Summer (2024) 13(49): 13-21
DOI: 10.30473/eab.2024.71436.1953
Received: 28 May 2024 Accepted: 1 Sep 2024

Experimental Animal Biology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

# Designing a bio-nanosensor based on silver nanoparticles synthesized using (*Chrysanthemum morifolium*) aqueous extract to detect lactate dehydrogenase with high sensitivity

**Pouyan Pedram[1*], Mohammad Fazilati[1], Marzieh Rashidipour[2], Habibolah Nazim[1]**

[1]Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran.
[2]Medicinal Plants Research Center, University of Medical Sciences, Lorestan, Iran.

**Correspondence**
Pouyan Pedram
Email: Pooyan.pedram@isfahan.pnu.ac.ir

**How to cite**
Pedram, P., Fazilati, M., Rashidipour, M., & Nazim, H. (2024). Designing a bio-nanosensor based on silver nanoparticles synthesized using (*Chrysanthemum morifolium*) aqueous extract to detect lactate dehydrogenase with high sensitivity. *Experimental Animal Biology*, *13*(49), 13-21.

**ABSTRACT**

Lactate dehydrogenase (LDH) is a key enzyme in cellular metabolism found in all animals. It plays a crucial role in converting pyruvate to lactate and vice versa. LDH is present in a wide range of tissues and cells in the animal body. In recent decades, nanoparticles have been utilized due to their unique properties for designing optical and electronic sensors. This research presents a novel colorimetric method: silver nanoparticles synthesized using chrysanthemum aqueous extract are employed for direct detection of lactate dehydrogenase activity. Initially, chrysanthemums were collected from greenhouses in Mahallat County under the supervision of experts. After separation and powder preparation of the flower part of the plant, chrysanthemum aqueous extract was prepared. Subsequently, the synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract and addition of silver nitrate solution was investigated by optimizing appropriate conditions. In the next step, two vials were prepared, each containing a reaction mixture comprising Tris-HCl, $MgCl_2$, and NADH. Additionally, one vial contained LDH. Silver nanoparticles and sodium borohydride were then added to the vials. The enzyme can convert $NAD^+$ to NADH. The detection mechanism of lactate dehydrogenase enzyme is based on the aggregation of silver nanoparticles, which leads to an increase in their size and consequently a color change. Thus, the presence or absence of the enzyme can be easily distinguished with the naked eye in a single step. In the presence of the enzyme, the color of the solution used in the study was yellow, while in the absence of the enzyme, the color was grayish. Consequently, lactate dehydrogenase enzyme can be identified with high sensitivity.

**KEYWORDS**

Chrysanthemum flower, lactate dehydrogenase, silver nanoparticles, animal metabolism.

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

سال سیزدهم، شماره اول، پیاپی چهل و نهم، تابستان ۱۴۰۳ (۱۳-۲۱)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۱۱

DOI: 10.30473/eab.2024.71436.1953

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

# طراحی نانوحسگر زیستی برپایه نانوذرات نقره سنتزشده با استفاده از عصاره آبی گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) جهت تشخیص با حساسیت بالای لاکتات دهیدروژناز

**پویان پدرام[1*]، محمد فضیلتی[1]، مرضیه رشیدی‌پور[2]، حبیب‌اله ناظم[1]**

[1]گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

[2]مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی، لرستان، ایران.

نویسنده مسئول:

پویان پدرام

رایانامه: Pooyan.pedram@isfahan.pnu.ac.ir

## چکیده

لاکتات دهیدروژناز (LDH) یک آنزیم کلیدی در متابولیسم سلولی است که در تمام جانوران یافت می‌شود. این آنزیم نقش مهمی در تبدیل اسید پیرورویک به اسیدلاکتیک و بالعکس ایفا می‌کند. LDH در طیف وسیعی از بافت‌ها و سلول‌های بدن جانوران، وجود دارد. در دهه اخیر، نانوذرات به‌دلیل خواص منحصربه‌فردشان برای طراحی حسگرهای نوری و الکترونیکی مورداستفاده قرار گرفته‌اند. این پژوهش یک روش مبتنی بر رنگ‌سنجی جدید را ارائه می‌دهد؛ نانوذرات نقره‌ای که از طریق عصاره آبی گل داوودی سنتز شده‌اند برای تشخیص مستقیم فعالیت لاکتات دهیدروژناز استفاده می‌شود. ابتدا، گل داوودی زیر نظر کارشناسان از گلخانه‌های شهرستان محلات جمع‌آوری شد، بعد از جداسازی و تهیه پودر بخش گل گیاه، عصاره آبی گل داوودی تهیه گردید؛ در ادامه با هدف تهیه نانوذرات نقره از طریق عصاره آبی و اضافه‌شدن محلول نیترات نقره با بررسی و بهینه‌سازی مناسب به تهیه نانوذرات نقره پرداخته شد. در مرحله بعد دو ویال تهیه‌شد؛ هر ویال شامل مخلوط واکنش حاوی Tris-HCl، $MgCl_2$ و NADH بود، در یکی از ویال‌ها علاوه بر مواد محلول ذکرشده LDH نیز اضافه شد. سپس نانوذرات نقره و بوروهیدروسدیم به آن اضافه گردید. آنزیم می‌تواند $NAD^+$ را به NADH تبدیل کند. مکانیسم تشخیص آنزیم لاکتات دهیدروژناز براساس تجمع نانوذرات نقره است که منجر به افزایش اندازه نانوذرات می‌شود و این امر باعث تغییر رنگ می‌گردد. به این‌ترتیب وجود یا عدم وجود آنزیم به‌راحتی با چشم غیرمسلح در طی یک مرحله قابل‌تشخیص است. در حضور آنزیم، رنگ محلول مورداستفاده در پژوهش زرد و زمانی که آنزیم وجود نداشت، رنگ محلول مایل به خاکستری بود. در نتیجه می‌توان آنزیم لاکتات دهیدروژناز را با حساسیت بالا شناسایی کرد.

## واژه‌های کلیدی

گل داوودی، لاکتات دهیدروژناز، نانوذرات نقره، متابولیسم جانوری.

**استناد به این مقاله:**

پدرام، پویان؛ فضیلتی، محمد؛ رشیدی‌پور، مرضیه و ناظم، حبیب‌اله (۱۴۰۳). طراحی نانوحسگر زیستی برپایه نانوذرات نقره سنتزشده با استفاده از عصاره آبی گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) جهت تشخیص با حساسیت بالای لاکتات دهیدروژناز. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۳(۴۹)، ۱۳-۲۱.

## مقدمه

لاکتات دهیدروژناز، به‌دلیل وجود گسترده در بافت‌های جانوران به‌عنوان یک شاخص مهم برای شناسایی صدمات و بیماری‌های شایع تبدیل‌شده است. دهیدروژناژها آنزیم‌هایی هستند که هیدرید (ترکیب هیدروژن‌دار) را از یک مولکول به مولکول دیگر منتقل می‌کنند. واکنش کاتالیزشده توسط LDH، بخشی از فرایند تنفس سلولی است که در آن سلول‌ها از گلوکز برای تولید انرژی استفاده می‌کنند (Ding *et al*., 2017). اندازه‌گیری سطح LDH در خون به‌عنوان یک آزمایش تشخیصی برای کمک به تشخیص و نظارت بر برخی از بیماری‌ها استفاده می‌شود. این آنزیم در بسیاری از بافت‌ها و ارگان‌های بدن جانوران وجود دارد، اما بیش‌تر در عضلات کار می‌کند. لاکتات دهیدروژناز در فرایندهایی که نیاز بیش‌تری به اکسیژن وجود دارد نقش مؤثری را ایفا می‌کند. در این شرایط، عضلات به‌جای استفاده از اکسیژن برای تولید انرژی، از فرایند گلیکولیز استفاده می‌کنند و لاکتات تولید می‌شود (Petrelli *et al*., 2015). لاکتات دهیدروژناز سپس لاکتات را به پایه‌های انرژی مانند ATP و NADH تبدیل می‌کند. لاکتات دهیدروژناز در تشخیص برخی بیماری‌ها نیز نقش دارد. سطح بالای لاکتات در خون می‌تواند نشانگر بیماری‌هایی مانند افتراق گلوکز و اسیدلاکتیک، سندرم رشد غیرعادی، سندرم کلسترول بالا و سندرم متابولیک باشد (Hohorst, 1965). لاکتات دهیدروژناز آنزیمی ضروری برای زندگی است و نقش‌های مهمی در متابولیسم سلولی، صنایع غذایی و پزشکی ایفا می‌کند. (Zhang *et al*., 2015). به‌طورکلی، بررسی و تحقیق درباره این آنزیم می‌تواند به شناخت بهتر از فرایند تولید انرژی در بدن و همچنین تشخیص بیماری‌ها کمک کند.

LDH[1] جزو طبقه اول آنزیم‌ها بوده و روی گروه‌های –CH OH همراه با $NAD^+$ به‌عنوان پذیرنده عمل می‌کند و انتقال هیدروژن را کاتالیز می‌کند. لاکتات دهیدروژناز یک آنزیم حاوی روی است که بخشی از مسیر گلیکولیز را کاتالیز می‌کند. این آنزیم در سیتوپلاسم تمامی سلول‌ها و بافت‌ها در بدن یافت می‌شود. این آنزیم به‌صورت تترامر است و به‌صورت دو زیر واحد فعال H (برای قلب) و M (برای عضله) با وزن مولکولی ۱۳۴ کیلودالتون است. ادغام زیر واحدها باعث ایجاد پنج ایزوآنزیم می‌شود. LD1 به مقادیر زیادی در سلول‌های قلبی و گلبول‌های قرمز یافت می‌شود. LD2 نیز به‌طور طبیعی در سیستم رتیکولواندوتلیال یافت می‌شود. LD3 از ریه‌ها و سایر بافت‌ها منشأ می‌گیرد. منشأ LD4 نیز از کلیه‌ها، جفت و پانکراس است. LD5 بیش‌تر در کبد و عضله اسکلتی دیده می‌شود. در حالت عادی و در افراد طبیعی، سطح LD2 بیش‌ترین درصد از LDH توتال را به خود اختصاص می‌دهد، درحالی‌که در طی سکته قلبی، میزان LD1 نسبت به LD2 افزایش می‌یابد (نسبت معکوس‌شده[2]). برخلاف آنزیم‌هایی مثل AST، ALT و CK که تغییرات فراوانی در فعالیت آنزیمی بین بافت‌ها نشان می‌دهند، محدوده مقادیر LD بین بافت‌های با بالاترین مقدار (مانند کبد) و بافت‌های با کم‌ترین مقدار (مثل کلیه) تنها حدود ۱/۵ برابر است. نکته حائز اهمیت افزایش چشم‌گیر مقادیر پلاسمایی با میزان کمی آسیب یا تخریب بافتی است. مقادیر LDH در نوزادان و شیرخواران بیش‌ترین مقدار را دارد. مقادیر آن در افراد بالغ کم‌تر است و هیچ اختلافی در بین آن‌ها مشاهده نشده است. همولیز هم LDH توتال و هم نسبت LD1 به LD2 را متأثر می‌سازد. پس از انتقال خون، LDH توتال می‌تواند به‌طور موقتی افزایش یابد، اما در عرض ۲۴ ساعت به مقدار اولیه خود برمی‌گردد. LDH سرم به‌طور متوسط ۳۰ واحد بیش‌تر از پلاسما است که به‌واسطه آزادشدن از پلاکت‌ها است. افزایش لاکتات دهیدروژناز سکته قلبی، بیماری‌های ریوی (مانند آمبولیسم ریوی، انفارکتوس ریوی، پنومونی، نارسایی احتقانی قلب)، بیماری‌های کبدی (مانند هپاتیت، سیروز فعال، نئوپلاسم)، بیماری‌های گلبول‌های قرمز (مانند آنمی همولیتیک، آنمی مگالوبلاستیک، آنمی ناشی از بیماری‌های مزمن، دریچه‌های مصنوعی قلب)، بیماری‌های عضلات اسکلتی (Rai *et al*., 2017) (مانند دیستروفی عضلانی، ورزش‌های شدید اخیر، تروما به عضلات)، بیماری‌های پارانشیم کلیوی (مانند انفارکتوس کلیوی، گلومرولونفریت، نکروز توبولی حاد، دفع پیوند کلیوی، سندروم نفروتیک)، ایسکمی و انفارکتوس روده‌ای، تومورهای بیضه، لنفوما و سایر تومورهای سیستم رتیکولواندوتلیال، بدخیمی‌های ناشی از تومورها، پانکراتیت حاد، سرطان پروستات، اکلامپسی، سرطان‌های متاستاز داده شده (به‌ویژه اگر کبد درگیر شده باشد)، شوک، تشنج، لوکمی، هیپوکسی، شکستگی، انسداد مجاری صفراوی، هیپوتیروئیدیسم، منونوکلئوز عفونی، هیپرترمیا و... سبب افزایش LDH می‌شوند. کاهش لاکتات دهیدروژناز از طریق اندازه‌گیری سطح LDH، به مؤثربودن شیمی‌درمانی علیه سرطان‌ها پی می‌برند، به‌طوری‌که

1. Lactate dehydrogenase

2. Flipped ratio

انتظار می‌رود متعاقب یک شیمی‌درمانی موفق، سطح LDH کاهش یابد (Wang & O'Hare, 2012).

با توجه به اهمیت آنزیم LDH، سنجش این آنزیم از اهمیت بالایی برخوردار است. آزمون‌های مختلفی برای سنجش آنزیم LDH وجود دارد که اغلب آزمون‌ها براساس تولید NADH طراحی شده‌اند؛ مانند آزمون‌های الکتروشیمیایی و بیولومینسانس برای تشخیص NADH از حساسیت بسیار بالایی برخوردارند، اما این روش‌ها بسیار پرهزینه بوده و نیاز به تکنسین‌های آزمایشگاهی باتجربه دارند از طرفی استفاده از روش‌های رنگ‌سنجی کم‌هزینه و سهل‌الوصول است (Han *et al*., 2011).

یکی از موارد مورداستفاده در این پژوهش، بهره‌گیری از نانوذرات است. نانوذرات عبارت‌اند از ذرات اولیه ای که اندازه آن‌ها کم‌تر از ۱۰۰ نانومتر باشد. ذرات در این مقیاس دارای خواص جدیدی هستند که اگر به‌درستی سنتز شوند (Beydoun *et al*., 1999) می‌توانند در زمینهٔ علوم پزشکی، صنایع الکترونیک انرژی زیست فناوری و زیست‌محیطی به‌کار گرفته شوند. نانوذرات فلزی ازجمله طلا، نقره و پلاتین به‌طور گسترده‌ای در پژوهش‌های دارویی به‌کاربرده شده‌اند. در این میان نانوذرات نقره به‌علت نسبت بالای سطح به حجم بیش‌تر موردتوجه پژوهش‌گران قرار گرفته و به‌عنوان ماده‌ای با خاصیت ضدمیکروبی قوی شناخته‌شده است. نانوذرات توسط روش‌های متفاوتی ازجمله امواج میکرو، تجزیه حرارتی روش‌های الکتروشیمیایی و سونوشیمی به‌وسیله پرتوها تولید می‌شوند. اکثر روش‌های تولید نانوذرات گران‌قیمت بوده و در مراحل کار از مواد سمی استفاده می‌شود. به‌دنبال آن، مواد مذکور در ساختار نانوذرات حضورداشته و همین امر سبب عدم استفاده آن‌ها در کاربردهای زیستی می‌شود. به همین علت نیاز است نانوذرات با موادی سنتز شوند که مواد سمی تولید نکنند. سازگاری با محیط‌زیست، هزینه کم‌تر و بازدهی بالاتر اهداف موردنظر را محقق کنند یکی از روش‌های تولید نانوذرات، روش سنتز زیستی است. در این روش‌ها از مواد طبیعی مانند گیاهان و همچنین میکروارگانیسم‌ها به‌منظور سنتز نانوذرات استفاده می‌کنند. گیاهان به‌علت سازگاری که با بدن و محیط‌زیست دارند گزینه مناسبی می‌باشند (Anselmo & Mitragotri, 2016).

نانوذرات دارای خواص فیزیکی شیمیایی، مکانیکی، مغناطیسی، حرارتی دی‌الکتریک و زیستی منحصربه‌فردی می‌باشند کاهش ابعاد نانو روی خواص فیزیکی آن‌ها تأثیرگذار است که این امر آن‌ها را از مواد توده‌ای متمایز می‌سازد (Lewinski *et al*., 2008). با کاهش ابعاد و رسیدن به مقیاس نانو بسیاری از خواص مواد مانند ویژگی‌های فیزیکی (نقطه ذوب، دمای جوش خواص مغناطیسی و ...) و شیمیایی (جذب، نور فعال‌یت، کاتالیستی)، هدایت حرارتی و الکتریکی دستخوش تغییر می‌شود.

گل داوودی در فرهنگ‌های مختلف ازجمله ایران جایگاه ویژه‌ای دارد و علاوه بر مصارف زینتی، در طب سنتی نیز کاربردهای فراوانی دارد. این گیاه به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد میکروبی و ضدسرطانی شناخته‌شده است. گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) به‌دلیل دارابودن ترکیبات مختلف مانند فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و پلی‌ساکاریدها، به‌عنوان یک عامل احیاکننده و تثبیت‌کننده در سنتز نانوذرات نقره از اهمیت بالایی برخوردار است. عصاره این گیاه می‌تواند یون‌های نقره را به نانوذرات نقره با اندازه و مورفولوژی دلخواه تبدیل کند. علاوه بر این، ترکیبات موجود در گل داوودی از تجمع و رشد بیش‌ازحد نانوذرات نقره جلوگیری کرده و پایداری آن‌ها را در محیط افزایش می‌دهد لازم به ذکر است عصاره آبی گل داوودی دارای خاصیت آنتی‌باکتریال نیز می‌باشد. نوآوری این پژوهش عبارت اند از استفاده از گیاه گل داوودی جهت سنتز نانوذرات نقره با هدف استفاده از روش‌های سازگاربا طبیعت در جهت تولید نانوذرات، استفاده از نانوذرات نقره با هدف افزایش سطح تماس با آنزیم لاکتات دهیدروژناز و همچنین سادگی روش و ارزان‌بودن مواد است. در نهایت با تکمیل و مطالعه بیش‌تر این نانوحسگر می‌تواند به‌عنوان ابزاری ارزان، قابل حمل و آسان برای استفاده در محیط‌های بالینی و غیربالینی به‌کار رود.

## مواد و روش‌ها

بوروهیدرید سدیم[1]، نیترات نقره[2] و نمک‌های بافر مورداستفاده در این پژوهش از شرکت Merck آلمان و همچنین آنزیم لاکتات دهیدروژناز از شرکت SIGMA تهیه‌شده است. گل‌های داوودی نیز از طریق گلخانه‌های شهرستان محلات زیر نظر کارشناس جمع‌آوری و با کدهرباریوم (BR۰۰۰۰۰۱۱۶۸۴۵۹۶) مورداستفاده قرار گرفته‌شده است.

1 .$NaBH_4$
2 .$AgNO_3$

### تهیه عصاره

ابتدا در جهت سنتز گیاهی نانوذرات نقره جهت تهیه عصاره آبی ۱۰ گرم از بخش گل گیاه که ابتدا خشک کرده و سپس پودر کرده را به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه‌شده افزوده و به‌مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. سپس توسط دستگاه سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm ناخالصی‌ها جدا شد. در مرحله بعد محلول به‌دست‌آمده از سانتریفیوژ را از کاغذ صافی عبور داده و در نهایت عصاره توسط دستگاه روتاری تغلیظ گردید. عصاره تغلیظ‌شده را در شیشه ساعت ریخته و در آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک و تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شد.

### سنتز نانوذرات

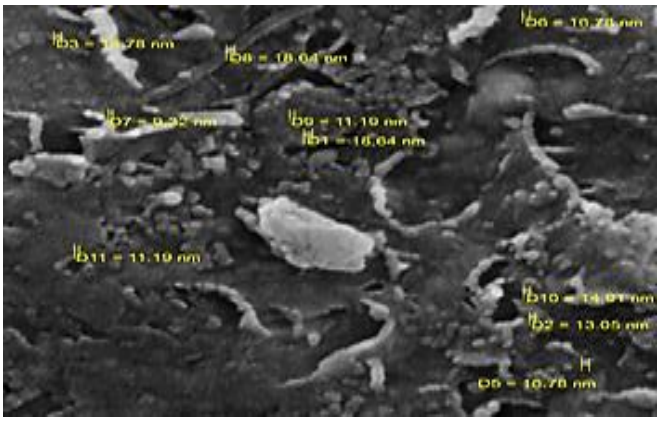
در ادامه باهدف تهیه محلول نیترات نقره ۰/۰۲۵۵۰ گرم از نیترات نقره را به ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه نموده و به همین مقدار عصاره آبی گل داوودی اضافه و سپس از آن غلظت‌های مختلف (۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌مولار) تهیه شد. در ادامه محلول‌های حاصل در غلظت، دما و pH بهینه و به‌مدت یک شبانه‌روز در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد، زیرا نور می‌تواند بر سرعت واکنش و اندازه و مورفولوژی نانوذرات نقره تأثیر بگذارد. تغییر رنگ محلول نشانهٔ سنتز نانوذرات بود این تغییر رنگ از رنگی سفید کدر به قهوه ای مایل به تیره است. بعد از یک شبانه‌روز به‌منظور ته‌نشین شدن نانوذرات، محلول به‌مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ صورت گرفته است. به‌منظور برطرف‌شدن ناخالصی‌ها این عمل سه بار تکرار گردید. درنهایت به رسوب حاصل‌شده دو میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه و جهت خشک‌شدن آن، محلول را بر روی شیشه ساعت ریخته و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه آون قرار گرفت.

### تهیه محلول حسگر زیستی

ابتدا دو ویال تهیه شد، در ویال شماره یک حاوی مخلوط واکنش حاوی ۱۰۰۰ میلی‌مولار HCl–Tris با pH۵/۷، ۰/۱۰ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۱۰ میلی‌مولار $NAD^+$، ۰/۱۰ میلی‌مولار LDH بود، در ویال شماره دو همانند ویال شماره یک تهیه شد، اما در ویال شماره دو آنزیم لاکتات دهیدروژناز اضافه نگردید. اجازه داده شد که واکنش برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط انجام شود تا آنزیم بتواند فعالیت کاتالیزوری خود را انجام دهد و پس از آن ۱۶۰ میکرولیتر نانوذره نقره حاوی عصاره آبی پنج میکرومولار باتوجه به نتایج بهینه‌سازی گل داوودی و همچنین ۱۵ میکرولیتر بوروهیدرید سدیم به ویال‌ها اضافه شد. بقیه غلظت‌ها با توجه به کارایی پایین کنارگذاشته شد. برای مطالعه طیف جذب محلول‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد از اسپکتروفتومتر VIS-UV استفاده می‌شود. جهت اطمینان از عملکرد طیف مختلفی از غلظت‌های مختلف آنزیم لاکتات دهیدروژناز از طریق روش محلول‌سازی تهیه و موردبررسی قرار گرفت. جهت بررسی از ادغام صحیح محلول نهایی حسگر با حضور نانوذرات نقره ابتدا غلظت‌های مختلف آنزیم با نانوذرات بهینه ادغام نموده، سپس جذب را در طول‌موج‌های مختلف مشاهده گردید و موردبررسی قرار گرفت.

## نتایج

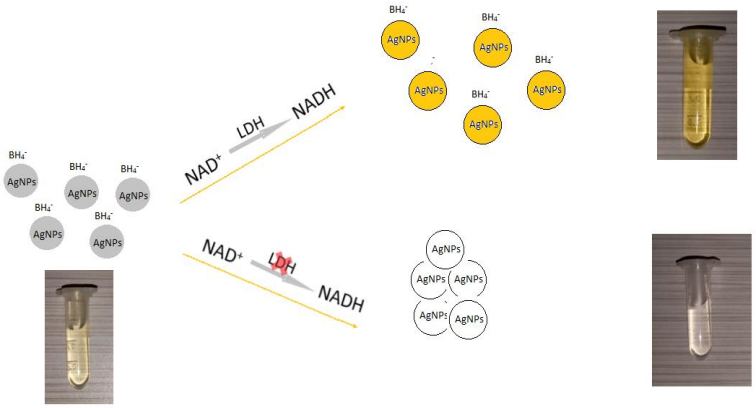
در شکل (۲) شاهد تشکیل نانوذرات نقره سنتزشده به‌روش گیاهی از طریق گل داوودی هستیم، تصاویر گرفته‌شده از نانوذرات نقره توسط میکروسکوپ الکترونی تصویربرداری شده است. شکل نانوذرات نقره همان‌طورکه پیش‌بینی می‌شود کروی و اندازه‌ای کمتر از ۴۳ نانومتر دارد (شکل ۱).



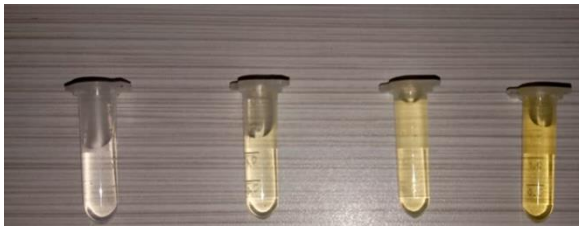

**شکل ۱.** تصاویر گرفته‌شده از نانوذرات نقره توسط میکروسکوپ الکترونی. شکل نانوذرات کروی و اندازه کمتر از ۴۳ نانومتر است.

در شکل (۲) مشاهده می‌گردد که آنزیم لاکتات دهیدروژناز می‌تواند $NAD^+$ را به NADH تبدیل کند و این باعث می‌شود که ویال اول زرد و ویال دوم بی‌رنگ شود. لازم به ذکر است جهت اطمینان از عملکرد غلظت‌های مختلف آنزیم نیز بررسی شد که رنگ‌هایی مابین زرد و بی‌رنگ را در خود نشان داده‌اند (شکل ۳) با افزایش میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز که در محلول نانوذرات نقره سنتزشده گل داوودی وجود دارد، میزان زردی محلول نیز افزایش می‌یابد. این تغییر رنگ از طریق بررسی روند افزایش غلظت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در محلول نانوذرات نقره میسر شد. علت بی‌رنگ‌شدن محلول تجمع نانوذرات نقره در مواجهه با محلول حاوی HCl–Tris با pH۵/۷، $MgCl_2$ می‌باشد. همچنین با مشاهده نتایج جذب با افزایش غلظت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در پیک ۴۰۰ نانومتر میزان جذب افزایش می‌یابد (شکل ۳). در نهایت جذب غلظت‌های مختلف آنزیم لاکتات دهیدروژناز در معرض نانوذرات نقره در جهت بررسی دقیق تر صورت پذیرفت (نمودار ۱).

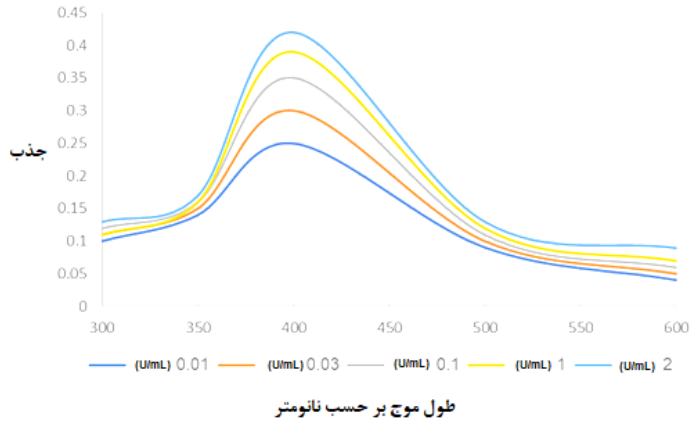
با توجه به نتایج به‌دست‌آمده با افزایش غلظت آنزیم، میزان جذب در طول‌موج ۴۰۰ نانومتر افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده ادغام صحیح نانوذرات نقره در محلول و همچنین عدم تجمع نانوذرات نقره می‌شود (نمودار ۱).




**شکل ۲.** بررسی تغییر رنگ غلظت‌های مختلف آنزیم در معرض نانوذرات نقره بعد از ۱۵ دقیقه



**شکل ۳.** بررسی روند غلظت‌های مختلف آنزیم لاکتات دهیدروژناز در معرض نانوذرات نقره




**نمودار ۱.** بررسی غلظت‌های مختلف آنزیم لاکتات دهیدروژناز در حضور نانوذرات نقره

## بحث و نتیجه‌گیری

تولید نانوذرات فلزی و نانو ساختارها به‌علت خواص نوری، شیمیایی، فتوشیمیایی و الکتریکی غیرمعمولی که دارند مورد توجه قرار گرفته است. فلزاتی مانند طلا و نقره که رزونانس پلاسمون سطحی قوی ای دارند بسیار حائز اهمیت هستند. ذرات نانوکریستال نقره کاربرد های عمده‌ای در تشخیص مولکول های زیستی بسیار حساس، فعالیت ضد میکروبی، درمان، کاتالیز و ساخت حسگرها دارند. با توجه به مشکلات عمده‌ای که در روش‌های شیمیایی و فیزیکی برای تولید نانوذره وجود دارد نیاز به روش‌هایی آسان، کم‌هزینه، غیرسمی، سازگار با محیط‌زیست وجود دارد (Li *et al*., 2022).

روش‌های فیزیکی تولید نانوذرات نیازمند صرف انرژی بالایی بوده و روش شیمیایی منجر به باقی ماندن مقداری از واکنش‌های سمی و عدم استفاده از ذرات حاصل در کاربردهای زیستی می‌شود به همین دلیل به‌تازگی بیوسنتز نانوذرات به‌وسیله گیاهان، قارچ‌ها، باکتری‌ها به‌عنوان روش زیست سازگار و سبز موردتوجه بسیاری از پژوهش‌گران قرارگرفته است. استفاده از گیاهان به‌دلیل هزینه پایین، ایمنی، غیر سمی و سازگار با محیط می تواند جایگزین بهتری برای روش‌های قبلی تولید نانوذرات شوند (Ragunathan *et al*., 2022).

گل داوودی یکی از گیاهان دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا به‌شمار می‌آید. این گل از مهم‌ترین گیاهان زینتی است که علاوه بر گل بریدنی، به‌عنوان گیاه گلدانی و دارویی مورداستفاده قرار می‌گیرد. گزارش‌های موجود بیانگر حضور ترکیبات زیستی و آنتی‌اکسیدانی متفاوت در ارقام مختلف گل داوودی است. همچنین خواص زیستی فراوانی مثل ضدالتهاب، ضد باکتری و ضدویروس برای این گیاه شناخته‌شده است ( Lin *et al*., 2010). Hodaei (2019) خواص آنتی‌اکسیدانی ۱۲ رقم گل داوودی را بررسی نمود. به‌طورکلی نتایج حاصله نشان از فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی اکثر ارقام موردبررسی داشت؛ بنابراین می‌توان عصاره برگ‌های گیاه داوودی را به‌عنوان یک منبع مناسب آنتی‌اکسیدان طبیعی معرفی نمود ( Hodaei *et al*., 2019). در پژوهش حاضر، یک رقم گل داوودی با نام نادیا برای طراحی نانوذرات نقره موردبررسی قرار گرفت که خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌ملاحظه‌ای نشان داد. تاکنون پژوهش‌های مختلفی باهدف تشخیص با حساسیت بالا برخی از آنزیم‌ها صورت گرفته است.

در پژوهشی که در سال ۲۰۲۲ با عنوان ایمونوسنسور الکتروشیمیایی برای تشخیص لاکتات دهیدروژناز با استفاده از واکنش کاتالیزوری مبتنی بر آنالیز بر روی نانولوله‌های کربنی چندجداره و الکترود کربن اصلاح‌شده نانوذرات طلا انجام شده است. نانولوله‌های کربنی چند جداره و الکترودهای اصلاح‌شده نانوذرات طلا حساسیت بالایی برای تشخیص لاکتات دهیدروژناز در محدوده ۰/۰۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر تا ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، با حد تشخیص پایین ۰/۳۹ نانوگرم در میلی‌لیتر لاکتات دهیدروژناز را نشان داد که نتایج نشان‌دهنده پتانسیل سیستم ایمینوسنسورها تشخیص دقیق و حساس LDH است که یک نشانگر زیستی مهم برای بیماری‌ها و شرایط مختلف است (Yi *et al*., 2022).

در پژوهشی دیگر در سال ۲۰۲۲ با عنوان سنتز سبز نانوذرات نقره از عصاره آبی بلال ذرت برای تشخیص رنگ سنجی سیستئین در سرم شبیه‌سازی‌شده با نمونه سیستئین از نانوذرات نقره به‌عنوان یک عامل تثبیت‌کننده برای بهره‌گیری از روش رنگ سنجی تشخیص سیستئین استفاده شد. همچنین در این پژوهش عصاره آبی ذرت توانایی سنتز مناسب نانوذرات نقره را نشان داد (Ragunathan *et al*., 2022).

در بررسی که در سال ۲۰۱۹ با عنوان نانو بیوسنسور برای تشخیص فعالیت لاکتات دهیدروژناز با استفاده از فلورسانس و روش تهیه و کاربرد آن صورت گرفته است به بررسی نقش نانو مبتنی بر لومینسانس پرداخته شد که پژوهش‌گران نقش نانو را جهت سیگنال دهی مناسب در تصویربرداری فلورسانس مشاهده کردند (Krishnan *et al*., 2019).

در پژوهش دیگر که در سال ۲۰۰۸ صورت پذیرفت پژوهش‌گران با استفاده از نانو الیاف الکترو اسپین به بررسی لاکتات پرداختند که با بهره‌گیری از این نانو الیاف به طراحی حسگری برای تشخیص لاکتات اقدام نمودند و نتایج را در جذب نور uv در ۳۴۰ نانومتر مشاهده کردند. در اثر استفاده از این نانوالیاف مقدار جذب لاکتات به میزان قابل‌توجهی افزایش‌یافته است (Moreno *et al*., 2008).

در پژوهشی که در سال ۲۰۰۸ با عنوان طراحی و بهینه‌سازی بیوسنسور آمپرومتریک لاکتات بر پایه لاکتات اکسیداز متصل به ماتریس پلیمری صورت گرفت، بیوسنسور لاکتات، که با استفاده از لاکتات اکسیداز ثابت‌شده در یک هیدروژل متشکل از آلبومین و موسین با گلوتارآلدئید تولید شده است، عملکرد بسیار خوبی در تشخیص لاکتات نشان داد (Romero *et al*., 2008).

در سال ۲۰۱۲ روش تهیه بیوسنسور دهیدروژناز–الکتروشیمیایی موردبحث قرار گرفت که در آن سطح یک الکترود چاپ‌شده روی صفحه تهیه می‌شود. ماده کامپوزیت با ترکیب اجزای مختلف، ازجمله یک نانو ماده کربن، یک واسطه الکترونیکی، یک پلیمر مولکولی بالا، دهیدروژناز، کوآنزیم و محلول بافر تهیه شد که نتایج قابل‌قبولی را مبتنی بر الکترود نشان داد (Marzuki *et al*., 2012).

در فعالیت پژوهشی که در سال ۲۰۱۸ با عنوان بیوسنسور دوگانه الکتروشیمیایی گلوکز و لاکتات صورت پذیرفت یک بیوسنسور حساس برای تشخیص گلوکز و لاکتات، مبتنی بر پیرولوکینولین کینون، گلوکز دهیدروژناز و لاکتات دهیدروژناز که بر روی نانولوله‌های کربنی چندجداره طراحی و نتایج قابل‌قبولی خود را نشان داد (Sarreal & Slaughter, 2018). در این پژوهش‌ها با وجود اینکه برخی دارای نتایج قابل‌قبولی هستند، اما عدم سهل‌الوصول‌بودن مواد و هزینه بالا از نقاط ضعف آن‌ها است.

مکانیسم عمل حسگر در شکل (۳) نشان داده شده است. استفاده از $NaBH_4$ در سنتز نانوذرات نقره سبب می‌شود که اطراف نانوذرات نقره بار منفی ایجاد شود که این بارهای منفی به‌دلیل دافعه‌ای که به‌وجود می‌آوردند سبب می‌شوند که نانوذرات نقره به‌صورت مجزا باقی بمانند و تجمع نیابند به عبارتی سبب پایداری نانوذرات نقره می‌شود. در حضور آنزیم لاکتات دهیدروژناز $NAD^+$ که در محیط وجود دارد تبدیل به NADH می‌شود و به‌دلیل عدم حضور $NAD^+$ که دارای بار مثبت است نانوذرات نقره به حالت مجزا و پراکنده در محلول و به‌عبارتی پایدار باقی می‌مانند، اما در عدم حضور آنزیم، $NAD^+$ نمی‌تواند به NADHتبدیل شود و چون $NAD^+$ که باردار است در محیط وجود دارد سبب خنثی‌شدن بار منفی اطراف نانوذرات می‌شود و نانوذرات نقره دیگر پایدار نیستند و تجمع می‌یابند و تجمع نانوذرات سبب می‌شود رنگ محلول از زرد به بی‌رنگ تغییر یابد.

نتایج پژوهش نشان داد که فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در حضور غلظت بالای پیرروات، منجر به تبدیل $NAD^+$ به NADH و ایجاد بار مثبت بر روی نانوذرات نقره می‌شود. این بار مثبت از تجمع نانوذرات نقره در محلول جلوگیری کرده و باعث پراکندگی ذرات آن‌ها می‌گردد و عدم تجمع نانوذرات موجب پایداری آن‌ها و تغییر رنگ به رنگ زرد می‌شود. اما در عدم حضور آنزیم، نانوذرات به‌دلیل داشتن بار منفی که در اثر NaBH4 است، به‌صورت غیر پایدار هستند و تجمع می‌یابند و موجب بی‌رنگ‌شدن محلول در شرایط آزمایشگاهی می‌گردد.

نانوذرات فلزی به‌دلیل نسبت سطح به حجم بسیار بالا و خواص ذاتی خود، طیف وسیعی از ویژگی‌های منحصربه‌فرد نوری، الکتریکی و مغناطیسی از خود نشان می‌دهند. این خواص، نانوذرات را به ابزاری ارزشمند برای طیف گسترده‌ای از کاربردها، ازجمله حسگری تبدیل می‌کند. از این‌رو، برای کاهش هزینه‌های مصرفی از گل داوودی برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شد. این گیاه می‌تواند نقش عامل تثبیت‌کننده را در سنتز نانوذرات نقره ایفا کنند و به کنترل اندازه و مورفولوژی نانوذرات کمک کنند رنگ نانوذرات فلزی به‌طور مستقیم با اندازه آن‌ها مرتبط است. این پدیده، که به‌عنوان پلاسمونیک سطحی شناخته می‌شود، اساس روش‌های حسگری مبتنی بر نانوذرات فلزی را تشکیل می‌دهد. با اندازه‌گیری تغییرات رنگ نانوذرات، می‌توان اطلاعات مربوط به محیط اطراف آن‌ها را به‌دست آورد. در مطالعه حاضر، از نانوذرات نقره برای توسعه یک روش حسگری ساده و ارزان برای تشخیص با حساسیت بالا آنزیم لاکتات دهیدروژناز استفاده شد. این آنزیم نقش کلیدی در متابولیسم گلوکز دارد و کمبود آن می‌تواند منجر به مشکلات سلامتی، به‌ویژه در نوزادان شود. روش مورداستفاده در این مطالعه بر اساس تبدیل $NAD^+$ به NADH توسط آنزیم لاکتات دهیدروژناز است. این تبدیل باعث ایجاد بار منفی بر روی نانوذرات نقره می‌شود که از تجمع آن‌ها جلوگیری می‌کند. در غیاب این آنزیم، نانوذرات نقره تجمع یافته و رنگ محلول تغییر می‌کند.

نتایج این مطالعه نشان داد که با استفاده از روش رنگ‌سنجی ساده، می‌توان به‌طور مؤثری با حساسیت بالا آنزیم لاکتات دهیدروژناز را تشخیص داد. این روش در مقایسه با روش‌های سنتی، مزایای متعددی ازجمله سادگی، ارزان بودن و سرعت بالا دارد.

## تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

## References


Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2016). Nanoparticles in the clinic. *Bioengineering & translational medicine*, *1*(1), 10-29.

Beydoun, D., Amal, R., Low, G., & McEvoy, S. (1999). Role of nanoparticles in photocatalysis. *Journal of nanoparticle Research*, *1*, 439-458.

Ding, J., Karp, J. E., & Emadi, A. (2017). Elevated lactate dehydrogenase (LDH) can be a marker of immune suppression in cancer: Interplay between hematologic and solid neoplastic clones and their microenvironments. *Cancer Biomarkers*, *19*(4), 353-363.

Han, X., Gelein, R., Corson, N., Wade-Mercer, P., Jiang, J., Biswas, P., ... & Oberdörster, G. (2011). Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity. *Toxicology*, *287*(1-3), 99-104.

Hodaei, M., Rahimimalek, M., & Arzani, A. (2019). Evaluation of some bioactive compounds and antioxidant activity of methanolic leaf extract and amount of flower essential oil of different cultivars of chrysanthemum plant .Plant Production Research Journal, 25)4), 133-143. (in Persian)

Hohorst, H. J. (1965). L-(+)-lactate: determination with lactic dehydrogenase and DPN. In *Methods of enzymatic analysis* (pp. 266-277). Academic Press.

Krishnan, S. K., Singh, E., Singh, P., Meyyappan, M., & Nalwa, H. S. (2019). A review on graphene-based nanocomposites for electrochemical and fluorescent biosensors. *RSC advances*, *9*(16), 8778-8881.

Lewinski, N., Colvin, V., & Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *small*, *4*(1), 26-49.

Li, H., Cai, Q., Yan, X., Jie, G., & Jie, G. (2022). Ratiometric electrochemical biosensor based on silver nanoparticles coupled with walker amplification for sensitive detection of microRNA. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *353*, 131115.

Lin, L. Z., & Harnly, J. M. (2010). Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Food Chemistry*, *120*(1), 319-326.

Marzuki, N., Bakar, F. A., Salleh, A. B., Heng, L. Y., Yusof, N. A., & Siddiquee, S. (2012). Electrochemical biosensor immobilization of formaldehyde dehydrogenase with nafion for determination of formaldehyde from Indian mackerel (Rastrelliger kanagurta) fish. *Current Analytical Chemistry*, *8*(4), 534-542.

Moreno, I., Romero-García, J., González-González, V., Ledezma-Pérez, A., Moggio, I., & Marin, E. A. (2008). Electrospun nanofibrous membrane biosensor for lactate. In *Nsti Nanotech* (Vol. 2, p. 302).

Petrelli, F., Cabiddu, M., Coinu, A., Borgonovo, K., Ghilardi, M., Lonati, V., & Barni, S. (2015). Prognostic role of lactate dehydrogenase in solid tumors: a systematic review and meta-analysis of 76 studies. *Acta oncologica*, *54*(7), 961-970.

Ragunathan, S. C. B., Rejeeth, C., Muthusamy, G., Abdulhaniff, P., & Palvannan, T. (2022). Green synthesis of silver nanoparticles from corn cob aqueous extract for colorimetric cysteine detection in serum simulated with cysteine samples. *Optik*, *264*, 169381.

Rai, G., Brimacombe, K. R., Mott, B. T., Urban, D. J., Hu, X., Yang, S. M., ... & Maloney, D. J. (2017). Discovery and optimization of potent, cell-active pyrazole-based inhibitors of lactate dehydrogenase (LDH). *Journal of medicinal chemistry*, *60*(22), 9184-9204.

Romero, M. R., Garay, F., & Baruzzi, A. M. (2008). Design and optimization of a lactate amperometric biosensor based on lactate oxidase cross-linked with polymeric matrixes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *131*(2), 590-595.

Sarreal, R., & Slaughter, G. (2018, April). Dual Glucose and Lactate Electrochemical Biosensor. In *2018 IEEE 13th Annual International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (NEMS)* (pp. 64-67). IEEE.

Wang, Q., & O'Hare, D. (2012). Recent advances in the synthesis and application of layered double hydroxide (LDH) nanosheets. *Chemical reviews*, *112*(7), 4124-4155.

Yi, Y., Li, Y., Li, W., Cheng, M., Wu, M., Miao, J., ... & Xu, Y. (2022). Electrochemical Immunosensor for Lactate Dehydrogenase Detection Through Analyte-driven Catalytic Reaction on Multi-walled Carbon Nanotubes and Gold Nanoparticle Modified Carbon Electrode. *Electroanalysis*, *34*(7), 1187-1192.

Zhang, H., Xu, Z., Shen, J., Li, X., Ding, L., Ma, J., ... & Chu, P. K. (2015). Effects and mechanism of atmospheric-pressure dielectric barrier discharge cold plasmaon lactate dehydrogenase (LDH) enzyme. *Scientific Reports*, *5*(1), 10031.