشد. بنابراین محققان به دنبال یافتن راه‌هایی کم‌عارضه و در عین حال مؤثرتر هستند [۶] از میان روش‌های فیزیکی و شیمیایی با هزینه‌های بالا و استفاده از حلال‌های سمنی که باعث آلودگی‌های زیست محیطی می‌شوند [۷، ۸]. احیای زیستی فلزات، روشی سازگار با محیط زیست و غیرسمی است که می‌تواند برای تولید نانوذرات فلزی به روش سبز مورد استفاده قرار گیرد [۹]. گیاه تاج خروس دارای رنگدانه بتا-سیانین بوده، حاوی میزان زیادی آلفا-توکوفرول و

### مقدمه

در طول چند سال گذشته مواد زیستی و نانوساختارهای اکسید روی به دلیل طیف گسترده‌ای از کاربردها، بسیار مورد استفاده بوده است [۱]. از جمله خواص نانوذرات اکسید روی می‌توان به پایداری شیمیایی بالا، ثابت دی‌الکتریک پایین، فعالیت کاتالیزوری بالا، جذب نور مادون قرمز و فرابنفش و خاصیت ضدبакتری اشاره کرد که امکان حضور مؤثر این نانوذرات را در کاتالیزورها، نیمه‌رسانها و مواد عایق اشعه امکان‌پذیر کرده است [۲].

۱. کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۲. دانشیار فیزیولوژی، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۳. کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

\* لشان نویسنده مسئول؛

دانشگاه آزاد اسلامی مشهد دانشکده علوم گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۹۱۵۵۰۴۶۹۴۰، ۰۵۱۳۸۴۳۵۰۵۰

پست الکترونیک: neamati.ali@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۲/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۵

دستگاه اسپکتروفوتومتر، جذب نوری خوانده می‌شود و درصد سلول‌های زنده تعیین می‌گردد [۱۵]. در ابتدا برای هر رده سلولی، پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای تهیه شد و به هر یک از چاهک‌های پلیت، ۵۰۰۰ سلول اضافه گردید. شمارش سلول‌ها با استفاده از رنگ تریپان بلو و لام نتوبار انجام شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون و اطمینان از چسبندگی سلول‌ها به بستر پلیت، محیط تازه با غلظت‌های مختلف از نانوذره اکسید روی ۱۵/۶، ۳۱/۲، ۶۲/۵ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه گردید. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، به هریک از چاهک‌ها از محلول MTT اضافه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند و بعد از تخلیه رنگ به آن‌ها ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید. جذب در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Stat Fax 2100, Germany) خوانده شد و درصد زنده ماندن تکرار برای هر غلظت از نانوذره انجام گرفت و در آخر نمودار نتایج حاصل از آزمون MTT ترسیم شد که با کمک آن IC<sub>50</sub> (غلظتی از نانوذره اکسید روی سترشده توسط گیاه Amaranthus cruentus) که سبب کشته شدن ۵۰ درصد سلول‌ها می‌گردد) برای نانوذره بدست آمد.

بررسی اثر آنتی اکسیدانی نانوذرات اکسید روی در حذف رادیکال‌های DPPH

آزمون DPPH (Merck, Germany) به منظور بررسی ویژگی‌های آنتی اکسیدانی ترکیبات مختلف استفاده می‌شود. DPPH در اتانول به فرم رادیکالی خود درمی‌آید که در طول موج ۵۱۷ نانومتر، پیشترین مقدار جذب را دارد. این رادیکال با ماده آنتی اکسیدان و اکتش می‌دهد و حذف می‌گردد. بنابراین جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر کاهش می‌یابد و رنگ محلول از ارغوانی به زرد تغییر می‌کند. با توجه به این موضوع می‌توان قدرت آنتی اکسیدانی ماده موردنظر را بررسی کرد [۱۶]. برای تهیه محلول رادیکال DPPH، ۱ میلی‌گرم DPPH در ۱۶/۹ میلی‌لیتر اتانول حل شد. غلظت‌های مختلف (۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ و ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوذره تهیه و با نسبت مساوی از محلول DPPH مخلوط گردید. این محلول به مدت ۱۰ ثانیه با ورتكس کاملاً مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی قرار گرفت. سپس جذب آن در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این تست از بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA) (Merck, Germany) به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی در مقایسه با فعالیت نانوذره اکسید روی استفاده گردید. این

عناصر معدنی مهم است [۱۰]. همچنین به دلیل وجود مقادیر فراوان آنتوسباین‌ها، ویتامین‌ها و فلاونوئیدها، این گیاه قادر به ختنی‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌باشد [۱۱، ۱۲]. تمام این ترکیبات باعث احیای یون‌های فلزی و تبدیل آن‌ها به اتم‌های فلزی در ابعاد نانومتری می‌شوند که منجر به تولید مقادیر فراوانی نانوذره می‌گردد. موادی که مانع از تشکیل رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها می‌شوند، آنتی اکسیدان نام دارند [۱۳، ۱۴]. عدم حضور آنتی اکسیدان به میزان کافی باعث بر هم خوردن تعادل بین رادیکال‌های آزاد و گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن با آنتی اکسیدان می‌شود؛ در نتیجه رادیکال‌های آزاد به سلول‌های سالم آسیب رسانده، سبب ایجاد بیماری می‌گردد. آنتی اکسیدان‌ها نقش مهمی در پیشگیری از سرطان دارند [۱۴]. هدف از این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۶ و در دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام شد، بررسی اثر آنتی اکسیدانی، آنتی باکتریایی و ضدسرطانی نانوذرات اکسید روی سنترزشده توسط گیاه تاج خروس بر رده سلولی سرطان سینه (MDA-MB-231) و نرمال اندوتیال بند ناف جنبی (HUVEC) بود.

## مواد و روش‌ها

کشت سلول و بررسی سمیت سلولی

در کلیه مراحل آزمایش، معیارهای اخلاقی پژوهش رعایت و کد اخلاق به شماره IR.IAU.MSHD.REC. ۱۳۹۷.۰۷۳ از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی مشهد اخذ شده است. برای انجام این مطالعه پژوهشی، رده سلولی سرطانی MDA-MB-231 و نرمال HUVEC از مرکز تحقیقات بوعلی مشهد تهیه شد. سلول‌های MDA-MB-231 در محیط کشت کامل ۱۰ درصد DMEM (Sigma, France) و سلول‌های Sigma در محیط کشت کامل ۱۰ درصد RPMI (Gibco, USA) FBS (France) ۱۰ml حاوی ۱ml آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین (Sigma, France) درون فلاسک‌های T25 مخصوص کشت سلولی کشت داده شدند و در CO<sub>2</sub> دار (دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۸۰ درصد، فشار کربن دی‌اکسید ۵ درصد) نگهداری گردیدند. به منظور بررسی اثر سمیت نانوذرات اکسید روی از تست MTT استفاده شد. در سلول‌های زنده، بلورهای T25 استریلیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی احیا و کریستال‌های فورمازان تشکیل می‌شوند. این کریستال‌های آبی‌رنگ تنها در حالات اآلی مثل ایزوپروپانول و DMSO (Merck, Germany) قابل حل شدن هستند که با استفاده از

فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی تولید شده توسط عصاره آبی گیاه *Amaranthus cruentus L.* در برابر باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا (*P. aeruginosa*) و باکتری گرم مثبت استافیلوكوکوس اورئوس (*S. aureus*) با استفاده از روش انتشار دیسکی در محیط مولر هیتون آگار در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه سوسپانسیون خالص از باکتری یک کلنی تکمیکروبی برداشته، داخل لوله حاوی نوترینت براث استریل حل شد. کدورت محلول با کدورت سوسپانسیون نیم مک فارلند یکسان گردید. سوسپانسیون باکتریابی بر روی محیط مولر هیتون آگار، کشت یکنواخت داده شد و برای رشد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. دیسکها با غلظت ۲ میکرو گرم بر میلی لیتر از نانوذره تهیه و با فاصله استاندارد بر روی سطح محیط کشت قرار داده شد. پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط هوایی به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. بعد از این مدت قطر هاله عدم رشد حاصل بر حسب میلی متر با استفاده از خط کش اندازه گیری شد [۱۹]. جهت تأیید آزمایش های حساسیت آنتی بیوتیکی، از دیسک آنتی بیوتیکی جتاما بیسین (به عنوان شاهد) استفاده گردید.

#### روش آنالیز آماری داده ها

برای محاسبه درصد زیستایی سلول های HUVEC و MDA-MB-231 و فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط گیاه *Amaranthus cruentus L.* و بررسی وجود اختلاف معنی دار در یافته ها، از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) استفاده و سطح اطمینان ۰/۰۵ برای محاسبات در نظر گرفته شد.

#### نتایج

##### نتایج حاصل از آزمون MTT

یافته های حاصل از آزمون MTT بر رده های MDA-MB-231 و HUVEC نشان داد که زیستایی سلول ها بسته به غلظت نانوذرات بوده است؛ به طوری که در ۴۸ ساعت پس از تیمار در دوز های بالای این نانوذره، درصد بقای سلول های سرطانی به شدت کاهش یافت.  $IC_{50}$  در ۴۸ ساعت برای سلول های سرطانی حدود ۳۲ میکرو گرم بر میلی لیتر گزارش شد؛ در حالی که سلول های نرمال نسبت به سلول های سرطانی درصد زیستایی بالاتری را نشان دادند. نتایج حاصل مشخص کرد که این نانوذرات قادر هستند سلول های سرطانی را در مقایسه با سلول های نرمال با قدرت بیشتری مهار کنند (نمودار شماره ۱).

آزمایش در سه نوبت انجام گرفت و برای محاسبه درصد مهار رادیکال DPPH از فرمول زیر استفاده شد.

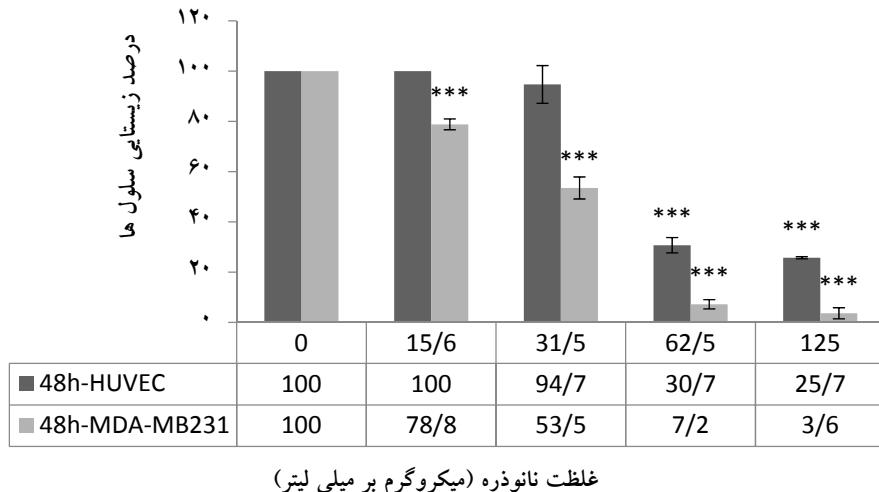
$$\text{DPPH} = \frac{(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}})/A_{\text{Control}}}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

$A_{\text{Control}}$ : جذب محلول شاهد و  $A_{\text{Sample}}$ : جذب محلول نمونه بررسی اثر آنتی اکسیدانی نانوذرات اکسید روی در حذف رادیکال های ABTS

ترکیب شیمیابی ABTS (Merck, Germany) به طور معمول جهت مشاهده واکنش های سینتیکی آنزیم های خاص، تشخیص اتصالات مولکولی و آنزیمی و تکنیک الایزا مورد استفاده قرار می گیرد. علاوه بر این می توان از این ترکیب جهت بررسی فعالیت های آنتی اکسیدانی ترکیبات مختلف نیز بهره جست [۱۷]. اساس این روش بدین صورت است که در ابتدا با استفاده رادیکال های ABTS تولید گردند و سپس در یک دوره زمانی، با افزودن نمونه حاوی نانوذره، کاهش جذب محلول ثبت شود. این آزمایش، بر اساس روش Li و همکاران انجام شد [۱۸]. برای تهیی محلول رادیکال ABTS، ۲ میلی لیتر ۷ میلی مولار و ۱ میلی لیتر پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی مولار با یکدیگر مخلوط گردید و به مدت ۱۶ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از آن با افزودن آب تا رسیدن به جذب ۰/۷۵۶ در طول موج ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. سپس محلول رقیق شده رادیکال ABTS به نسبت مساوی با محلول نانوذره اکسید روی تولید شده در غلظت های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۲۵ میکرو گرم بر میلی لیتر) مخلوط شد و پس از انکوباسیون به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد، جذب محلول در طول موج ۷۳۴ نانومتر ارزیابی گردید. ترکیبی که به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت، ترکیب گلوتاتیون احیا (GSH) (Merck, Germany) و محلول شاهد به جای نانوذره محتوى آب مقطر بود. این آزمایش در سه نوبت انجام شد و درصد فعالیت حذف رادیکال از رابطه زیر به دست آمد:

$$\text{ABTS} = \frac{(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}})/A_{\text{Control}}}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

$A_{\text{Control}}$ : جذب محلول شاهد و  $A_{\text{Sample}}$ : جذب محلول نمونه  $IC_{50}$  (مقداری از آنتی اکسیدان که قادر است غلظت ABTS را به ۵۰ درصد غلظت اویله بر ساند) گزارش شد. اثرات آنتی باکتریابی نانوذره اکسید روی بر باکتری های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوكوکوس اورئوس

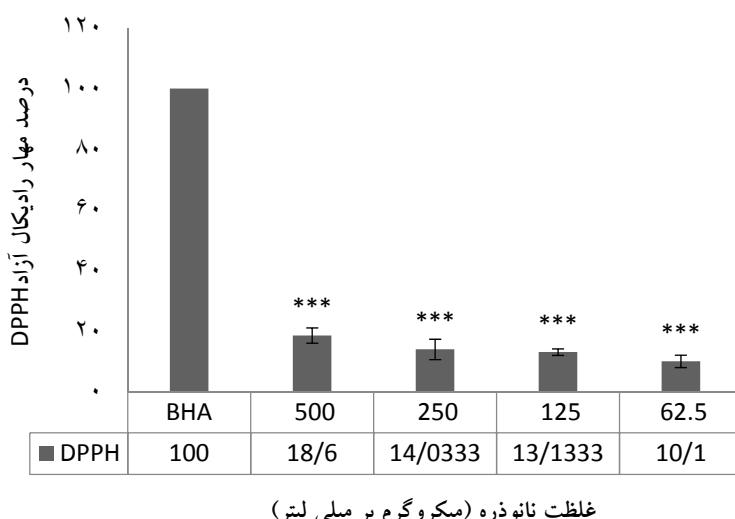


نمودار شماره ۱- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی سنتزشده به روش سبز توسط گیاه *Amaranthus Cruentus L.* در مدت زمان ۴۸ ساعت بر سلول‌های سرطانی HUVEC و نرمال MDA-MB-231 نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر). (\*\*: \*\*\*:  $P < 0.001$ )

به عنوان کنترل مثبت قشان می‌دهد. با توجه به این نمودار، در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذره اکسید روی تنها قادر به مهار ۱۸ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH نسبت به گروه کنترل بوده و توانایی کمی در مهار مولکول‌های آزاد DPPH از خود نشان داده است.

#### نتایج حاصل از آزمون DPPH

شکل شماره ۲ فعالیت جذب رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف (۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ و ۶۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر) از نانوذره اکسید روی سنتزشده توسط گیاه BHA را در مقایسه با محلول *Amaranthus cruentus L.*



نمودار شماره ۲- درصد مهار رادیکال DPPH توسط غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی سنتزشده توسط گیاه *Amaranthus cruentus* در مقایسه با BHA به عنوان کنترل. (\*\*: \*\*\*:  $P < 0.001$ )

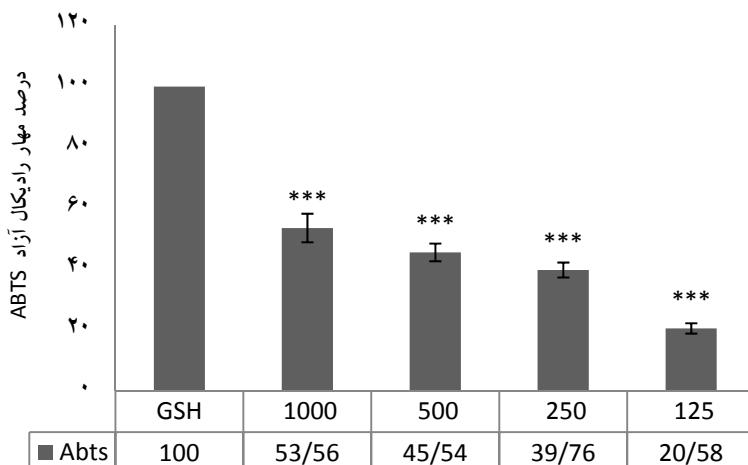
طی این آزمون  $IC_{50}$  حدود ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شد که نشان‌دهنده مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد ABTS در این غلظت است. با مقایسه نتایج بدست آمده از درصد مهار رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH توسط نانوذرات اکسید

#### نتایج حاصل از آزمون ABTS

نتایج میزان مهار رادیکال آزاد ABTS در غلظت‌های مختلف (۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر) از نانوذرات اکسید روی سنتزشده در مقایسه با محلول GSH به عنوان کنترل مثبت در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. در

ABTS موفق تر عمل می کنند.

روی، مشخص گردید این نانوذرات در مهار رادیکالهای آزاد



غلظت نانوذره (میکروگرم بر میلی لیتر)

نمودار شماره ۳- درصد مهار رادیکال آزاد ABTS توسط غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی سنتزشده توسط گیاه *Amaranthus cruentus* در مقایسه با GSH به عنوان کنترل. ( $P < 0.001$ ; \*\*\*).

سودوموناس آنروژینوزا دارای اثر مهاری است؛ به گونه‌ای که قطر هاله عدم رشد برای باکتری استافیلیوکوکوس اورئوس ۱۲ میلی‌متر و برای باکتری سودوموناس آنروژینوزا ۱۰ میلی‌متر گزارش شد.

نتایج حاصل از آزمون آنتی‌باکتریایی

نتایج حاصل از بررسی آزمون ضدبакتریایی به روش دیسک دیفیوژن نشان داد که نانوذرات اکسید روی سنتزشده بر روی باکتری گرم مثبت استافیلیوکوکوس اورئوس و گرم منفی

جدول شماره ۱- میزان اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد برای نمونه شاهد و نانوذرات اکسید روی سنتزشده توسط گیاه *Amaranthus cruentus L*

نمونه (نانوذره)	شاهد (آنتی‌بیوتیک جنتامایسین)	باکتری	هاله عدم رشد (میلی‌متر)
۱۲	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 1047)		۲۱
۱۰	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 1112)		۲۶
۱۲	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 1047)		۱۰
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 1112)		۱۲

حدود ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش گردید. در حالی که در غلظت مشابه برای رده سلولی نرمال میزان زیستایی ۹۴ درصد بود که نشان‌دهنده مهار مؤثر سلول‌های سرطانی توسط نانوذرات اکسید روی سنتزشده است. در مطالعه‌ای مشابه نانوذرات اکسید روی به روش سبز از عصاره گیاه *Tradescantia pallida* تولید شد و اثر سمیت آن بر روی رده سلولی HeLa مورد مطالعه قرار گرفت. نانوذرات در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث از بین رفتن ۹۸/۹ درصد سلول‌ها شدند و میزان IC<sub>50</sub> پس از گذشت ۴۸ ساعت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد [۲۰]. در مطالعه‌ای دیگر سمیت سلولی ناشی از نانوذرات اکسید روی سنتزشده به روش شیمیایی در غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سلول‌های اپیتلیال آدنوکارسینوما

## بحث

در سال‌های اخیر و با پیشرفت نانوتکنولوژی، استفاده از ظرفیت‌های زیستی، شرایط را برای ساخت انواع نانوذرات با کارایی بهتر و در حجم بیشتر مهیا کرده است. در تحقیقاتی فراوانی که بر روی نانوذرات گوناگون از جمله نانوذرات اکسید روی صورت گرفته است، تأثیرات آنتی‌اکسیدانی، ضدانگلکلی، ضدقارچی، ضدبакتریایی و سیتو توکسیسیته این نانوذرات بررسی شده است. در این مطالعه به منظور بررسی سمیت سلولی القاشهه توسط نانوذرات اکسید روی سنتزشده به روش سبز توسط گیاه MDA بر روی رده سلولی سرطانی- *Amaranthus Cruentus* MB-231 و نرمال HUVEC با استفاده از آزمون MTT انجام شد و IC<sub>50</sub> در ۴۸ ساعت بعد از تیمار برای سلول سرطان سینه

سلولی نانوذرات اکسید روی سنتزشده به روش‌های مختلف شیمیایی و زیستی را در انواع سلول‌های سرطانی نشان می‌دهد. در اکثر مطالعات انجام شده برای بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی از روش‌های ABTS و DPPH استفاده شده است. هر دوی این روش‌ها براساس انتقال الکترون و کاهش رادیکال آزاد می‌باشند که با تغییر رنگ اندازه‌گیری می‌شوند [۲۵]. در این مطالعه نیز توانایی نانوذرات اکسید روی در مهار و حذف رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH مورد سنجش قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که این نانوذرات در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد ABTS نسبت به ترکیب GSH با غلظت مشابه هستند. این نانوذرات توانایی کمی در مهار مولکول‌های آزاد DPPH از خود نشان دادند؛ به طوری که در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذرات اکسید روی، ۱۸ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH نسبت به گروه کنترل مهار شدند. در مطالعه‌ای نانوذرات اکسید روی با سایز تقریبی بین ۵ تا ۱۵ نانومتر از عصاره برگ گیاه *Cassia fistula L.* سنتز شد و بررسی فعالت آنتی اکسیدانی این نانوذرات نشان داد که در غلظت ۵۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH هستند [۲۶]. در تحقیقی که به بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات اکسید روی تولیدشده با استفاده از عصاره ریشه گیاه *Polygala tenuifolia* پرداخته بود، به کمک آزمون DPPH نشان داد که نانوذرات اکسید روی دارای قدرت مهار ۴۷ درصد DPPH در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هستند [۲۷]. در تحقیقی مشابه فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات اکسید روی استخراج شده از میوه گریپ‌فروت *Citrus paradise* در اندازه ۱۲–۷۲ نانومتر، به کمک آزمون DPPH نشان داد که درصد مهار رادیکالی در غلظت‌های ۰/۳ تا ۱/۵ میلی‌مولاًر با افزایش غلظت نانوذرات افزایش یافته است؛ به طوری که در ۱/۵ میلی‌مولاًر ۸۰ درصد از رادیکال‌های DPPH مهار شدند [۲۸]. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی، فعالیت آنتی اکسیدانی روند افزایشی داشته است. در همین راستا مطالعات ذکر شده نیز تأثیرات مشابهی از عملکرد نانوذرات تولیدشده به روش سبز با استفاده از عصاره‌های گیاهی را نشان می‌دهند. به دلیل سوء‌صرف داروهای آنتی‌بیوتیکی، معضل مقاومت دارویی پدید آمده است که نانو‌تکنولوژی در تلاش است تا با معرفی نانوذرات ضد‌میکروبی جدید گامی در حل این مشکل بردارد [۲۹]. در مطالعه حاضر بررسی آزمون آنتی‌باکتریایی به روش دیسک دیفیوژن نشان داد که نانوذره اکسید روی سنتزشده بر روی باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئتوس و گرم منفی

کلورکتال (Caco-2) از طریق آزمون MTT در ۲۴، ۱۲ و ۶ ساعت اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد غلظت‌های بالای نانوذرات و زمان بیشتر انکوباسیون، سمیت سلولی بیشتری را ایجاد می‌کند [۲۱]. در یک تحقیق نانوذرات اکسید روی در اندازه بین ۹۰ تا ۲۰۰ نانومتر با روش تهشیبی بخار - جامد سنتز شدند و برای بررسی بقای سلول‌های نوروبلاست (SH-sy5y) تیمارشده با MTT استفاده شد. نتایج حاکی از آن بود که در سلول‌های SH-sy5y بیشترین سمیت سلولی در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر یعنی بالاترین غلظت نانوذره مشاهده شد. این تحقیق نشان داد که نانوذرات اکسید روی باعث القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی می‌شوند [۲۲]. در مطالعه‌ی دیگری اثر نانوذرات اکسید روی بر سلول‌های سرطانی کبد انسان (HepG<sub>2</sub>) و سرطان پستان (MCF-7) مورد بررسی قرار گرفت. نانوذرات اکسید روی با اندازه‌های حدود ۱۳±۲ نانومتر از طریق شیمیایی غیرپروتونه با استفاده از زینک استات دی‌هیدراته و P-Xylene سنتز شد. نتایج آزمون MTT در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار با غلظت‌های مختلف (۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از نانوذرات، کاهش بقا را در هر دو نوع سلول به صورت واپسی به غلظت نشان داد. همچنین در سلول‌های HepG<sub>2</sub> به کمک تکنیک PCR نشان داده شد که سطوح mRNA ژن سرکوب‌کننده آپوپتوز p53 ۱/۹ فولد بیشتر شده، بیان ژن پیش‌برنده آپوپتوز Bax افزایش می‌یابد. علاوه‌بر این بیان ژن ضد‌آپوپتوزی Bcl-2 کاهش داشته و سطح mRNA کاسپاز-۳ ۱/۸ فولد نسبت به سلول‌های کنترل افزایش یافته است [۲۳]. در تحقیقی مشابه سمیت القاشه توسط نانوذرات اکسید روی سنتزشده با استفاده از عصاره آبی جلبک دریایی قهوه‌ای *Sargassum muticum* بر روی سلول‌های سرطانی موش بررسی شد. تیمار سلول‌های سرطانی با نانوذرات اکسید روی به مدت ۷۲ ساعت و محاسبه IC<sub>50</sub> درجات مختلفی از سمیت سلولی را نشان داد. نتایج MTT روش IC<sub>50</sub> به شرح زیر است: ۲۱/۱±۷/۳ میکروگرم/میلی‌لیتر (4T1)، ۱۱/۷۵±۰/۸ میکروگرم/میلی‌لیتر (CRL-1451)، ۱۷/۴۵±۱/۱ میکروگرم/میلی‌لیتر (CT-26) و ۵/۰±۶/۵۵ میکروگرم/میلی‌لیتر (WEHI-3B). از طرف دیگر، نانوذرات اکسید روی علیه رده سلولی نرم‌مال فیربول بلاست موش (3T3) سمیتی اعمال نکردند. در این تحقیق تغییرات مورفو‌ولوژیک سلول‌ها نیز با کمک رنگ‌های فلورسنت بررسی گردید و نتایج حاصل از فلورسیتومتری نشان داد جمعیت سلول‌هایی که چهار آپوپتوز شده‌اند، افزایش یافته است [۲۴]. مقایسه تمامی مطالعات بالا و مطالعه حاضر ویژگی سمیت

حاکی از اثرات مهاری چشمگیر نانوذرات اکسید روی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد مطالعه بود [۳۱]. نتایج حاصل از این تحقیق همانند مطالعات ذکر شده توانایی نانوذرات اکسید روی را در مهار باکتری‌ها نشان داد. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد نانوذرات اکسید روی سنترالیزه به روش سبز از گیاه *Amaranthus cruentus* دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریالی و ضدسرطانی بوده، می‌تواند پس از مطالعات تکمیلی در مورد کاربردهای آن در زیست‌پژوهشی، به عنوان گزینه‌ای در درمان سرطان و بسیاری از بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد خانم مهسا بهجهتی مقدم می‌باشد. بدین‌وسیله نویسنده‌گان مقاله از کارکنان گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد کمال تشکر و قدردانی را دارند.

### References:

- [1] Anbuvannan M, Ramesh M, Manikandan E, Srinivasan R. Vitex negundo leaf extract mediated synthesis of ZnO nanoplates and its antibacterial and photocatalytic activities. *AJNM* 2019; 2(1, pp. 1-119.): 99-110.
- [2] Hong R, Li J, Chen L, Liu D, Li H, Zheng Y, et al. Synthesis, surface modification and photocatalytic property of ZnO nanoparticles. *Powder Technol* 2009; 189(3): 426-32.
- [3] Yadav A, Prasad V, Kathe A, Raj S, Yadav D, Sundaramoorthy C, et al. Functional finishing in cotton fabrics using zinc oxide nanoparticles. *B MATER SCI* 2006; 29(6): 641-5.
- [4] Salehzadeh M, Norouzian P, Abbasalipourkabir R. The use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer: A review. *PSJ* 2015; 13(2): 1-12. [in Persian]
- [5] Badkoobeh P, Parivar K, Kalantar SM, Hosseini SD, Salabat A. Effect of nano-zinc oxide on doxorubicin-induced oxidative stress and sperm disorders in adult male Wistar rats. *IJRM* 2013; 11(5) :355. [in Persian]
- [6] Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-Cancer Agent ME* (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents). 2007; 7(1): 3-18.
- [7] Korbekandi H, Iravani S, Abbasi S. Production of nanoparticles using organisms. *Crit Rev Biotechnol* 2009; 29(4): 279-306. [in Persian]
- [8] Chandran SP, Chaudhary M, Pasricha R, Ahmad A, Sastry M. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Alo evera plant extract. *Biotechnol Progr* 2006; 22(2): 577-83.
- [9] Soni N, Prakash S. Fungal-mediated nano silver: an effective adulticide against mosquito. *Parasitol Res*. 2012; 111(5): 2091-8.
- [10] Mburu M, Gikonyo N, Kenji G, Mwasaru A. Nutritional and functional properties of a complementary food based on Kenyan amaranth grain (*Amaranthus cruentus*). *Ajfand* 2012; 12(2): 5959-77.
- [11] Gorinstein S, Vargas OJM, Jaramillo NO, Salas IA, Ayala ALM, Arancibia-Avila P, et al. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *Eur Food Res Technol* 2007; 225(3-4): 321-8.
- [12] Paško P, Bartoń H, Fołta M, Gwiżdż J. Evaluation of antioxidant activity of amaranth (*Amaranthus cruentus*) grain and by-products (flour, popping, cereal). *Rocz Panstw Zakl Hig* 2007; 58: 35-40.
- [13] Rao C, Kulkarni G, Thomas PJ, Edwards PP. Size dependent chemistry: properties of nanocrystals. *Chem-Eur J* 2002; 8(1): 28-35.
- [14] Kizhakekutty TJ, Widlansky ME. Natural antioxidants and hypertension: promise and challenges. *Cardiovasc Ther* 2010; 28(4): e20-e32.
- [15] Ho WY, Yeap SK, Ho CL, Rahim RA, Alitheen NB. Development of multicellular tumor spheroid (MCTS) culture from breast cancer cell and a high throughput screening method using the MTT assay. *PloS One* 2012; 7(9): e44640.

سودوموناس آنروژینوزا دارای اثر مهاری است و قطر هاله عدم رشد برای باکتری استافیلکوکوس اورئوس ۱۲ میلی‌متر و برای باکتری سودوموناس آنروژینوزا ۱۰ میلی‌متر گزارش شد. در تحقیقی توانایی ضدباکتریالی نانوذرات اکسید روی، در مقایسه با پودر اکسید روی معمولی مورد بررسی قرار گرفت. سالمونلا تایپی موریوم و استافیلکوکوس اورئوس در معرض نانوذرات و پودر اکسید روی قرار داده شدند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از باکتری‌های تحت تیمار با نانوذرات اکسید روی نشان داد که اثر مخرب این نانوذرات در استافیلکوکوس اورئوس بسیار شدید بود؛ به طوری که تمام سلول‌های تیمار شده پس از ۴ ساعت به طور کامل از بین رفتند یا لیز شدند [۳۰]. در مطالعه‌ای مشابه اثرات ضدباکتریالی نانوذرات اکسید روی تولیدشده از چای سبز به روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات در باکتری گرم مثبت استافیلکوکوس اورئوس و باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکلی، سودوموناس آنروژینوزا و کلیسیلا پونومونیه مورد سنجش قرار گرفت. نتایج،

- [16] Shin S, Song I, Um S. Role of physicochemical properties in nanoparticle toxicity. *Nanomaterials* 2015; 5(3): 135-65.1
- [17] Bourbonnais R, Leech D, Paice MG. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochimica et Biophysica Acta Bba-Gen Subjects* 1998; 1379(3): 381-90.
- [18] Li P, Huo L, Su W, Lu R, Deng C, Liu L, et al. Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity and phenolic content of *Pouzolia zeylanica*. *J Serb Chem Soc* 2011; 76(5): 709-17.
- [19] Pfaller M, Diekema D. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol* 2012; 50(9): 2846-56.
- [20] Li Cy, Zhang ZC, Mao JY, Shi LF, Zheng Y, Quan JL. Preparation of *Tradescantia pallida*-mediated zinc oxide nanoparticles and their activity against cervical cancer cell lines. *Trop J Pharm Res* 2017; 16(3): 494-500.
- [21] Kang T, Guan R, Chen X, Song Y, Jiang H, Zhao J. In vitro toxicity of different-sized ZnO nanoparticles in Caco-2 cells. *Nanoscale Res Lett* 2013; 8(1): 496.
- [22] Taccolla L, Raffa V, Riggio C, Vittorio O, Iorio MC, Vanacore R, et al. Zinc oxide nanoparticles as selective killers of proliferating cells. *INT J Nanomed* 2011; 6: 1129.
- [23] 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. *Colloid Surface B* 2014; 117: 267-76.
- [24] Namvar F, Rahman HS, Mohamad R, Azizi S, Tahir PM, Chartrand MS, et al. Cytotoxic effects of biosynthesized zinc oxide nanoparticles on murine cell lines. *Evid-Based Compl ALT* 2015; 2015 [in Persian]
- [25] Wootton-Beard PC, Moran A, Ryan L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. *Food Res Int* 2011; 44(1): 217-24.
- [26] Suresh D, Nethravathi P, Rajanaika H, Nagabhushana H, Sharma S. Green synthesis of multifunctional zinc oxide (ZnO) nanoparticles using Cassia fistula plant extract and their photodegradative, antioxidant and antibacterial activities. *MAT SCI Semicon Proc* 2015; 31: 446-54.
- [27] Nagajyothi P, Cha SJ, Yang IJ, Sreekanth T, Kim KJ, Shin HM. Antioxidant and anti-inflammatory activities of zinc oxide nanoparticles synthesized using *Polygala tenuifolia* root extract. *J Photoch Photobio B* 2015; 146: 10-7.
- [28] Kumar B, Smita K, Cumbal L, Debut A. Green approach for fabrication and applications of zinc oxide nanoparticles. *Bioinorg Chem Appl* 2014; 2014.
- [29] Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. *Trends Biotechnol* 2010; 28(11): 580-8.
- [30] Tayel AA, Eltras WF, Moussa S, ELBAZ AF, Mahrous H, Salem MF, et al. Antibacterial action of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens. *J Food Safety* 2011; 31(2): 211-8.
- [31] Senthilkumar S, Sivakumar T. Green tea (*Camellia sinensis*) mediated synthesis of zinc oxide (ZnO) nanoparticles and studies on their antimicrobial activities. *Int J Pharm Pharm Sci* 2014; 6(6): 461-5.