

Experimental Animal Biology

Open
Access

ORIGINAL ARTICLE

Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Aloysia citrodora* leaves and investigation of antioxidant, anti-amyloid and anti-cancer properties

Milad Saffari¹, Zolfaghar Lotfi¹, Amir Arasteh^{2*}

¹ Department of biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

² Department of biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

Correspondence

Amir Arasteh

Email: arasteh@iaurasht.ac.ir

ABSTRACT

Aloysia citrodora is very important in Iranian traditional medicine. The aim of this study was to produce silver nanoparticles with aqueous extract of *A. citrodora* and investigate its antioxidant and inhibitory effects on the amyloid nanofibers from BSA as model protein. For synthesis of silver nanoparticles, aqueous *A. citrodora* extract was prepared and one mM silver nitrate was added to solution. To confirm the presence and determine the size of silver nanoparticles, UV-Vis spectroscopy and TEM were used. The antioxidant effect of the extract was evaluated by DPPH and the production of amyloid fibers was measured by Congo red absorption method. The toxicity effect of nanoparticles on neuroblasts was investigated by MTT method and the inhibitory properties of the extract on amyloid production were investigated by TEM. Caryophyllene (7.66%), phytol (7.47%) and limonene (2.68%) were the most abundant compounds. TEM also confirmed spherical crystalline nanoparticles with a size between 30–70 nm. By increasing the concentration of the extract, the antioxidant properties of nanoparticles increased, so that 97.35% of DPPH free radicals were inhibited at a concentration of 1 mg/ml. The highest inhibition of amyloid fibrils production was observed at concentration of 2 mg/ml by 96%, and the highest level of cytotoxicity at a concentration of 2 and with an IC₅₀ of 2.25 mg/ml. The results showed that nanoparticles from *A. citrodora* leaves with anti-amyloid, antioxidant and anticancer properties can be considered as a new bio-nanomaterial in reducing Alzheimer's and cancer complications.

KEY WORDS

Aloysia citrodora, nanoparticle, antioxidant, amyloid, Alzheimer.

How to cite

Saffari, M., Lotfi, Z. & Arasteh, A. (2023). Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Aloysia citrodora* leaves and investigation of antioxidant, anti-amyloid and anti-cancer properties. Experimental Animal Biology, 12(4), 31-42.

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی برگ بهلیمو (*Aloysia citrodora*) و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدآمیلوئیدی و ضدسرطانی

میلاد صفاری^۱، ذوالفقار لطفی^۱، امیر آراسته^{۲*}

چکیده

گیاه بهلیمو (*Aloysia citrodora*) در طب سنتی ایران اهمیت زیادی دارد. هدف از این مطالعه تولید نانوذرات نقره با عصاره آبی بهلیمو و بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و بازدارنده‌گی آن بر تولید نانوآلیاف آمیلوئید از آلبومین سرم گاوی بهعنوان پروتئین مدل بود. برای سنتز نانوذرات نقره، عصاره آبی بهلیمو تهیه شد و به این محلول نیترات نقره یک میلی‌مولار اضافه شد. برای تأیید حضور و تعیین اندازه نانوذرات نقره بیوسنتز شده از طیف‌سنجی UV-Vis و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) استفاده شد. ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره به روش DPPH و اندازه‌گیری تولید الیاف آمیلوئید به روش جذب قرمز کنگو انجام شد. اثر سمیت نانوذرات بر نوروبلاست‌ها با روش MTT بررسی شد و خواص بازدارنده‌گی عصاره بر تولید آمیلوئید با میکروسکوپ الکترونی TEM مورد بررسی قرار گرفت. کاریوفیلن (۷/۶۶ درصد)، فیتول (۷/۴۷ درصد) و لیمونن (۲/۶۸ درصد) فراوان ترین ترکیبات موجود در عصاره بودند. میکروسکوپ الکترونی گذاره نیز نانوذرات کریستالی کروی با اندازه بین ۳۰ تا ۷۰ نانومتر را تأیید کرد. با افزایش غلظت عصاره، خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات افزایش یافت، به طوری که در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۹۷/۳۵ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH مهار شد. بیشترین مهار تولید رشته آمیلوئید در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و به میزان ۹۶ درصد و بیشترین میزان سمتیت سلولی در غلظت ۲ و با IC₅₀ برابر ۲/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. نتایج نشان داد که نانوذرات سنتز شده از برگ بهلیمو *A. citrodora* با خواص ضدآمیلوئیدی، آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی، می‌تواند به عنوان نانوماده زیستی جدید در کاهش عوارض آنزایر و سرطان مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

نانوناژدهای آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌آمیلوئیدی، آنتی‌سرطانی، *Aloysia citrodora*

نویسنده مسئول:

امیر آراسته

ریاضامه: arasteh@iaurash.ac.ir

استناد به این مقاله:

صفاری، میلاد، لطفی، ذوالفقار و آراسته، امیر (۱۴۰۲). سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی برگ بهلیمو (*Aloysia citrodora*) و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدآمیلوئیدی و ضدسرطانی. *فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی*, ۱۱(۳)، ۳۱-۴۲.

برای درمان آسم، سرماخوردگی، تب و سوءهاضمه استفاده می‌شود (Demissie, M. G., et al., 2020). عصاره آن حاوی چندین ترکیب فنلی، یعنی فنیل پروپانوئیدهای گلیکوزیله و فلاونوئیدها می‌باشد (Idm'hand, El-Ouazzani et al. 2022). این ترکیب دارای فعالیت آنتیاکسیدانی، ضدالتهابی، ضدتوموری و ضدمیکروبی هستند (Rashid, Mahmud et al. 2022).

در این تحقیق به منظور کاهش عوارض بیماری‌های اکسیداتیو مانند آزاریم و سرطان، نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی برگ بهلیمو تهیه شد و خواص آنتیاکسیدانی، ضدآمیلوئیدی و سمیت سلولی بر سلول‌های سرطانی آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها و تهیه عصاره *Aloysia citrodora*

این مطالعه تجربی در فروردین ۱۴۰۰ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت انجام شد. گیاه *A. citrodora* از مرکز منابع زیستی ایران تهیه شد. مواد گیاهی جمع‌آوری شده پس از خشک و آسیاب شدن برای تهیه عصاره گیاه مورد استفاده قرار گرفتند، ۴۰ گرم از گیاه را به ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول اضافه کرده و به مدت ۲ دقیقه جوشانید.

تجزیه و تحلیل GC-MS از ترکیبات فعال زیستی

آنالیز کروماتوگرافی گازی متصل به طیفسنج جرمی با دستگاه (DB-5) سری Agilent Technologies Inc. مجهز به ستون با طول ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر انجام شد. پنج گرم از نمونه در ۱۰۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان حل شد و پس از ۱۰ دقیقه مخلوطشدن در حمام اولتراسوند در دمای آزمایشگاه، با استفاده از فیلتر با قطر منفذ ۰/۲ میکرون فیلتر شد. حجم ۱۰ میکرولیتر از عصاره در سرنگ GC-MS قرار داده شد و دمای آون به مدت ۱۰ دقیقه روی ۶۰ درجه سانتیگراد و دمای نهایی ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقيقه قرار گرفت. پس از ۶۰ دقیقه، دمای انژکتور و آشکارساز به ترتیب ۲۳۰ و ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بود. از گاز هلیم به عنوان گاز حامل با دبی ۲۰ سانتی‌متر بر ثانیه استفاده شد (Pasandideh S, Arasteh a., 2021).

ترکیبات موجود در دستگاه شناسایی شدند (Boukabache, Chibani et al. 2023).

مقدمه

بیماری آزاریم یکی از شایع‌ترین علل از دست دادن عملکرد ذهنی است که معمولاً به عنوان "زوال عقل" شناخته می‌شود. استرس اکسیداتیو نقش مهمی در توسعه و پیشرفت پاتولوژی بیماری آزاریم دارد. نورون‌های کولینرژیک در ناحیه قاعده‌ای پیش‌مغز نیز به تدریج ناپدید می‌شوند که منجر به اختلال حافظه در این بیماران می‌شود (Plascencia-Villa and Perry 2022).

گسترده نشان داده است که آسیب اکسیداتیو توسط گونه‌های اکسیژن فعال در چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، در بیماری آزاریم ایجاد می‌شود، به عنوان بخشی از اثرات نوروتوکسیک، سمیت پیتید بتا‌آمیلوئید، حداقل تا حدی، توسط رادیکال‌های آزاد القا می‌شود (Collins, Saleh et al. 2022).

به همین دلیل، درمان‌هایی که به ازین بردن یا جلوگیری از تولید رادیکال‌های آزاد کمک می‌کنند، می‌توانند در بیماری آزاریم مفید باشند. ترکیبات آنتیاکسیدانی به عنوان یک رویکرد درمانی در درمان سمیت عصبی ناشی از پیتید بتا‌آمیلوئید و بهبود نتایج عصبی در بیماری آزاریم معرفی شده‌اند. داروهای تأییدشده‌ای که در حال حاضر برای کنترل این بیماری استفاده می‌شوند، مهارکننده‌های کولین استراز هستند که عالم را بهبود می‌بخشند، اما از پیشرفت بیماری جلوگیری نمی‌کنند. بنابراین، ترکیباتی که می‌توانند سمیت بتا‌آمیلوئید را از راه‌های مختلفی مهار کنند، می‌توانند در کنترل این بیماری مؤثر باشند (Thulasi, Peera et al. , Fazelinejad, Zahedi et al. 2023).

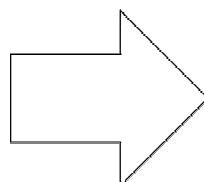
نانوذرات نقره زیست سازگار در سال‌های اخیر توجه قابل توجهی را برای کاربردهای بالقوه در پزشکی و زیست‌شناسی به خود جلب کرده است (Ahmed, Usman et al. 2023).

انتخاب این مسیر صننوعی با نیاز روزافزون به توسعه مواد شیمیایی تمیز و غیرسمی، حلال‌های زیست تخریب‌پذیر و زیست سازگار همراه است (Manek, Darvas et al. 2020).

شیمیایی، گیاهان می‌توانند جایگزین مناسبی برای سنتز نانوذرات باشند، زیرا از مواد شیمیایی سمی استفاده نمی‌کنند. اخیراً چندین نویسنده بیوسنتر نانوذرات فلزی را با استفاده از زیست‌توده مشتق شده از موجودات تکسلولی مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها و عصاره‌های گیاهی انجام داده‌اند (Choi, Jung et al. 2021, Chauhan and Tapwal 2023, Fareed, Nisa et al. 2023).

بهلیمو (*Aloysia citriodora*) یکی از گیاهان دارویی بومی ایران است که امروزه در شمال ایران کشت می‌شود. این گیاه از خانواده *Verbenaceae* است که دارای ۲۰۰ گونه است.

شده (شکل ۱). محلول حاوی نانوذرات با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی دور ریخته شد (Mansouri, Arasteh et al. 2021).



شکل ۱. تغییر رنگ حاصل از محلول حاوی نانوذره پس از حرارت در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد

مخلوط شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۸ نانومتر خوانده شد. به منظور مقایسه فعالیت نانوذرات نقره بیوسنتر شده، از محلول ویتامین C به عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد استفاده شد. برای تعیین مقدار IC₅₀ برای نانوذرات نقره تولید شده از عصاره A. citrodora و ترکیب استاندارد، آزمایش‌هایی در پنج غلظت مختلف از محلول نانوذرات موردنظر و ویتامین C به عنوان کنترل مثبت (جدول ۱) انجام شد. هر آزمایش در سه تکرار انجام شد و میانگین مقدار محاسبه شد. (Sharma, O. P., & Bhat, T. K. 2009)

فعالیت آنتی‌اکسیدانی با رابطه زیر محاسبه شد، که در آن A_{control}، A_{sample} اندازه جذب لوله کنترل و A_{sample}، اندازه جذب نمونه است.

$$\% \text{ antioxidant activity} = \frac{(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}})}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

بیوسنتر نانوذرات

برای تهیه نانوذرات، ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره آبی با ۹۰ میلی‌لیتر محلول ۱ میلی‌مولار نیترات نقره مخلوط شد و برای ۲۴ ساعت روی همزن مغناطیسی در دمای اتاق قرار گرفت. به منظور مشاهده تغییرات رنگ محلول، از دستگاه اسپکتروفوتومتر

تعیین اندازه و مورفولوژی نانوذرات

برای تعیین اندازه و خواص ساختاری از میکروسکوپ الکترونی روشنی (SEM) و برای تعیین اندازه و توزیع نانوذرات نقره سنتر شده از میکروسکوپ الکترونی عبوری LEO-912AB با ولتاژ اعمالی ۱۲۰ کیلو ولت استفاده شد (Mansouri, Arasteh et al. 2021).

بررسی اثرات بازدارندگی برای تولید نانویوفیریل‌های آمیلوئید

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول میلی‌مولار DPPH تهیه شده در اتانول ۹۵ درصد با ۱۰۰ میکرولیتر محلول نانوذره نقره تولید شده از عصاره یا استاندارد A. citrodora

جدول ۱. غلظت‌های مختلف نمونه در سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه به لیمو

شماره نمونه	نمونه نانوذره (میکرولیتر)	آب مقطر یا الکل (میکرولیتر)	ضریب رقت نمونه (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
۱	۴۰۰	۱۶۰۰	۰/۲
۲	۸۰۰	۱۲۰۰	۰/۴
۳	۱۲۰۰	۸۰۰	۰/۶
۴	۱۶۰۰	۴۰۰	۰/۸
۵	۲۰۰۰	-	۱
۶ (کنترل مثبت)	۲ میلی‌لیتر محلول یک میلی‌مولار آسکوربیک اسید		

میکرولیتر از محلول‌های آمیلوئید آماده شده با ۱۹۰۰ میکرولیتر از بافر قرمز کنگو مخلوط شد، لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاهی گرم‌گذاری شدند و سپس جذب آنها بین ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر دربرابر آب مقطر، اندازه‌گیری شد (محمدی، م.، و همکاران، Kalhor, H. R., & Ashrafian, H., 2017). (۱۳۹۲)

ارزیابی خواص ضد آمیلوئیدوژنیک

برای ارزیابی خواص ضد آمیلوئیدوژنیک نانو ذرات، نمونه‌های مختلف مطابق جدول (۲) تهیه شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت روی هیتر- استایر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه به هم زده و مقدار فیبریل‌های آمیلوئید تولیدشده توسط طیف‌سنجی جذبی قرمز کنگو تعیین شد. حجم ۱۰۰

جدول ۲. غلظت‌های مختلف نمونه در سنجش خواص ضد آمیلوئیدوژنیک عصاره گیاه بهلیمو

شماره میکروتیوب	استوک ۲۵mg/ml از BSA	باfer سیترات-فسفات ۳ pH (µl)	نمونه نانوذره (µl)	غلظت BSA در محلول (mg/ml)
۱	۱۰۰	۴۰۰	-	۵
۲	۱۰۰	۳۸۰	۲۰	۵
۳	۱۰۰	۳۶۰	۴۰	۵
۴	۱۰۰	۳۴۰	۶۰	۵
۵	۱۰۰	۳۲۰	۸۰	۵
۶	۱۰۰	۳۰۰	۱۰۰	۵

شد. ابتدا سلول‌ها به یک صفحه کشت ۹۶ چاهی منتقل شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون و اطمینان از زندبودن سلول‌ها و چسبیدن به کف چاهک‌ها، سلول تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره بیوسنتز شده قرار گرفتند. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت و پس از گذشت زمان لازم، سلول‌ها به مدت ۴ ساعت با افزودن محلول MTT انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، محلول MTT تخلیه و با ۱۰۰ میکرولیتر DMSO جایگزین شد. در نهایت، جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

نتایج

کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی

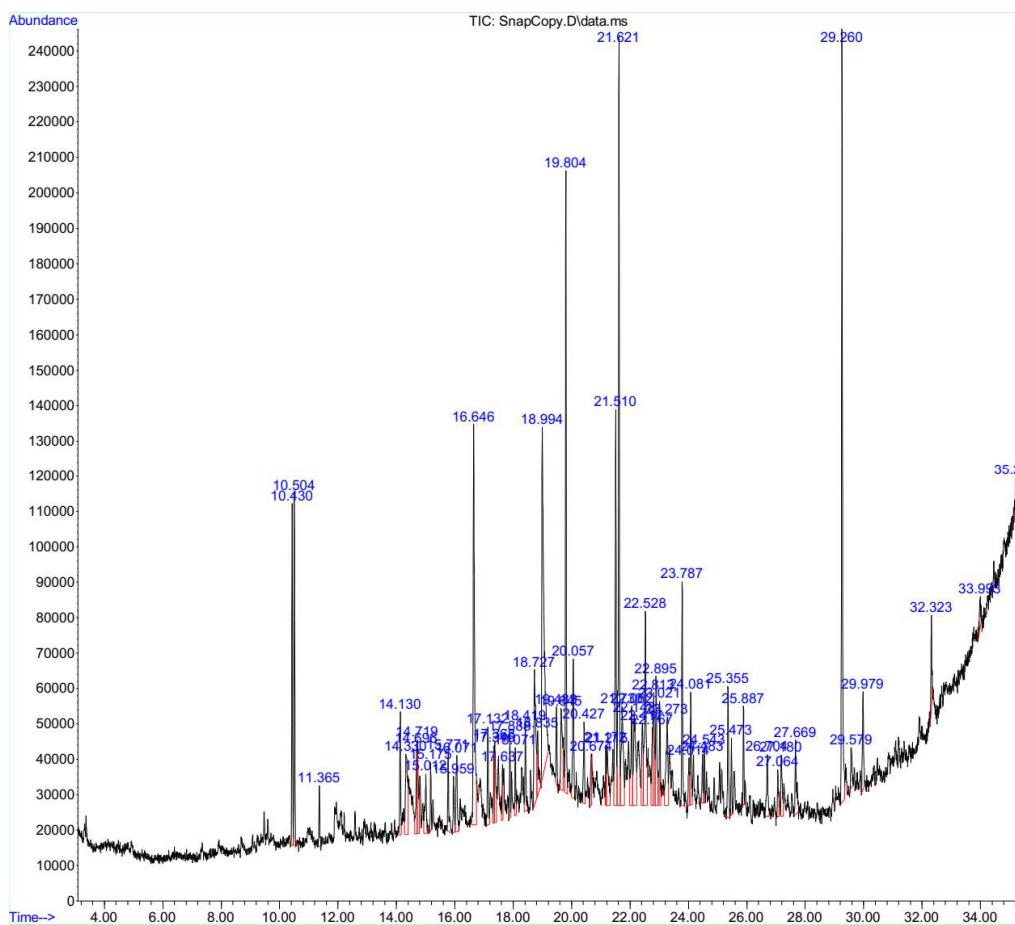
ترکیبات شناسایی شده توسط کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی در کروماتوگرام نشان داده شده است (شکل ۲). ترکیب شیمیایی عصاره *A. citrodora* نیز در جدول ۳ نشان داده شده است.

بررسی تشکیل آمیلوئید با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

جهت بررسی فیبرهای آمیلوئید تولیدشده، ۵ میکرولیتر از محلول BSA با غلظت نهایی ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فیلتر شد. سپس توسط کاغذ صافی فیلتر شده و نمونه‌ها با ۳ درصد وزنی بر حجم اورانیل استات به مدت ۱ دقیقه شستشو داده و مازاد آن توسط کاغذ صافی خارج گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق خشک شدند. نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی عبوری فیلیپس EM Hassanisaadi, Bonjar et al. (S) 208 مشاهده شدند (2022).

ارزیابی سمیت سلولی نانوذرات بیوسنتز شده بر روی سلولی سرطانی نوروبلاست (نوروبلاستوما)

اثر سیتوکسیک نانوذرات بر سلول‌های سرطانی نوروبلاست (تهیه شده از موسسه تحقیقات پاستور) با روش MTT بررسی شد. برای این منظور از سلول‌های درحال رشد در فاز لگاریتمی استفاده



شکل ۲. کروماتوگرام حاصل از بررسی ترکیبات عصاره گیاه به لیمو

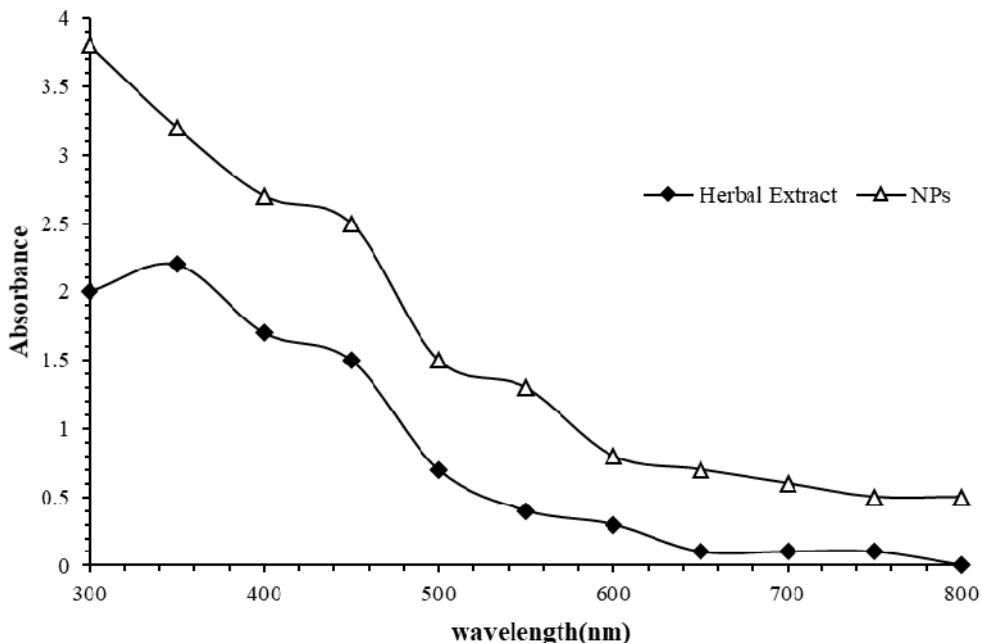
جدول ۳. ترکیبات شناسایی شده در کروماتوگرافی گازی-طیفسنجی جرمی عصاره گیاه به لیمو

شماره	نام ترکیب	زمان شناسایی	احتمال حضور (درصد)	درصد حضور
۱	Limonene	۱۰/۴۲	۹۹	۲/۶۸
۲	Eucalyptol	۱۰/۵۰	۹۸	۲/۸۳
۳	Linalool	۱۱/۳۶	۵۵	.۶
۴	Carene	۱۴/۱۳	۹۰	۱/۱۴
۵	Catechol	۱۴/۳۳	۶۸	۱/۷۶
۶	Citral	۱۵/۱۷	۷۲	.۰/۵۸
۷	BETA.-THUJONE	۱۵/۹۶	۴۹	.۰/۰۹
۸	α .-Copaene	۱۷/۸۹	۹۴	.۰/۶۷
۹	α .-Bourbonene	۱۸/۰۷	۶۴	.۰/۶۴
۱۰	Naphthalene, 1,2,3,5,6,7,8,8a	۱۹/۴۸	۹۵	.۰/۷۱
۱۱	Benzene, 1-(dimethyl-4hexen..)	۱۹/۸۰	۹۸	۰/۳۴
۱۲	gamma.-Muurolene	۲۰/۴۳	۸۴	.۰/۸۶
۱۳	(+) spathulenol	۲۱/۵۱	۹۰	۴/۴۹
۱۴	Caryophyllene oxide	۲۱/۶۲	۹۳	۷/۶۶
۱۵	Hexadecane	۲۱/۷۲	۶۴	۲/۱۷
۱۶	beta.-D-Ribopyranoside	۲۲/۱۴	۵۰	۲/۱۰
۱۷	beta.-D-Ribopyranoside	۲۲/۵۳	۹۱	۳/۰۹
۱۸	Hexadecanoic acid, ethyl ester	۲۷/۱۸	۹۵	.۰/۸۴
۱۹	Phytol	۲۹/۲۵	۹۱	۷/۴۷

نانوذرات نقره در محدوده ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر تاییدی بر سنتز نانوذرات بود.

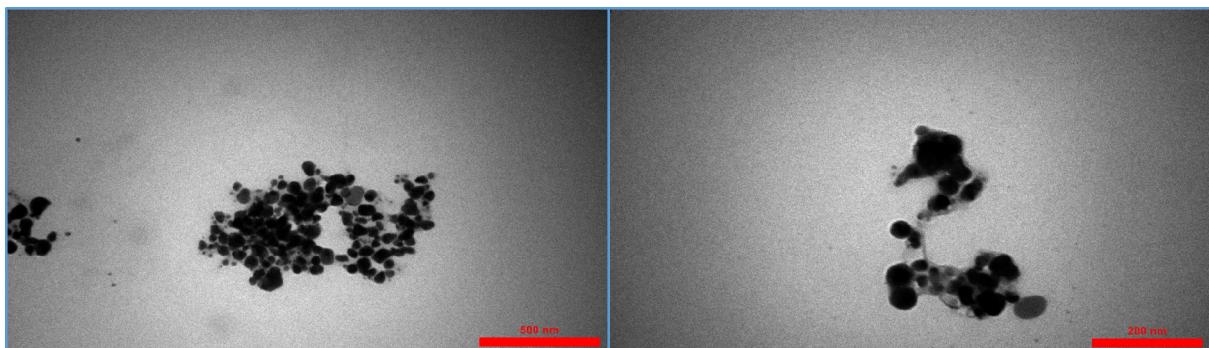
طیف‌سنجی نانوذرات با روش UV-VIS

نتایج طیف‌سنجی مرئی فرابنفش عصاره گیاه *A. citrodora* قبل و بعد از سنتز نانوذرات نقره در شکل ۳ نشان داده شده است. حداکثر پیک جذب در منحنی حاصل از عصاره پس از سنتز



شکل ۳. طیف اسپکتروفوتومتر UV-Vis نانوذرات نقره بیوسنتز شده

با توجه به تصاویر TEM، تشکیل نانوذرات نقره و توزیع اندازه در محدوده زیر ۱۰۰ نانومتر شکل گرفت و بیشتر کروی با اندازه متوسط ۷۰ نانومتر بود (شکل ۴).

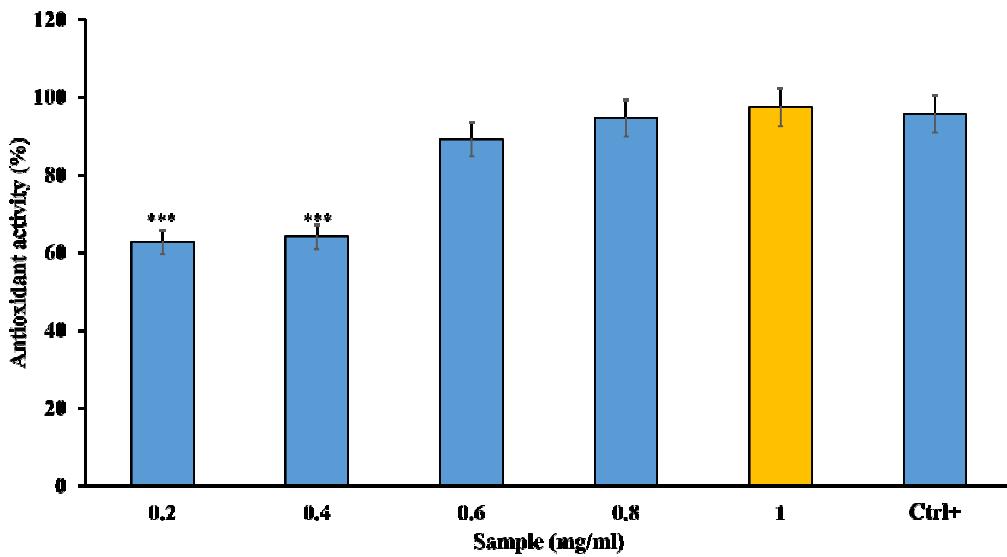


شکل ۴. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از نانوذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره گیاه بهلیمو. اندازه حدود ۷۰ نانومتر و شکل کروی نانوذرات مشهود است.

آنتی‌اکسیدانی در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد (شکل ۵).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

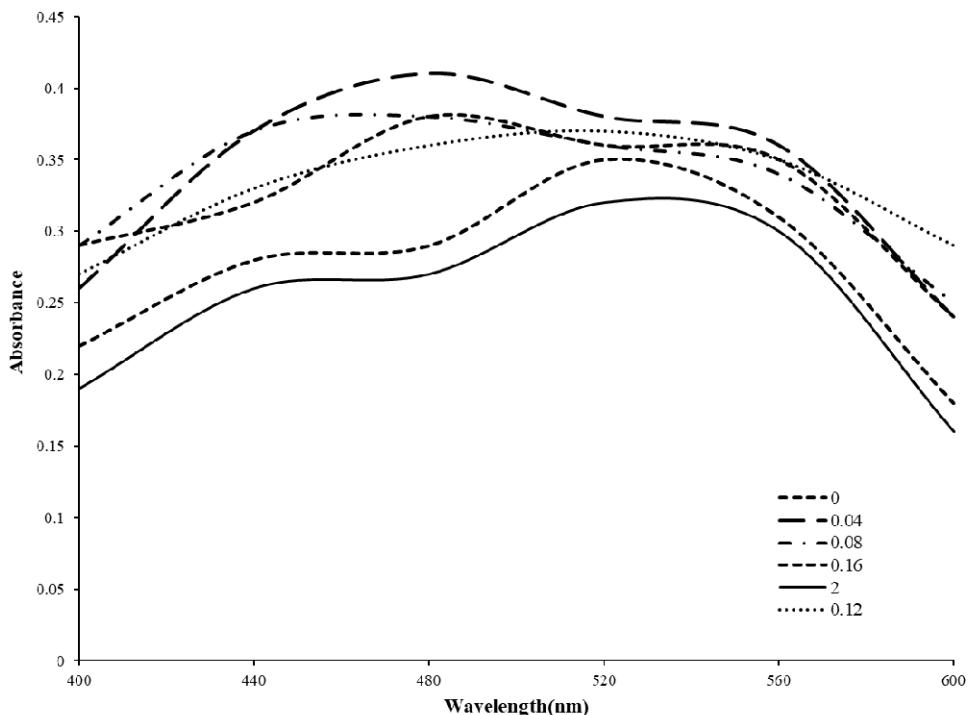
فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته و حداکثر خاصیت



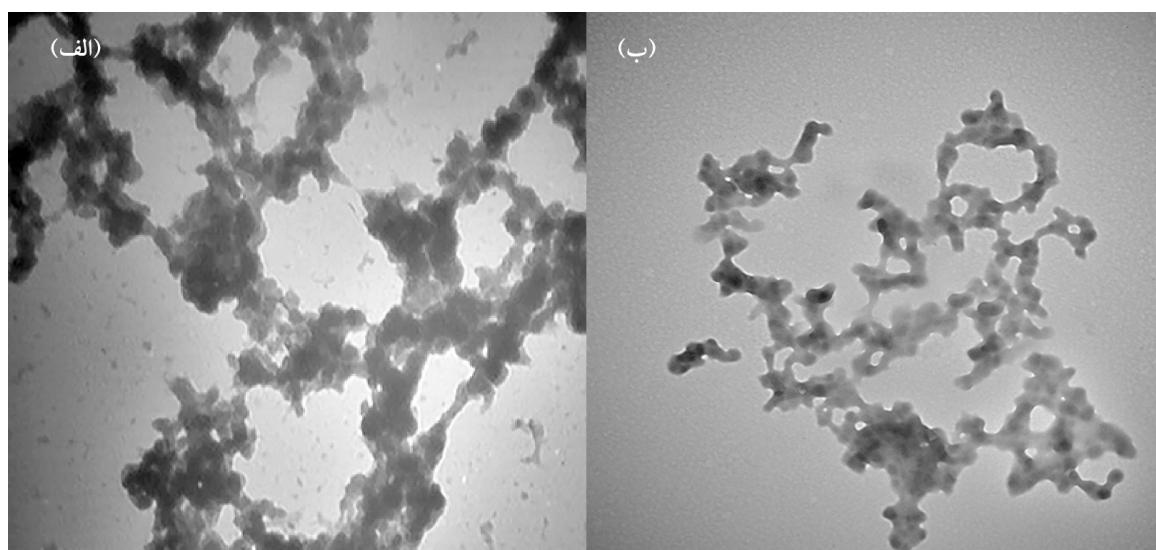
شکل ۵. میزان مهار رادیکال‌های DPPH در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بیوستر شده با عصاره گیاه به لیمو ($P < 0.001$).

رشته‌های آمیلوئیدی تا حدود ۹۶ درصد جلوگیری کرد که نشان‌دهنده کاهش تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی در حضور نانوذرات نقره است (شکل ۶).

مهار تولید نانوفیبریل‌های آمیلوئید
بیشترین میزان جذب کنگو رد در محدوده ۴۸۰ تا ۵۲۰ نانومتر بود، به طوری که غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذره، از تشکیل



شکل ۶. میزان جذب در غلظت‌های مختلف از نانوذرات نقره برای مهار تولید نانوفیبریل‌های آمیلوئیدی

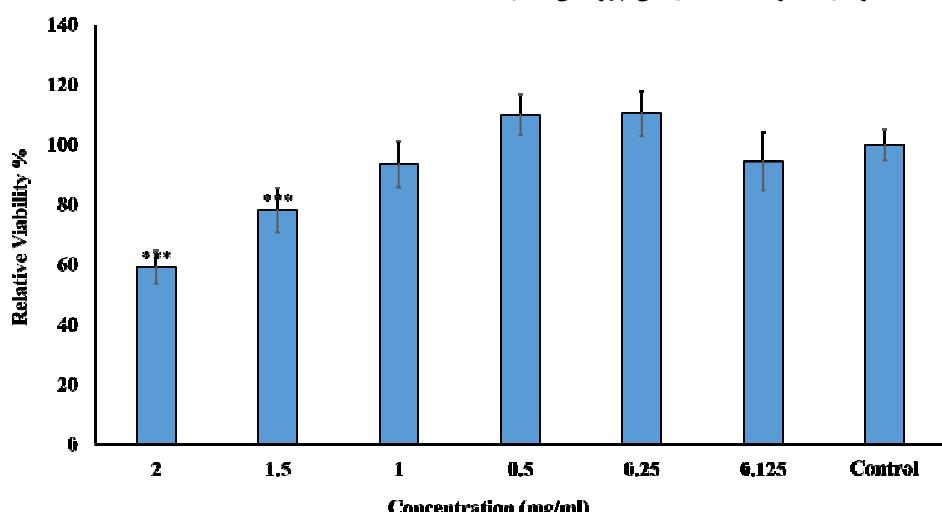


شکل ۷. تصاویر میکروسکوپ الکترونی محلول آلبومین سرم گاوه‌ی (ب) در حضور غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاهی (الف) بدون عصاره گیاهی (ب)

به مهار سلول‌های سرطانی نوروبلاست با IC_{50} حدود ۲/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هستند (شکل ۸).

سمیت سلولی نانوذرات

سمیت نانوذرات بر روی رده سلولی سرطانی نوروبلاست بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوذرات تولید شده در این پژوهش قادر



شکل ۸. بقای سلول‌های نوروبلاست (تیمار شده با نانوذرات نقره بیوسنتز شده در آزمون سمیت سلولی، میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کاهش یافته و این زنده‌مانی در غلظت‌های ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌شکل معنی داری کاهش یافته است. $P < 0.001$).

روش سنتز سبز، یون‌های فلزی در یک واکنش ساده با استفاده از ترکیبات گیاهی بدون نیاز به سورفکتانت، بدون نیاز به شرایط خاص (دما و فشار) و سایر عوامل تنبیت‌کننده به نانوذرات تبدیل می‌شوند. مواد و ترکیبات فعال بیولوژیکی موجود در عصاره‌های گیاهی مانند فلاونوئیدها و سایر متابولیت‌های فعال موثر محلول در آب می‌توانند برای کاهش یون‌های فلزی به نانوذرات در دمای اتاق شوند (Khan, Shariq et al. 2022).

بحث

امروزه با فناوری نانو توانسته‌اند نقره فلزی را به صورت ذراتی با اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر ایجاد کنند. نانوذرات نقره یا نانوذرات نقره حاوی حدود ۱۰۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰ اتم نقره هستند. نقره فلزی با روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیابی و بیولوژیکی مانند تخلیه بار، احیای شیمیابی، سونوپریمی، تابش و سنتز برودتی (شیمی سبز) به نانوذرات بسیار ریز تبدیل می‌شود (Gohari, Farhadi et al. 2023).

نانوذرات و پروتئین‌ها می‌تواند فیبریلاسیون را با مسدودکردن مکان‌های اتصال هسته‌هایی که باعث فیبریلاسیون می‌شوند و با کاهش غلظت پروتئین مستعد تجمع در محیط کاهش دهد (Sun et al. 2023). با توجه به اینکه این نانوذرات به صورت زیستی سنتز شده‌اند، سطوح آنها توسط هاله‌ای از پروتئین‌ها احاطه شده است که تحت شرایط تجمع رشته‌ای شده‌اند. در شرایط ناپایدارکننده، اجزای آبگریز در دسترس حلال قرار می‌گیرند. یکی از مکانیسم‌های بازدارندگی این نانوذرات می‌تواند اثر همراه آنها در شرایط تجمع باشد. به این معنا که بخش‌های آبگریز پروتئین‌های هاله نانوذرات، بخش‌های آبگریز نانوذرات را از طریق برهمکنش‌های آبگریز-آبگریز می‌پوشانند (Mansouri et al. 2021). فرضیه آبشر آمیلوئید در تحقیقات بیماری آلزایمر بسیار مهم است، این فرضیه بیان می‌کند که مهمترین علت بیماری آلزایمر تجمع پروتئین بتا‌آمیلوئید است و درمان‌هایی که بتا‌آمیلوئید را کاهش می‌دهد علائم بیماری آلزایمر را بهبود می‌بخشد. بنابراین، اگر نانورشته‌های آمیلوئید در حضور آمیلوئید تولید شود، می‌توان اثرات درمانی آن را برای کاهش عوارض بیماری آلزایمر نشان داد (Galzitskaya, Grishin et al. 2023). در این مطالعه با بررسی نتایج طیف‌спектرونی قرمز کنگو مشخص شد که عصاره *A. citrodora* توانایی کاهش تولید پروتئین آمیلوئید را دارد. نتایج ما نشان داد که بیشترین بازدارندگی الیاف آمیلوئید در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره و ۹۶ درصد بود (شکل ۵).

نتیجه

در این مطالعه، ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره به روش DPPH و اندازه‌گیری تولید الیاف آمیلوئید به روش جذب قرمز کنگو انجام شد. اثر سمیت نانوذرات بر نوروبلاست‌ها با روش MTT بررسی شد و خواص بازدارندگی عصاره بر تولید آمیلوئید با میکروسکوپ الکترونی TEM مورد بررسی قرار گرفت.

با افزایش غلظت عصاره، خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات افزایش یافت، به‌طوری که در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۹۷/۳۵ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH مهار شد. بیشترین مهار تولید رشته آمیلوئید در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و به میزان IC₅₀ ۹۶ درصد و بیشترین میزان سمیت سلولی در غلظت ۲ و با حدود ۲/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. نتایج نشان داد که نانوذرات سنتز شده از برگ به لیمو *A. citrodora* با خواص ضدآمیلوئیدی، آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی که بر سلول‌های

در این مطالعه سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی *A. citrodora* انجام شد و اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد آمیلوئیدوژنیک و سمیت سلولی بر سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفت. یکی از جالب‌ترین ویژگی‌های نانوذرات فلزی، ویژگی‌های نوری نوری آنها است که با توجه به شکل و اندازه نانوذرات تغییر می‌کند. در شکل ۱، تغییر رنگ مشاهده شده از زرد روشن به قهوه‌ای تیره نشانه واضحی از تشکیل نانوذرات نقره در واکنش بود. در نانوذرات فلزی، تشیدید پلاسمون سطحی مسئول خواص نوری منحصر به فرد آنها است. طیف UV-Vis ثبت شده به طور کامل افزایش ارتعاشات پلاسمون سطحی را در طول موج ۴۵۰ نانومتر منعکس می‌کند. مهم‌ترین عاملی که منجر به تحقیقات گسترشده در مورد پدیده فیبریلاسیون خود به خودی پروتئین‌ها شده است، این پدیده با بیماری‌های مهم و در حال گسترش موسوم به بیماری‌های آمیلوئید همراه است. ویژگی مشترک بیماری‌های آمیلوئید، تشکیل تجمع پروتئین در قسمت‌های مختلف بدن است. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره *A. citrodora* دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بوده و از این نظر با سایر مطالعات قبلی مطابقت دارد. از یافته‌های این مطالعه، کاریوفیلن (۷/۶۶ درصد)، فیتول (۷/۴۷ درصد) و لیمونن (۲/۶۸ درصد) فراوان‌ترین ترکیبات موجود در عصاره بودند (شکل ۲ و جدول ۳). تصاویر TEM برای بررسی شکل و اندازه نانوذرات تولید شده توسط اسکن و میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان می‌دهد که نانوذرات نقره کروی‌شکل و از ۳۰ تا ۷۰ نانومتر متغیر هستند. لازم به ذکر است که تغییرات دما و pH و مدت‌زمان و غلظت‌های مختلف برهمکنش محلول نمکی و عصاره‌های گیاهی می‌تواند بر دامنه تغییرات اندازه نانوذرات تأثیر بگذارد (Mehata et al. 2022). Kalipillai و همکاران در سال ۲۰۲۳ نشان دادند که نانوذرات در غلظت‌های پایین به مکان‌های خاصی در هسته‌های اولیه پروتئین متصل می‌شوند و از اتصال هسته‌ها به یکدیگر جلوگیری می‌کنند. آنها نشان دادند که وقتی تشکیل فیبر شروع می‌شود، افزودن نانوذرات ممکن است روند فیبریلاسیون را معکوس کند یا الیاف را از بین ببرد (Kalipillai, Elancheran et al. 2023). افزودن نانوذرات در غلظت‌های پایین باعث افزایش فاز تاخیر و کاهش فاز افزایش طول می‌شود. برهمکنش قوی بین پیتیدها و نانوذرات با کاهش جذب نانوذرات به درون هسته در مکان‌های خاص روی آنها، از پیوند هسته‌ها به یکدیگر و در نتیجه کاهش فیبریلاسیون جلوگیری می‌کند. به عنوان مثال، Sun و همکاران در سال ۲۰۲۳، استدلال کردند که بر همکنش

تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان از دانشگاه پیام‌نور واحد تهران شرق و آزمایشگاه استاندارد دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

- Ahmed, A., M. Usman, Z. Ji, M. Rafiq, B. Yu, Y. Shen and H. Cong (2023). Nature-inspired biogenic synthesis of silver nanoparticles for antibacterial applications. *Materials Today Chemistry* 27: 101339.
- Boukabache, M., S. Chibani, A. Otmani, A. Nouichi, O. Abdelaziz and I. Karaca (2023). Chemical composition and insecticidal activity of *Aloysia citrodora* essential oil against *Aphis fabae* (Hemiptera: Aphididae), *Rhopalosiphum maidis* (Hemiptera: Aphididae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *International Journal of Tropical Insect Science*: 1-7.
- Chauhan, P. and A. Tapwal (2023). Green synthesis of nanoparticles using botanicals and their application in management of fungal phytopathogens: a review. *Archives of Microbiology* 205(3): 1-21.
- Choi, J. S., H. C. Jung, Y. J. Baek, B. Y. Kim, M. W. Lee, H. D. Kim and S. W. Kim (2021). Antibacterial activity of green-synthesized silver nanoparticles using Areca catechu extract against antibiotic-resistant bacteria. *Nanomaterials* 11(1): 205.
- Collins, A., T. Saleh and B. Kalisch (2022). Naturally occurring antioxidant therapy in Alzheimer's disease. *Antioxidants* 2022, 11, 213. *Antioxidants in Age-Related Diseases and Anti-Aging Strategies*: 115.
- Fareed, N., S. Nisa, Y. Bibi, A. Fareed, W. Ahmed, M. Sabir, S. Alam, A. Sajjad, S. Kumar and M. Hussain (2023). Green synthesized silver nanoparticles using carrot extract exhibited strong antibacterial activity against multidrug resistant bacteria. *Journal of King Saud University-Science* 35(2): 102477.
- Fazelinejad, H., E. Zahedi, S. Nazarian, Z. Kaffash Siuki, S. Nasri, M. Dadmehr, M. Mehrabi and R. Khodarahmi (2023). "Neuroprotective effect of Bis (Indolyl) phenylmethane in Alzheimer's disease rat model through inhibition of hen Lysozyme amyloid fibril-induced neurotoxicity." *Journal of the Iranian Chemical Society* 20(3): 551-562.
- Galzitskaya, O. V., S. Y. Grishin, A. V. Glyakina, N. V. Dovidchenko, A. V. Konstantinova, S. V. Kravchenko and A. K. Surin (2023). The Strategies of Development of New Non-Toxic Inhibitors of Amyloid Formation." *International Journal of Molecular Sciences* 24(4): 3781.
- Gohari, G., H. Farhadi, S. Panahirad, E. Zareei, P. Labib, H. Jafari, G. Mahdavinia, M. B. Hassanpouraghdam, A. Ioannou and M. Kulak (2023). Mitigation of salinity impact in spearmint plants through the application of engineered chitosan-melatonin nanoparticles." *International Journal of Biological Macromolecules* 224: 893-907.
- Hassanisaadi, M., A. H. S. Bonjar, A. Rahdar, R. S. Varma, N. Ajalli and S. Pandey (2022). Eco-friendly biosynthesis of silver nanoparticles using *Aloysia citrodora* leaf extract and evaluations of their bioactivities. *Materials Today Communications* 33: 104183.
- Idm'hand, E., Y. El-Ouazzani, F. Msanda and K. Cherifi (2022). Ethnopharmacological review of medicinal plants used to manage hypertension in Morocco. *Medicinal Plants-International Journal of Phytomedicines and Related Industries* 14(2): 202-220.
- Kalipillai, P., R. Elancheran and E. Mani (2023). Effect of substrate charge density on the adsorption of intrinsically disordered protein amyloid β 40: A molecular dynamics study." *Soft Matter*.
- Khan, F., M. Shariq, M. Asif, M. A. Siddiqui, P. Malan and F. Ahmad (2022). "Green nanotechnology: plant-mediated nanoparticle synthesis and application." *Nanomaterials* 12(4): 673.
- Manek, E., F. Darvas and G. A. Petroianu (2020). Use of biodegradable, chitosan-based nanoparticles in the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules* 25(20): 4866.
- Mansouri, H., A. Arasteh and R. A. Khavari-Nejad (2021). Phytochemical evaluation and antioxidant and inhibitory effects of *Citrullus colocynthis* L. extract on the production of amyloid nano-fibrils from bovine serum albumin as a model protein. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants* 84: 34-48.
- سرطانی دارد، می‌تواند به عنوان نانوماده زیستی جدید در کاهش عوارض آلزایمر و سرطان مورد توجه قرار گیرد.

- Mehata, M. S. (2022). Surface plasmon resonance allied applications of silver nanoflowers synthesized from *Breynia vitis-idaea* leaf extract. *Dalton Transactions* 51(7): 2726-2736.
- Plascencia-Villa, G. and G. Perry (2022). Neuropathological changes provide insights into key mechanisms related to Alzheimer's disease and related dementia. *The American Journal of Pathology*.
- Rashid, H. M., A. I. Mahmud, F. U. Afifi and W. H. Talib (2022). Antioxidant and Antiproliferation Activities of Lemon Verbena (*Aloysia citrodora*): An in vitro and in vivo study." *Plants* 11(6): 785.
- Sun, X., C. Yang, W. Liu, K. Lu and H. Yin (2023). Charge modifications of graphene oxide enhance the inhibitory effect on insulin amyloid fibrillation based on electrostatic interactions. *International Journal of Biological Macromolecules* 225: 1140-1151.
- Thulasi, M., K. Peera and K. Yellamma Anti-Cholinesterase Effect of *Emblica officinalis* Fruit Extract in Alzheimer's Induced Rat Brain-An Insight to Develop Novel Alzheimer's Therapeutics.