



Shahid Bahonar
University of Kerman



Iranian
Biotechnology Society

Evaluation of antioxidant properties of essential oil, aqueous extract and metal nanoparticles biosynthesized from *F. vulgare* and their anticancer effect on two breast cancer cell lines (Sum-159, Hs-578T)

Shima Bourang 

Ph.D. Student, Department of Plant Genetics and Production Engineering, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: sh.bourang@gmail.com

Sodabeh Jahanbakhsh-Godekahriz 

*Corresponding author. Professor, Department of Plant Genetics and Production Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: jahanbakhsh@uma.ac.ir

Rasool Asghari-Zakaria 

Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: r-asghari@uma.ac.ir

Hamed Parsa-Khankandi 

Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Ardabil, Iran. E-mail address: h.parsa@arums.ac.ir

Mehran Noruzpour 

Ph. D. Student, of Agricultural Biotechnology, Department of plant genetics and production engineering, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: m.noruzpuor@gmail.com

Jesús Calahorra 

GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer University of Granada, Andalusian Regional Government, 18016 Granada, Spain. E-mail address: jesus.calahorra@genyo.es

Abstract

Objective

Breast cancer is still the most common cancer among women all over the world. Considering the medicinal and therapeutic properties of *F. vulgare*, in this research, first, the morphological and structural characteristics of metal nanoparticles biosynthesized from the aqueous extract of *F. vulgare* and then the antioxidant and anticancer properties of essential oil, aqueous extract and the biosynthesized nanoparticles were investigated.

Materials and methods

In this research, after the biosynthesis of iron, copper, zinc, and silver nanoparticles from the aqueous extract of fennel plant (*F. vulgare*) and their properties in terms of size with XRD and confirmation of the structure by FTIR, the amount of secondary metabolites, the amount of antioxidant and anticancer activity of the essential oil And the aqueous extract of fennel plant (*F. vulgare*) and iron, copper, zinc and silver nanoparticles biosynthesized from it were evaluated on

the Sum-159 and the Hs-578T cell lines. The experiment was conducted in a completely randomized design with three replications. Graphpad and FlowJ software were used to study cell viability and flow cytometry results, respectively.

Results

According to the results obtained from DLS of biosynthesized metal nanoparticles, the sizes of iron, copper, zinc, and silver nanoparticles were 35, 32, 33, and 34 nm, respectively. The results of FTIR also confirmed the existence of the synthesized metal nanoparticles. Also, according to the results of HPLC and spectrophotometry, the presence of biochemical compounds such as flavonoid and anthocyanin and metabolites such as rutin, quercetin, and kaempferol in the aqueous extract of fennel plant was confirmed. In terms of antioxidant activity, a significant difference was observed between different treatments, it was also observed that with the increase in the concentration of the treatments, the amount of their antioxidant activity also increased, and the highest amount of antioxidant activity of each treatment was related to the highest concentration of each treatment. The highest amount of antioxidant activity (87.41%) was related to copper nanoparticles at a concentration of 500 mg/ml. In terms of the IC₅₀ value of the mentioned treatments, it was also found that the Sum-159 cell line had higher resistance compared to the Hs-578T cell line against equal concentrations of different treatments. The results of anticancer properties demonstrated that in Sum-159 cell line, the highest pre-apoptotic and post-apoptotic rates were 4.31% and 17.56%, respectively, related to silver nanoparticle treatment. While, in the case of Hs-578 cell line, the highest rate of pre-apoptotic and post-apoptotic are respectively 4.5% and 18.7% related to silver treatment.

Conclusions

According to the obtained results, the amount of anticancer properties of essential oil and water extract of fennel plant and iron, copper, zinc, and silver nanoparticles biosynthesized from it showed that the percentage of necrotic cells, the percentage of cells in the pre-apoptotic and post-apoptotic stages significantly influenced with the type of treatment used, the type of cell line and their interaction.

Keywords: Aqueous extract, Breast cancer, *F. vulgare*, Hs-578T, Sum-159

Paper Type: Research Paper.

Citation: Bourang Sh, Jahanbakhsh-Godekahriz S, Asghari-Zakaria R, Parsa-Khankandi H, Noruzpour M, Calahorra J (2024) Evaluation of antioxidant properties of essential oil, aqueous extract and metal nanoparticles biosynthesized from *F. vulgare* and their anticancer effect on two breast cancer cell lines (Sum-159, Hs-578T). *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (1), 235-266.

Agricultural Biotechnology Journal 16 (1), 235-266. DOI: 10.22103/jab.2024.22652.1531

Received: December 21, 2023.

Received in revised form: January 19, 2024.

Accepted: January 20, 2024.


Published online: February 20, 2024.




Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors


ارزیابی میزان خواص آنتی اکسیدانی اسانس، عصاره‌ی آبی و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از گیاه رازیانه (*F. vulgare*) و اثر ضدسرطانی آن‌ها بر روی دو لاین سلولی سرطان پستان (Hs-578T و Sum-159)

شیما بورنگ 


دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، اردبیل، ایران. رایانامه: shbourang@gmail.com

سدابه جهانبخش گده کهرئز 


*نویسنده مسئول: استاد، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، اردبیل، ایران. رایانامه: jahanbakhsh@uma.ac.ir

رسول اصغری زکریا 


استاد، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، اردبیل، ایران. رایانامه: r-asghari@uma.ac.ir

حامد پارسا خانکندی 

استادیار، دانشگاه علوم پزشکی، واحد اردبیل، دانشکده داروسازی، گروه فارماکوجنزی، اردبیل، ایران. رایانامه: h.parsa@arums.ac.ir

مهرا ن نوروزپور 

دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، اردبیل، ایران. رایانامه: m.noruzpuor@gmail.com

خوسس کالاهورا 

GENYO، مرکز تحقیقات ژنومیک و انکولوژی فایزر، دانشگاه گرانادا، دولت منطقه‌ای اندلس، ۱۸۰۱۶ گرانادا، اسپانیا. رایانامه: jesus.calahorra@genyo.es

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۳۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۳۰

چکیده

هدف: سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان در بین زنان در سراسر جهان است. با توجه به خواص دارویی و درمانی گیاه رازیانه، در این پژوهش، ابتدا ویژگی‌های مورفولوژیکی و ساختاری نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه رازیانه و سپس خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی اسانس، عصاره‌ی آبی و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش پس از بیوسنتز نانوذرات آهن، مس، روی و نقره از عصاره آبی گیاه رازیانه (*F. vulgare*) و بررسی خواص آن‌ها از نظر اندازه به کمک پراش اشعه ایکس (XRD) و تأیید ساختار به کمک طیف‌سنجی تبدیل فوریه فرسوخ (FTIR)، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی اسانس و عصاره آبی گیاه رازیانه (*F. vulgare*) و نانوذرات آهن، مس، روی و نقره بیوسنتز شده از آن بر روی دو لاین سلولی Sum-159 و Hs-578T مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. جهت بررسی میزان زنده‌مانی سلولی و نتایج فلوسیتومتری به ترتیب از نرم‌افزار Graphpad و FlowJ استفاده شد.

نتایج: طبق نتایج به دست آمده از XRD نانوذرات فلزی بیوسنتز شده، به ترتیب اندازه نانوذرات آهن، مس، روی و نقره برابر با ۳۵، ۳۲، ۳۳ و ۳۴ نانومتر بود. نتایج حاصل از FTIR نیز وجود نانوذرات فلزی مذکور را تأیید کردند. همچنین طبق نتایج به دست آمده از HPLC و اسپکتوفتومتری وجود ترکیبات بیوشیمیایی نظیر فلاونوئید و آنتوسیانین و متابولیت‌هایی نظیر روتین، کوئرستین و کمپفرول در عصاره آبی گیاه رازیانه تأیید شدند. از نظر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده شد هم‌چنین مشاهده شد که با افزایش غلظت تیمارها میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نیز افزایش داشت و بیشترین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر تیمار مربوط به بالاترین غلظت هر تیمار بود. بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۸۷/۴۱ درصد) مربوط به نانوذره مس در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. از نظر میزان IC_{50} تیمارهای ذکر شده نیز مشخص شد که لاین سلولی سلولی Sum-159 در مقایسه با لاین سلولی Hs-578T در مقابل غلظت‌های برابر تیمارهای مختلف مقاومت بالاتری داشت. نتایج حاصل از بررسی خواص ضدسرطانی نشان دادند که در لاین سلولی Sum-159 بیشترین میزان پیش‌آپوپتوزی و پس‌آپوپتوزی به ترتیب ۴/۳۱ و ۱۷/۵۶ درصد مربوط به تیمار نانوذره نقره بوده‌است. این درحالی‌است که، در مورد لاین سلولی Hs-578، بیشترین میزان پیش‌آپوپتوزی و پس‌آپوپتوزی به ترتیب ۴/۵ و ۱۸/۷ درصد مربوط به تیمار نقره می‌باشد.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج به دست آمده میزان خواص ضدسرطانی اسانس و عصاره آبی گیاه رازیانه و نانوذرات آهن، مس، روی و نقره بیوسنتز شده از آن نشان داد که در صد سلول‌های نکروزه شده، در صد سلول‌های موجود در مرحله پیش‌آپوپتوزی و پس‌آپوپتوزی به طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع تیمار مورد استفاده شده، نوع لاین سلولی و اثر متقابل آن‌ها قرار گرفت.

کلیدواژه‌ها: رازیانه، سرطان پستان، عصاره آبی، Hs-578T و Sum-159

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: بورنگ شیمیا، جهانبخش گده‌کهریز سدابه، اصغری زکریا رسول، پارسا خانکندی حامد، نوروزپور مهران، کالاهورا خوسس (۱۴۰۳) ارزیابی میزان خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس، عصاره آبی و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از گیاه رازیانه (*F. vulgare*) و اثر ضدسرطانی آن‌ها بر روی دو لاین سلولی سرطان پستان (Sum-159 و Hs-578T). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی* ۱۶(۱)، ۲۶۶-۲۳۵.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

سرطان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در جهان بوده و یکی از موانع اصلی افزایش امید به زندگی محسوب می‌شود (Hassanpour & Dehghani 2017). سرطان در اثر تغییرات زیادی در داخل بدن موجودات زنده و در محیط ایجاد می‌شود (Mohammadabadi and Mozafari 2018). DNA بیشتر مهره‌داران، به ویژه پستانداران از نظر دی‌نوکلئوتیدهای CpG تخلیه می‌شود (Barazandeh et al. 2016a). CpG‌های باقیمانده که در نواحی DNA جمع می‌شوند، عموماً به عنوان جزایر CpG (CGIs) نامیده می‌شوند. علاقه فزاینده‌ای به CGI وجود دارد، زیرا آن‌ها در پروموتورهای ژن‌ها تجمع یافته‌اند (Barazandeh et al. 2016a) و با تغییر متیلاسیون DNA در CGI‌ها، نقش مهمی در تنظیم بیان ژن و خاموش کردن ژن در فرآیندهای بیولوژیکی، از قبیل غیرفعال‌سازی کروموزوم X، ایمپرینتینگ، خاموش کردن انگل‌های درون ژنومی ایفا می‌کنند (Barazandeh et al. 2016b) و به طور قابل توجهی به کشف علل اپی ژنتیکی سرطان کمک می‌کنند (Zarrabi et al. 2020). سرطان پستان (Breast Cancer) شایع‌ترین نوع سرطان و عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در بین بانوان در سراسر جهان است (Waks & Winer 2019). میزان بقای سرطان پستان بین کشورها و در داخل کشورها به طور گسترده نابرابر می‌باشد. تقریباً ۸۰ درصد مرگ و میر ناشی از سرطان پستان و دهانه رحم در کشورهای کم درآمد و متوسط گزارش شده است (Sun et al. 2017). در چند دهه گذشته روش‌های مختلفی جهت درمان این بیماری ابداع شده است که از جمله آن می‌توان به روش جراحی، شیمی درمانی، پرتودرمانی، هورمون درمانی، ایمونوتراپی و پیوند سلول‌های بنیادی (پیوند مغز استخوان) اشاره نمود (Keidar 2015). هر یک از این روش‌های درمانی دارای معایب و عوارض جانبی خاص خود هستند که آن‌ها را به برنامه‌ای نامناسب تبدیل می‌کند (Warrington et al. 2019). استفاده از ترکیبات گیاهی مناسب با عوارض جانبی کم و همچنین ایجاد راهکاری به منظور افزایش جذب این ترکیبات توسط بافت سرطانی (هدف) و کاهش جذب آن توسط بافت‌های نرمال (غیرهدف) جهت درمان سرطان ضروری به نظر می‌رسد (Wang et al. 2022). در سال‌های اخیر پیشرفت‌هایی در زمینه نانو تکنولوژی جهت سنتز نانوناقل‌هایی با قابلیت ارسال هدفمند دارو به بافت سرطانی به سرانجام رسیده است (Jin et al. 2020). نانوذرات به دلیل اندازه کوچک (۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر) با چگالی و بار سطحی بالای خود، سطح تماس بالایی داشته که امکان اتصال به ترکیبات آلی از جمله DNA، RNA، پپتیدها، آپتامرها و آنتی بادی‌ها را تسهیل می‌کند (Tao et al. 2021). انواع مختلفی از نانوذرات جهت درمان بیماری سرطان وجود دارند که از جمله آن می‌توان به نانوذرات آلی، معدنی (از جمله پرکاربردترین آن فلزی) و ترکیبی (ترکیب دو نوع نانوذره آلی و معدنی) اشاره نمود که هر کدام از آن‌ها ویژگی‌ها و مزایای منحصر به فرد خود را در درمان تومورها تظاهر می‌نمایند (Modena et al. 2019). از جمله نانوذرات فلزی پرکاربرد که در سطح تحقیقاتی جهت درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفته است می‌توان به نانوذرات طلا، نقره، پلاتین، مس، پالادیم، روی، نیکل و آهن اشاره نمود (Ajinkya et al. 2020). از جمله نانوذرات فلزی پرکاربرد در برنامه‌های تحقیقاتی جهت مقابله با سلول‌های سرطانی و برنامه دارورسانی هدفمند استفاده از نانوذرات اکسید آهن می‌باشد (Soetaert et al. 2020). انواع مختلفی از نانوذرات مبتنی بر اکسید

آهن شامل مگنتیتها (Fe_3O_4)، ماگمیتها (Fe_2O_3) و فریت‌های مخلوط ($M-Fe_2O_4$)، که در آن M می‌تواند Ni، Mn، Co یا Zn باشد است (Alphandéry 2020). فعالیت ضدتوموری نانوذرات آهن سنتز شده اساساً با استفاده از ارزیابی میزان سمیت سلولی این نانوذرات در شرایط آزمایشگاهی مشخص می‌شود (Zhao et al. 2018). در پژوهش‌های مختلفی میزان ممانعت از رشد چندین نوع از لاین‌های سلول سرطانی از جمله لوسمی (لاین سلولی Jurkat) (Yan et al. 2015)، سرطان پستان (لاین سلولی MCF-7) (Khaniabadi et al. 2017)، سرطان دهانه رحم (لاین سلولی HeLa) (Popescu et al. 2020) و سرطان کبد (لاین سلولی HepG2) (Ahamed et al. 2016) توسط نانوذرات آهن بیوسنتز شده گزارش شده است. مس به عنوان یک ریزمغذی ضروری، به عنوان یک کوآنزیم نقش مهمی در عملکرد آنزیم‌ها و در نهایت رشد، نمو گیاهان و همچنین مقابله با انواع بیماری‌ها و مقابله با آفات دارند (Bost et al. 2016). نانوذرات اکسیدمس به طور انتخابی آپوپتوز سلولی را در سلول‌های توموری القا نموده و با ممانعت از رشد سلولی، فرایند متاستاز ملانوم را القا می‌نمایند (Naz et al. 2020). گزارشات متعددی در مورد استفاده از نانوذرات اکسیدمس جهت مقابله با سلول‌های سرطانی پروستات، پستان، کبد، مغز، کلیه، روده بزرگ و ریه در سطح آزمایشگاهی و گاهی بالینی ارائه شده است (Gopinath et al. 2016). نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) نوعی از نانوذره اکسید فلزی است که ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی دارد و جزء ترکیب معدنی با ارزش و همه کاره می‌باشد (Bandeira et al. 2020). طبق نتایج ارائه شده استفاده از نانوذرات روی در بدن انسان به دلیل سمیت پایین و زیست سازگارپذیری بالا، جهت دارورسانی هدفمند بسیار ارزشمند می‌باشد (Gur et al. 2022). علاوه بر این، واکنش‌پذیری نانوذرات اکسیدروی در محیط‌های اسیدی (pH زیر ۵/۵ و شبیه به میزان pH سلول‌های توموری) افزایش یافته و به سرعت یون‌های Zn^{+2} آزاد می‌کنند که موجب بروز اختلال در عملکرد میتوکندری سلول‌های توموری، فوران ROS، پراکسیداسیون لیپیدی، آسیب به DNA و در نهایت بروز مرحله آپوپتوز سلولی در سلول‌های هدف توموری می‌شوند (Islam et al. 2022). در پژوهشی Sadhukhan et al. (2019) از نانوذرات اکسیدروی جهت انتقال هدفمند کوئرستین به سلول‌های سرطان پستان انسان (MCF-7) استفاده کردند. آن‌ها نانوذرات اکسیدروی کوئرستین (PBA) را که با کوئرستین بارگذاری شده بودند، سنتز نمودند. همچنین گزارش نمودند که استفاده از نانوذرات اکسید روی جهت دارورسانی هدفمند به سلول‌های هدف (MCF-7) از کارایی بالایی برخوردار است (Sadhukhan et al. 2019). نانوذرات نقره با اندازه‌های بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر به دلیل ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد خود در صنایع مختلف از جمله پزشکی (به عنوان عوامل ضد سرطان و مهار و نابودی تومورهای سرطانی)، صنایع غذایی، بهداشت، کشاورزی، صنعت دارو سازی و دارورسانی کاربرد دارد (Bruna et al. 2021). گزارش شده است که یون‌های نقره غشای خارجی سلول هدف (سرطانی) را مختل می‌کنند (Jabeen et al. 2021). یون‌های نقره با پروتئین‌های گروه تیول واکنش داده و منجر به غیرفعال شدن باکتری‌ها می‌شود (Kędziora et al. 2018). در یکی از مطالعات، تأثیر نانوذرات نقره بیوسنتز شده از عصاره دانه زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) بر روی رده سلولی

آدنوکار سینوم پستان انسان (MCF-7) و خط آدنوکار سینوم پستان انسان (AU565) مورد مطالعه قرار گرفت و گزارش شد که نانوذرات نقره بیوسنتز شده اثرات ضدسرطانی بسیاری بر روی هر دو نوع سرطان داشتند (Dinparvar et al. 2020). روش‌های مختلفی جهت سنتز انواع نانوذرات فلزی وجود دارد که می‌توان به روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی اشاره نمود (Jamkhande et al. 2019). روش بیولوژیکی به معنای سنتز نانوذرات با استفاده از باکتری، قارچ، جلبک، مخمر و گیاهان است (Shnoudeh et al. 2019). قسمت‌های مختلف گیاهان از جمله برگ، ساقه، ریشه، شاخساره، گل، پوست، دانه و هم‌چنین متابولیت‌های ثانویه حاصل از آن‌ها جهت بیوسنتز نانوذرات فلزی مورد استفاده قرار گرفته است (Mughal et al. 2021).

گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) سرشار از ترکیبات فلاونوئیدی به خصوص کوئرستین است که دارای خواص ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. کوئرستین موجود در اندام هوایی و بذر این گیاه به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی موجب کلات شدن فلزات و مهار رادیکال‌های آزاد می‌شوند. فلاونوئیدها مرجع اصلی برخی از ایزوفلاونوئیدهایی نظیر ژنیستین، روتین و کوئرستین هستند که از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کنند (Kooti et al. 2015). در میان خانواده بسیار بزرگ فلاونوئیدها؛ فلاوپیرویدول، کاتچین، روتین، کمپفرول و کوئرستین برای جلوگیری از سرطان بسیار شناخته شده و دارای فعالیت‌های ضدتوموری هستند (Cragg & Newman 2005).

اگر چه تحقیقات متعددی در زمینه سنتز نانوذرات فلزی مختلف از سایر گیاهان انجام گرفته است. با این حال تاکنون تحقیقی مبنی بر تولید نانوذرات فلزی از گیاه *F. vulgare* و تأثیر آن‌ها بر لاین‌های سلول سرطانی مشاهده نشده است. با توجه به مقدار بالای آهن، مس، نقره و روی و سایر فلزات درون گیاهی و ترکیبات فلاونوئیدی و آلکلوئیدی در گیاه رازیانه به نظر می‌رسد این گیاه از پتانسیل بالایی در تولید نانوذرات فلزی برخوردار باشد. لذا در این پژوهش ابتدا به بیوسنتز نانوذرات فلزی از جمله نانوذرات آهن، مس، روی و نقره از عصاره آبی اندام هوایی گیاه رازیانه پرداخته شد و سپس ویژگی‌های ساختاری از جمله اندازه نانوذرات فلزی بیوسنتز شده به کمک XRD و تأیید ساختار آن به کمک FTIR مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت به بررسی تأثیر اسانس روغنی، عصاره آبی حاصل از اندام هوایی گیاه رازیانه و نانوذرات فلزی آهن، مس، روی و نقره حاصل از آن بر روی رشد و زنده‌مانی لاین‌های سلولی سرطانی Sum-159 و Hs-578T پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی: منابع گیاهی مورد استفاده در این آزمایش از نمونه گیاهی رازیانه رشد یافته در مزرعه تحقیقات گیاهان دارویی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل جمع‌آوری شدند. سرشاخه‌های جوان فاقد بیماری ظاهری و مناسب از نظر فنتوتیپی انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های هدف پس از جداسازی در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس خشک شدند.

عصاره گیری: به منظور استخراج متابولیت های ثانویه نمونه های مورد مطالعه گیاه رازیانه از روش Alizadeh

Behbahani et al. (2016) با کمی تغییرات استفاده شد. بدین منظور ابتدا یک گرم از نمونه گیاهی درون هاون چینی و به کمک ازت مایع ساییده شد. پس از انتقال به لوله سرپیچ دار ۱۰ میلی لیتر آب مقطر دوبار اتوکلاو شده به آن اضافه شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۷۲ ساعت در روی شیکر با سرعت پایین و دمای ۲۵ درجه سلیسیوس و در شرایط تاریکی نگهداری شد. سپس نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول روی پس از جمع آوری و عبور از فیلتر ۰/۲ میکرونی جهت اندازه گیری مقدار فلاونوئید و آنتوسیانین در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس نگهداری شدند.

اندازه گیری متابولیت های ثانویه عصاره حاصل: برای اندازه گیری فلاونوئید کل عصاره حاصل از روش (Moradi

et al. 2014) با کمی تغییر استفاده شد. بدین منظور ابتدا ۲۵۰ میکرو لیتر از محلول کلرید آلومینیوم ۱۰ در صد (جرمی-حجمی)، ۲۵۰ میکرو لیتر پتاسیم استات یک مولار به یک میلی لیتر عصاره حاصل اضافه شد و مقادیر جذب نمونه ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (BIORAD, Smartspec™ plus, USA) در طول موج ۴۹۸ نانومتر اندازه گیری شد. منحنی استاندارد کوئرستین با استفاده از غلظت های مختلف کوئرستین (صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میلی گرم در لیتر آب مقطر) تهیه و برای کمی سازی میزان فلاونوئید کل در نمونه ها مورد استفاده قرار گرفت. سپس با استفاده از فرمول $T=(C \times V)/M$ مقدار فلاونوئید بر حسب میلی گرم در یک گرم محاسبه گردید. در این فرمول T: میزان فلاونوئید بر حسب میلی گرم در گرم؛ C: غلظت فلاونوئید بر حسب میلی گرم کوئرستین در میلی لیتر؛ V: حجم نهایی عصاره و M: وزن نمونه (بر حسب گرم) است.

برای اندازه گیری مقدار آنتوسیانین نمونه های کالوس از روش (Wagner 1979) استفاده شد. برای این منظور جذب نوری عصاره های حاصل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (BIORAD, Smartspec™ plus, USA) و در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. سپس میزان آنتوسیانین با استفاده از فرمول $A=\epsilon bc$ و ضریب خاموشی ۳۳۰۰۰ متر در سانتی متر محاسبه گردید. در فرمول فوق A: برابر مقدار عدد جذبی، b برابر عرض کووت، ϵ : برابر ضریب خاموشی و c برابر غلظت آنتوسیانین است.

اندازه گیری مقدار متابولیت های ثانویه به روش HPLC: به منظور اندازه گیری مقدار متابولیت های ثانویه (روتین،

کوئرستین و کمپفرول) با استفاده از دستگاه HPLC، از روش (Hurst et al. 1979) استفاده شد. برای این منظور ابتدا یک گرم از نمونه گیاهی توسط ازت مایع و در هاون چینی ساییده شده و پس از افزودن ۱۰ میلی لیتر آب مقطر دوبار اتوکلاو شده به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه ورتکس شدند. سپس دو مرتبه و هر مرتبه به مدت ۱۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک (Bandelin electronic®، Germany) و در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس نگهداری شد و پس از ۳ ساعت دوباره تیمار ورتکس و اولتراسوند تکرار شد. سپس نمونه ها در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و برای مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس عصاره رویی جهت اندازه گیری ترکیبات بیوشیمیایی فوق با استفاده از دستگاه HPLC (KENUVER, AZURA, Germany) ستون فاز معکوس C18 توسط

فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرومتری فیلتر شدند. فاز متحرک شامل متانول HPLC گرید و اسید فورمیک یک درصد بود. تشخیص و کمی‌سازی مقدار روتین، کوئرستین و کمپفرول به ترتیب در طول موج‌های ۲۵۷، ۳۶۸ و ۳۶۸ نانومتر انجام گرفت. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نمونه خالص روتین (NAWAH,HIKA2001,Egypt)، کوئرستین (Sigma-Aldrich) و کمپفرول (Sigma-Aldrich) استفاده شد.

بیو سنتز نانوذرات فلزی: ۱- نانوذرات آهن: جهت بیوسنتز نانوذرات آهن از روش (Hasan et al. 2022) با کمی

تغییرات استفاده شد. در ابتدا مقدار ۳/۳۳ گرم از نمک آهن (III) کلرید ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) و ۱/۵۹ گرم از نمک آهن (II) کلرید ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) به داخل بالن سه دهانه ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه به آن اضافه شد. به یک دهانه دماسنج و از دهانه دیگر گاز نیتروژن با فشار مناسب به درون ظرف دمیده شد. سپس محتویات ظرف با استفاده از یک مگنت هم‌زده شده و دما تا ۸۰ درجه سیلیسیوس بالا برده شد. سپس در بازه زمانی ۱۰ دقیقه ۱۵ میلی‌لیتر از عصاره آبی گیاه رازیانه به صورت قطره قطره به محلول اضافه شد سپس میزان ۶۰ میلی‌لیتر NaOH یک مولار به آن اضافه شده و بعد از تغییر رنگ محلول محتویات بالن به بشر انتقال داده و با استفاده از آهن‌ربای قوی نانوذرات سنتز شده از کف بشر جمع‌آوری و مورد شستشو قرار گرفت. نمونه‌های حاصل پس از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه از لوله‌های آزمایشی جمع‌آوری شدند و پس از ۲۴ ساعت استقرار در یخچال ۸۰- درجه سیلیسیوس جهت حذف آب موجود درون نمونه‌های حاصل درون دستگاه فریزدرای و به مدت سه ساعت خشک شدند.

۲- نانوذرات مس: بیوسنتز نانوذرات مس به روش (Akbari et al. 2020) با کمی تغییرات انجام شد. بدین منظور ابتدا

۱۰ میلی‌مولار سولفات مس به ۱۰ میلی‌لیتر عصاره آبی گیاه رازیانه اضافه شد. سپس محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۵۰ درجه سیلیسیوس توسط دستگاه شیکر در دور ۶۰ دور در دقیقه شیک شد. نهایتاً نانوذرات حاصل توسط سانتریفیوژ جداسازی و پس از شستشو توسط بافر فسفات و خشک شدن توسط دستگاه فریزدرای تا زمان استفاده در یخچال و دمای ۸۰- درجه سیلیسیوس نگهداری شدند.

۳- نانوذرات نقره: جهت بیوسنتز نانوذرات نقره ابتدا یک میلی‌مولار نیترات نقره به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شده

و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق روی دستگاه شیکر قرار گرفت. سپس ۱۰ میلی‌لیتر عصاره گیاهی به آن اضافه شد. پس از ۳۰ الی ۴۰ دقیقه محلول مورد نظر تغییر رنگ داد. سپس محلول مورد نظر در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سیلیسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از حذف محلول رویی رسوب مورد نظر برای سه مرتبه توسط بافر فسفات شستشو و پس از خشک شدن توسط دستگاه Freeze-dry، جهت آزمایشات بعدی در دمای ۸۰- درجه سیلیسیوس نگهداری شد (Singh et al. 2021).

۴- نانوذرات روی: برای بیو سنتز نانوذرات روی ابتدا ۰/۰۲ مولار استات روی ($Zn. 2H_2O$) به ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه شده اضافه و به کمک همزن برقی مغناطیسی به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق هم زده شد. سپس ۱۰ میلی لیتر از عصاره آبی گیاه در طی چند مرحله به آن اضافه گردید. پس از ۱۰ دقیقه و به صورت قطره قطره یک میلی لیتر سود (NaOH) پنج مولار به آن اضافه شد تا pH محلول به ۱۱ تا ۱۲ افزایش یابد. با افزایش pH محلول، رنگ آن به شیری-زرد تغییر نموده و تا ۴ ساعت فرآیند هم‌زدن ادامه یافت. طبق نظر سایر محققین (Bhuyan et al. 2015) با افزایش دمای دستگاه همزن برقی مغناطیسی به ۵۰ درجه سلیسیوس ذراتی به رنگ شیری روشن در محلول مشاهده می‌شود که بیانگر سنتز نانوذرات روی است. سپس محلول مورد نظر به مدت ۱۵ دقیقه و در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب نهایی جمع‌آوری شده و توسط دستگاه فریزدرای خشک شدند. ترکیب نهایی برای آزمایش‌های نهایی در دمای ۸۰- درجه سلیسیوس نگهداری شد (Dappula et al. 2023).

بررسی خصوصیات نانوذرات فلزی: درجه کریستالیزاسیون و ساختار نانوذرات با استفاده از دستگاه XRD (DISCOVER, Bruker D8, Germany) بررسی شد. همچنین تشکیل نانوذرات مگنتیت توسط طیف سنجی FTIR (Thermo Scientific, USA) تأیید شد.

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس، عصاره آبی گیاه (*F. vulgare*) نانوذرات آهن، مس، نقره و روی حاصل از آن به کمک روش دیفنیل پیکریل هیدارزیل: برای این منظور از اسانس و عصاره‌ی آبی گیاه رازیانه (در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر در یک میلی لیتر متانول) و نانوذرات آهن، مس، روی و نقره سنتز شده از آن (در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در یک میلی لیتر متانول) به یک میلی لیتر دیفنیل پیکریل هیدارزیل (DPPH) در یک میکروتیوب درب بسته اضافه شد. سپس میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها پس از مدت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلیسیوس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (BIORAD, Smartspec™ plus، آمریکا) و در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شدند. از آسکوربیک اسید در غلظت‌های (۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در یک میلی لیتر آب مقطر) به عنوان استاندارد به دیفنیل پیکریل هیدارزیل (DPPH) اضافه شد (Wong et al. 2006). درصد ظرفیت رویش رادیکالی (RSA) به کمک فرمول (۱) محاسبه شد:

$$RSA (\%) = \left[1 - \frac{S-SB}{C} \right] \times 100$$

در این رابطه S: میزان جذب نمونه عصاره + DPPH، SB: میزان جذب نمونه عصاره (به عنوان کنترل مثبت) + متانول و C: میزان جذب کنترل منفی (متانول + DPPH) است.

اسانس گیری از اندام هوایی جهت سنجش فعالیت ضد سرطانی: منابع گیاهی مورد استفاده در این آزمایش از نمونه گیاهی رازیانه رشد یافته در مزرعه تحقیقات گیاهان دارویی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل جمع‌آوری

شدند. سرشاخه‌های جوان فاقد بیماری ظاهری و مناسب از نظر فنوتیپی انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های هدف پس از جداسازی در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس خشک شدند. اسانس روغنی گیاه رازیانه به وسیله تقطیر با آب و از اندام هوایی آن و به کمک دستگاه کلونجر به دست آمد. برای این منظور نمونه اندام هوایی نمونه گیاهی رازیانه ر شد یافته در مزرعه تحقیقات گیاهان دارویی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل جمع‌آوری شدند. نمونه‌های نامناسب از نظر فنوتیپی حذف و نمونه‌های سالم باقی ماندند. نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در شرایط تاریکی و دمای اتاق خشک شدند. سپس نمونه‌های نهایی به کمک دست به قطعات کوچک‌تر تبدیل شده و سپس از دستگاه کلونجر جهت تولید اسانس نهایی استفاده شد (Reddy et al. 2019).

کشت لاین‌های سلول سرطانی: فرایند آزمایشات مربوط به بخش سنجش خواص ضدسرطانی ترکیبات مورد نظر در

تابستان و پاییز سال ۱۴۰۱ در بخش تحقیقات سرطان، مرکز (Genyo) دانشگاه شهر گرگاندا واقع در کشور اسپانیا انجام شد. بدین منظور لاین‌های سلولی Sum-159 و Hs-578T (زیرکشت شده دوم)، از مخازن حاوی ازت مایع مرکز مورد نظر تهیه شد. ابتدا نمونه‌های منجمد شده در دمای ۱۸۰- درجه سلیسیوس برای مدت زمان کوتاه و جهت رفع انجماد حاصل در دمای اتاق قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سلیسیوس)، مایع رویی دارای DMSO حذف شده و نمونه سلول‌های ته‌نشین شده به فلاسک کوچک مخصوص کشت سرطانی حاوی ۱۲ میلی‌لیتر محیط کشت سلولی حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (کاملاً استریل شده به کمک فیلترهای حاوی فیلترهای ۰/۲ میکرومتری) انتقال داده شد. فلاسک حاوی محیط کشت و لاین سلولی به دستگاه انکوباتور دارای دی‌اکسید کربن فاقد رو شنایی، دی‌اکسید کربن ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۲ الی ۳ روز (بستگی به میزان رشد لاین‌های سلولی متفاوت است) منتقل شد. پس از چند بار زیرکشت (معمولاً ۲ بار) و بررسی تراکم سلولی زیر میکروسکوپ، نمونه سلول‌های کشت شده با تراکم بالا آماده مرحله بعدی یعنی شمارش سلولی و در نهایت تأثیر تیمارهای هدف قرار گرفتند.

سنجش میزان IC₅₀: میزان IC₅₀ (غلظتی از یک ترکیب که موجب نابودی حداقل ۵۰ درصد سلول‌ها می‌شود) ترکیبات

مورد نظر به کمک دستگاه نانوکوانت ریدر (NanoQuant Plate, Tecan Infinite 200 PRO) تعیین شد. برای این منظور ابتدا حجم تراکم سلولی لاین هدف به کمک شمارش سلولی به روش استفاده از تریپان بلو مورد بررسی قرار گرفت. پس از تأیید تراکم مناسب سلولی ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت دارای تراکم سلولی بالا به هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ تایی استریل اضافه شدند. سپس غلظت‌های مشخصی از اسانس و عصاره آبی گیاه رازیانه هر کدام به طور مجزا در غلظت‌های (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۲۵، ۱ و صفر (شاهد) میکرولیتر) و نانوذرات آهن، مس، نقره و روی بیوسنتز شده عصاره آبی گیاه رازیانه هر کدام به صورت مجزا در غلظت‌های (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۲۵، ۱ و صفر (شاهد) میکروگرم در میلی‌لیتر) به درون هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد و سپس حجم نهایی هر چاهک به کمک محیط کشت پایه به ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از آن نمونه‌ها به مدت زمان ۲۴ ساعت به دستگاه انکوباتور دارای دی‌اکسید کربن فاقد رو شنایی، دی‌اکسید کربن ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه

سیلیسیوس منتقل شدند. جهت بررسی میزان زنده‌مانی سلولی و در نهایت میزان IC_{50} از WST-1 به عنوان Detector استفاده شد. WSTs (نمک‌های ترازولیوم محلول در آب) از طیف‌های جذبی مختلف فرمازان‌های جهت ارزیابی فعالیت متابولیک سلولی و زنده‌مانی سلولی استفاده می‌کند. WST-1 برخلاف MTT با واسطه الکترون PMS ترکیب می‌شوند و فرمازان محلول در آب تولید می‌کنند. از جمله مزیت سنجش WST-1 نسبت به MTT می‌توان به (۱) می‌توان مستقیماً نتایج حاصل از WST-1 را قرائت نمود (بر خلاف MTT که نیاز به مرحله انحلال دارد)، (۲) سیگنال مؤثرتری نسبت به MTT می‌دهد و (۳) سمیت کمتری نسبت به روش MTT برای سلول‌ها دارد. برای این منظور به هر کدام از چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر WST-1 اضافه شد و پس از گذشت ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه میزان جذب نمونه‌های مورد نظر در طول موج ۴۴۰ نانومتر توسط دستگاه نانوآنت ریدر قرائت شد (Tian et al. 2019).

سنجش خواص ضدسرطانی ترکیبات مورد نظر به کمک روش فلوسیتومتری: پس از شناسایی غلظت IC_{50}

ترکیبات مورد نظر، به بررسی خواص ضدسرطانی اسانس و عصاره آبی گیاه رازیانه و نانوذرات آهن، مس، نقره و روی بیوستتر شده از آن پرداخته شد. برای این منظور از پلیت‌های ۶ تایی استفاده شد. ابتدا ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی لاین‌های سلولی ذکر شده در تراکم مناسب (پس از بررسی تراکمی به کمک تریان بلو) به هر کدام از پلیت‌ها اضافه شد. سپس غلظت مناسبی از ترکیبات مورد نظر (غلظت به دست آمده از آزمایش IC_{50}) در سه تکرار به هر کدام از پلیت‌ها اضافه گردید. سپس پلیت‌ها برای مدت زمان ۲۴ ساعت به دستگاه انکوباتور دارای دی‌اکسیدکربن فاقد روستنایی، دی‌اکسیدکربن ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس منتقل شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت به کمک دستگاه فلوسیتومتری میزان زنده‌مانی سلولی، سلول‌های نکروزه شده، مرحله پیش آپوپتوزی سلولی و مرحله پس آپوپتوزی سلولی مشخص شدند (Tian et al. 2019).

طرح آزمایشی و تجزیه آماری: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. هم‌چنین میزان زنده‌مانی سلولی (بررسی میزان IC_{50} سلول‌های سرطانی) به کمک نرم افزار GraphPad Prism8 بررسی شد. هم‌چنین نتایج حاصل از سنجش خواص ضدسرطانی به کمک روش فلوسیتومتری توسط نرم‌افزار Flowj V10 مورد بررسی قرار گرفتند. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver. 26 انجام گرفت.

نتایج و بحث

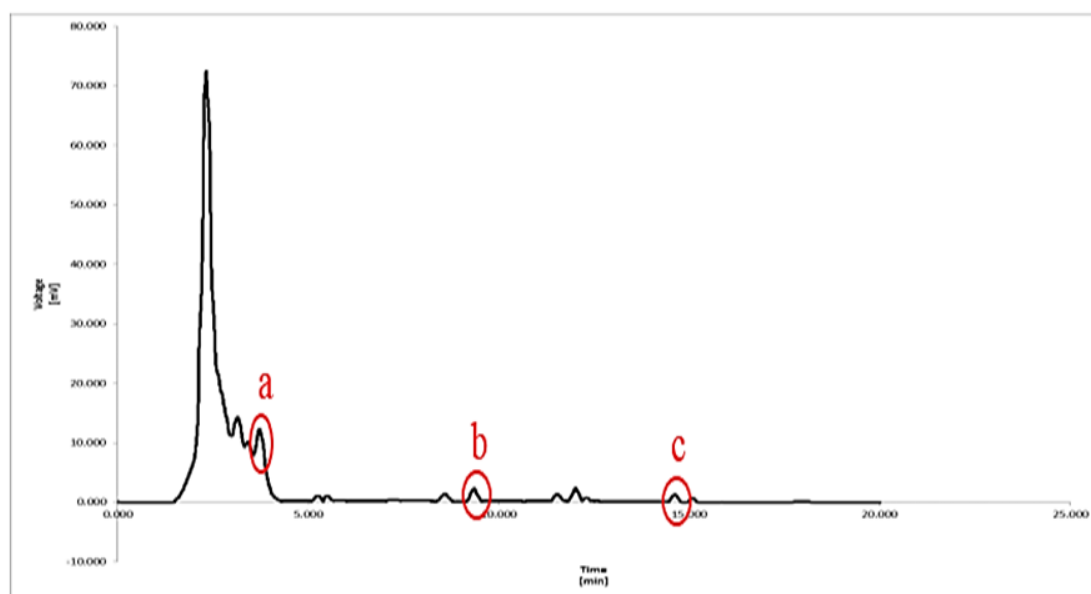
بررسی میزان فلاونوئید، آنتوسیانین، روتین، کوئرستین و کمپفرول عصاره آبی گیاه رازیانه (F. *vulgare*)

میزان فلاونوئید، آنتوسیانین، روتین، کوئرستین و کمپفرول عصاره آبی گیاه رازیانه در جدول ۱ آورده شده است. سنجش میزان روتین، کوئرستین و کمپفرول عصاره آبی گیاه رازیانه توسط HPLC شناسایی و مشخص شدند (شکل ۱).

جدول ۱. میزان فلاونوئید، آنتوسیانین، روتین، کوئرستین و کمپفرول عصاره آبی گیاه رازیانه (*F. vulgare*)

Table 1. The amount of flavonoid, anthocyanin, rutin, quercetin and kaempferol in aqueous extract of (*F. vulgare*)

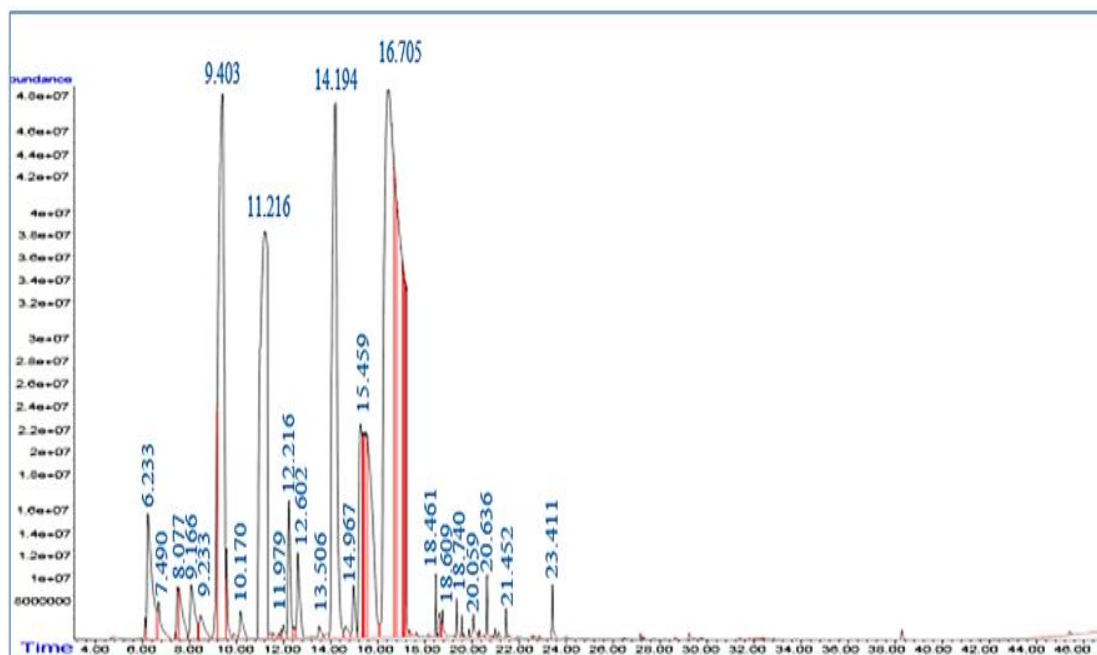
نمونه‌های انتخابی	فلاونوئید	آنتوسیانین	روتین	کوئرستین	کمپفرول
Selected sample	Flavonoid (mg. g ⁻¹)	Anthocyanin (μmol. g ⁻¹)	Routine (mg. g ⁻¹)	Quercetin (mg. g ⁻¹)	Kaempferol (mg. g ⁻¹)
Aqueous extract of the plant	0. 73	8. 60	12. 00	9. 45	7. 69



شکل ۱. تصویر شماتیک نتایج حاصل از HPLC عصاره آبی برگ گیاه رازیانه؛ (a) روتین، (b) کوئرستین و (c) کمپفرول

Figure 1. Schematic image of the HPLC results of the aqueous extract of fennel plant leaves; a) rutin, b) quercetin and c) kaempferol

تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی (GC-Mass): طبق نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی (GC-Mass) حاصل از اسانس گیاه رازیانه (شکل ۲ و جدول ۲)، وجود ترکیبات فلاونوئیدی همانند Sabinene, beta-pinene, Phellandrene, alpha-Fenchone, L-Fenchone و غیره با خواص ضدالتهابی، ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، ضددیابت و ضدسرطان تأیید شد.



شکل ۲. نتایج حاصل از GC-Mass اسانس گیاه رازیانه (*F. vulgare*)

Figure 2. Results of GC-Mass of (*F. vulgare*)

پراش اشعه ایکس (XRD): روش پراش اشعه ایکس یک تکنیک غیرمخرب برای تعیین فازهای کریستالی موجود در مواد جامد و آنالیز خواص ساختاری نانو ذرات مغناطیسی سنتز شده است. در نمودار XRD مربوط به نانوذرات آهن بیوستنتر شده سه پیک شاخص در زاویه $2\theta=35^\circ$ ، $2\theta=37^\circ$ و $2\theta=38^\circ$ مشاهده شد. که مشابه پیک‌های مربوط به Fe_3O_4 خالص با ساختار مکعبی مرکز وجوه پر (FCC) (Schwaminger et al. 2020) بود (شکل ۳-ا). همچنین چهار پیک شاخص ($2\theta=41^\circ$ ، $2\theta=42^\circ$ ، $2\theta=49^\circ$ و $2\theta=50^\circ$) در نمودار XRD مربوط به نانوذرات مس بیوستنتر شده مشاهده شد که بر اساس مقایسه پیک‌های شاخص با طیف‌های ICDD استاندارد (فایل ICDD) مشخص شد (Ssekatawa et al. 2022) که نانوذره مس بیوستنتر شده مربوط به پیک $2\theta=27^\circ$ بوده و همچنین نانوذره مورد نظر ساختار مونوکلینیک (ساختار منشوری با قاعده متوازی‌الاضلاع) دارد (شکل ۳-ب). سه پیک شاخص در زاویه $2\theta=26^\circ$ ، $2\theta=34^\circ$ و $2\theta=35^\circ$ در نمودار XRD مربوط به نانوذرات روی بیوستنتر شده مشاهده شد (شکل ۳-ج) (Dağlıoğlu & Yılmaz Öztürk 2019). همچنین چهار پیک شاخص در زاویه $2\theta=28^\circ$ ، $2\theta=29^\circ$ ، $2\theta=34^\circ$ و $2\theta=35^\circ$ مربوط به نانوذرات نقره بیوستنتر شده مشاهده شد که مربوط به ساختار FCC (ساختار مکعبی) نانوذرات نقره بودند و با الگوی استاندارد پراش اشعه ایکس نقره (Andhare et al. 2020) تطابق کامل داشت (شکل ۳-د).

جدول ۲. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی (GC-Mass) اسانس

گیاه رازیانه (*F. vulgare*)

Table 2. The results of gas chromatography-mass spectrometry (GC-Mass) analysis of fennel essential oil (*F. vulgare*)

ترکیبات	فرمول مولکولی	زمان پیک	مجموع	گزارشات فعالیت دارویی	منابع
Compounds	Molecular formula	Retention Time	Total (%)	Recorded pharmacological activity	References
(1 <i>R</i>)-(+)- α -Pinen	C ₁₀ H ₁₆	6. 233	2. 631	-	-
4-Carene	C ₁₀ H ₁₆	6. 678	0. 617	-	-
beta. - Phellandren	C ₁₀ H ₁₆	7. 490	0. 369	-	-
Sabinene	C ₁₀ H ₁₆	7. 544	0. 884	anti-inflammatory	(Lima et al. 2016)
beta-pinene	C ₁₀ H ₁₆	8. 077	1. 038	antibacterial	(Lima et al. 2016)
alpha. - Phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	8. 460	0. 512	antibacterial	(Boevé et al. 2023)
D-Limonene	C ₁₀ H ₁₆	9. 403	12. 291	antibacterial, antifungal and antitumor	(Bai et al. 2016)
3-Carene	C ₁₀ H ₁₆	9. 565	0. 583	antibacterial, antioxidant and anticancer	(Shu et al. 2020)
1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-	C ₇ H ₁₀	10. 170	0. 380	-	-
L-Fenchone	C ₁₀ H ₁₆ O	11. 216	12. 234	anti-inflammatory, antioxidant, antidiarrheal, antifungal, antinociceptive, and bronchodilator	(Kang et al. 2019)
Bicyclo[2. 2. 1]heptane containing <i>N,N'</i> -diarylsquaramide	C ₁₀ H ₁₆	11. 979	0. 136	anticancerous, antiviral and antibacterial	(Kang et al. 2019)
2,6-Dimethyl-2,4,6-octatriene	C ₁₀ H ₁₆	12. 216	1. 377	-	-
Bicyclo[2. 2. 1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	C ₁₀ H ₁₆ O	12. 602	1. 020	-	-
	C ₁₀ H ₁₈ O	13. 506	0. 136	-	-
Estragole	C ₁₀ H ₁₂ O	14. 197	10. 778	antimicrobial, antioxidant, anticonvulsant, and macrophage	(Roy et al. 2018)

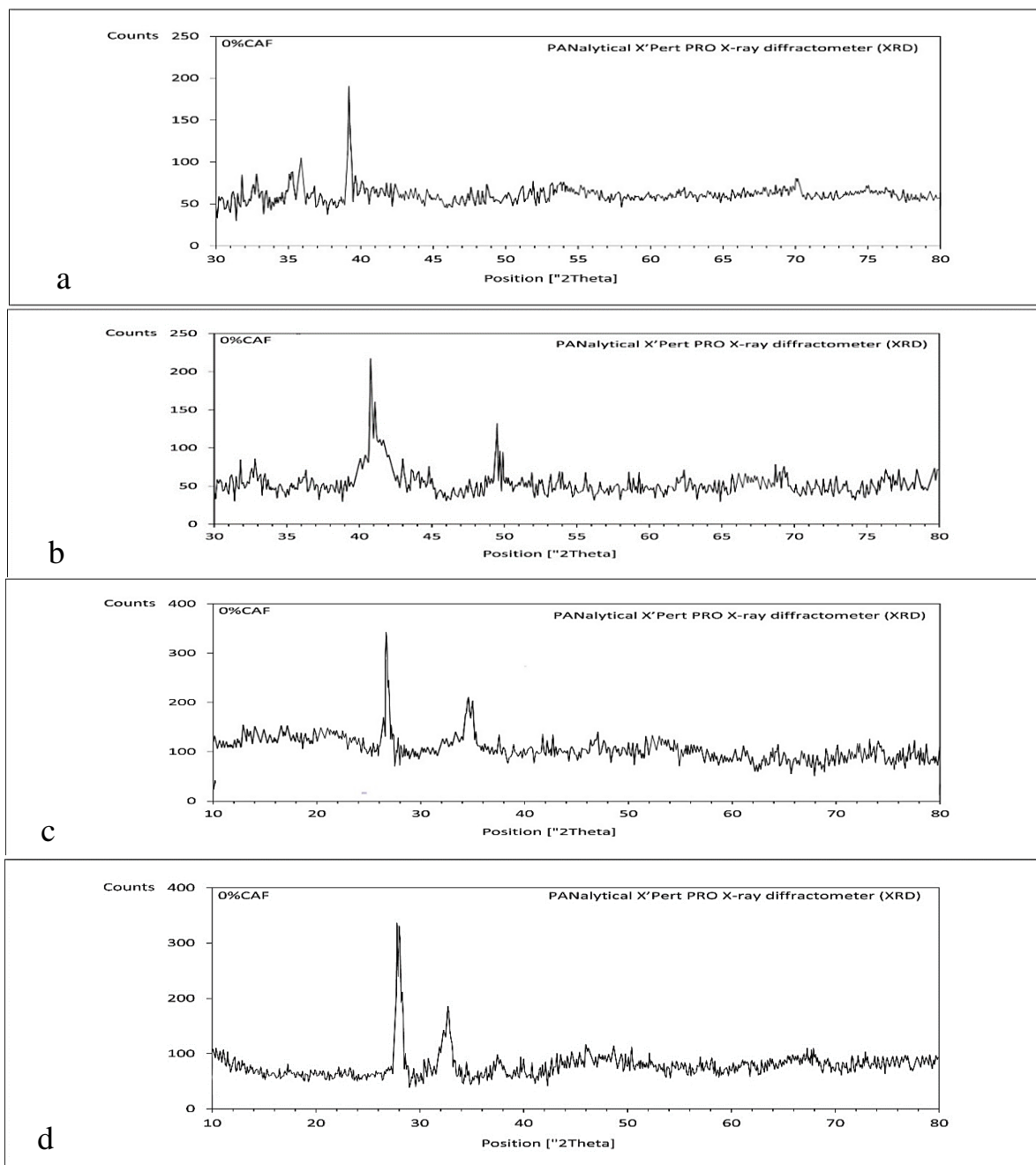
Bicyclo[2. 2. 1]heptan-2-ol, 2-ethyl-1,3,3-trimethyl-	C ₁₂ H ₁₂ O	14. 969	0. 569	-	-
2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	C ₁₀ H ₁₆ O	15. 459	9. 156	-	-
Anethole	C ₁₀ H ₁₂ O	16. 705	35. 194	Antifungal, antibacterial, analgesic, anti-inflammatory and antioxidant	(Nasir & Yabalak 2021)
Copaene	C ₁₅ H ₂₄	18. 461	0. 218	Antibacterial and anti-inflammatory	(Kang et al. 2019)
2-Propanone, 1-(4-methoxyphenyl)	C ₁₀ H ₁₂ O	18. 609	0. 133	-	-
1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropa[1,2]benzene	C ₁₅ H ₂₄	18. 740	0. 186	-	-
Bicyclo[4. 4. 0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-	C ₁₅ H ₂₄	19. 354	0. 172	-	-
Tricyclo[3. 3. 1. 1 ^{3,7}]decane, tricyclo[3. 3. 1. 1 ^{3,7}]decylidene-	C ₂₀ H ₂₈	20. 059	0. 186	-	-
Tricyclo[3. 3. 1. 1 ^{3,7}]decane, tricyclo[3. 3. 1. 1 ^{3,7}]decylidene-	C ₂₀ H ₂₈	20. 636	0. 240	-	-
Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-	C ₁₅ H ₂₄	21. 452	0. 105	-	-
Apiol	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	23. 411	0. 255	antioxidant, antifungal, anticancerous, abortifacient, acaricidal, phytotoxic, antitumor, and antiproliferative agents	(Kang et al. 2019)

نتایج FTIR: وجود پیک‌های دوگانه و پشت سرهم در تصاویر FTIR (شکل ۴)، نانوذرات آهن، مس، روی و نقره در نواحی

۳۵۰۰-۴۰۰۰ نمایانگر ارتعاشات کششی گروه H-O می‌باشد. همچنین وجود پیک‌های دوتایی و پیک‌های کشیده در ناحیه ۳۵۰۰-

۲۸۰۰ نمایانگر حضور نانوذرات فلزی است. همچنین در نواحی ۵۰۰ تا ۱۵۰۰ پیک‌های کششی مربوط به پیوندهای C=O، N-H

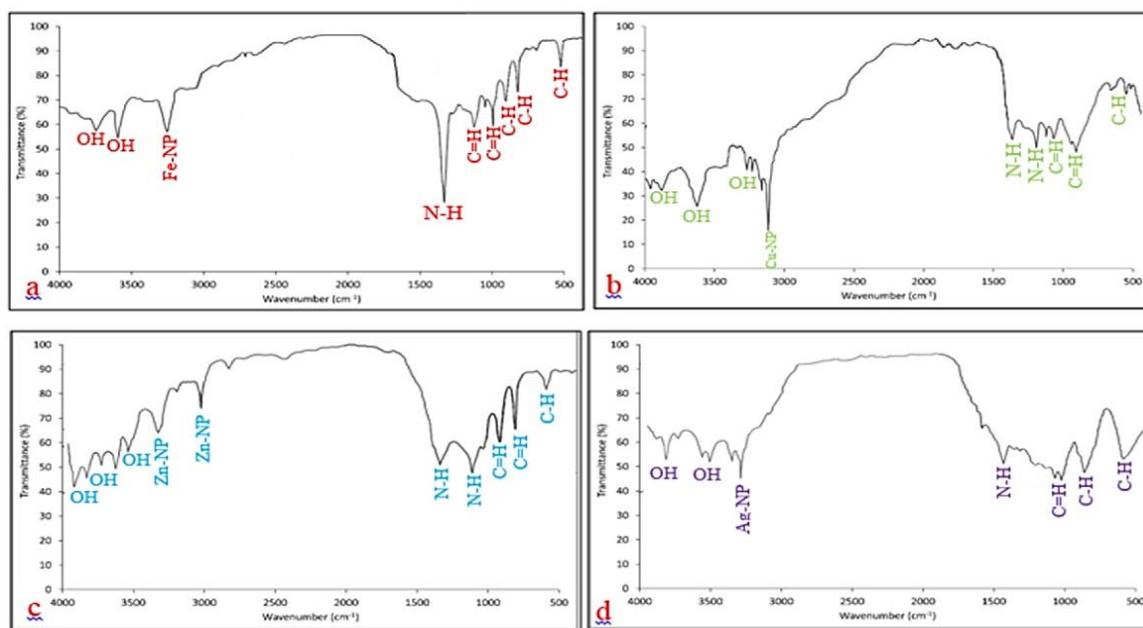
و O-C بود. از آنجایی که ترکیبات آلی عصاره‌های گیاهی در اطراف نانوذرات قرار می‌گیرند و باعث پایداری نانوذرات می‌شوند، لذا در طیف FTIR حرکات مربوط به این گروه‌های آلی دیده می‌شوند (شکل ۴).



شکل ۳. طیف پراش اشعه ایکس (XRD) نانوذرات فلزی سنتز شده: (a) اکسید آهن، (b) اکسید مس، (c)

اکسید روی و (d) اکسید نقره

Figure 3. X-ray diffraction spectrum (XRD) of synthesized metal nanoparticles: a) iron oxide, b) copper oxide, c) zinc oxide and d) silver oxide



شکل ۴. طیف FTIR نانوذرات بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه (*F. vulgare*): (a) نانوذرات آهن، (b) مس، (c) نقره و (d) روی

Figure 4. FTIR spectrum of nanoparticles biosynthesized from the aqueous extract of the plant (*F. vulgare*): a) iron, b) copper, c) silver and d) zinc nanoparticles

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس، عصاره‌ی آبی گیاه رازیانه و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن به کمک روش دیفنیل پیکریل هیدرازیل: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس، عصاره آبی گیاه رازیانه و نانوذرات آهن و مس حاصل از آن به طور معنی‌داری ($p < 0.01$) تحت تأثیر نوع تیمار مورد استفاده، غلظت‌های مورد استفاده و اثر متقابل نوع تیمار و غلظت‌های آن قرار گرفت (جدول ۳).

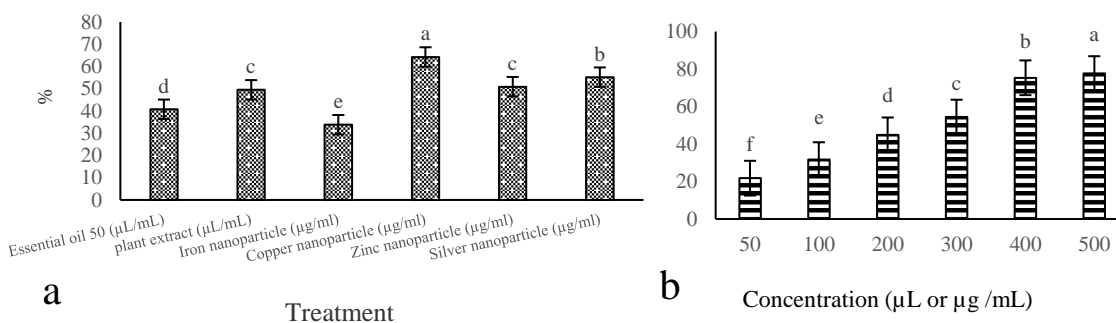
جدول ۳. میانگین مربعات میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس، عصاره‌ی آبی گیاه رازیانه و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن (آزمون دانکن)

Table 3. Mean square of antioxidant activity of essential oil, aqueous extract of fennel plant and metal nanoparticles biosynthesized from it (Duncan's test).

Source of Variation	منابع تغییرات	df	درجه آزادی	MS	میانگین مربعات
				Antioxidant activity	
Treatment (a)		5		2064.10	**
Concentration (b)		5		7678.62	**
a × b		25		53.29	**
Error		72		6.46	
CV (%)		-		5.17	

** : significant at 1% level of probability

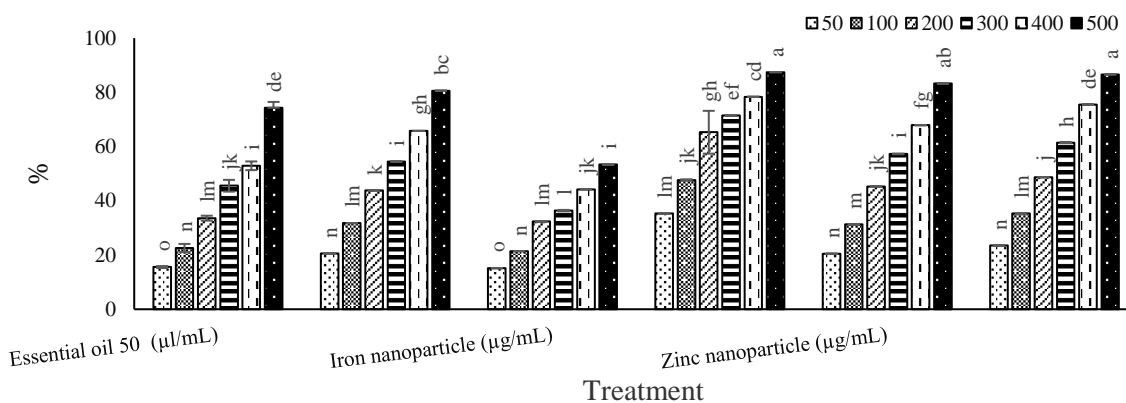
طبق نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۵- a و b)، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره آبی رازیانه و نانوذرات آهن، مس، نقره و روی بیوسنتز شده از آن به طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع تیمار و غلظت‌های آن قرار گرفت. به طوری‌که بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۶۴/۲۵ درصد) مربوط به نانوذرات مس بیوسنتز شده (شکل ۵- a). همچنین طبق نتایج به دست آمده، در کلیه تیمارها با افزایش غلظت میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (شکل ۵- b).



شکل ۵. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی؛ (a) نوع تیمار و (b) غلظت‌های مختلف استفاده از تیمارهای مختلف

Figure 5. The amount of antioxidant activity; a) type of treatment and b) different concentrations of using different treatments

اسانس، عصاره آبی گیاه رازیانه و نانوذرات آهن، مس، نقره و روی بیوسنتز شده از آن در غلظت‌های بالاتر به طور معنی‌داری بیشتر از میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی همان تیمارها در غلظت‌های پایین‌تر بود به معنی دیگر در تمامی تیمارها فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت، افزایش داشت (شکل ۶).



شکل ۶. اثر متقابل نوع عصاره آبی و غلظت‌های مختلف عصاره آبی بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

Figure 6. The interaction effect of the type of aqueous extract and different concentrations of aqueous extract on the amount of antioxidant activity

میزان فعالیت ضد سرطانی اسانس و عصاره‌ی آبی گیاه رازیانه و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده-ارزیابی

میزان IC_{50} : طبق نتایج به دست آمده از جدول تجزیه واریانس (جدول ۴)، میزان IC_{50} لاین‌های سلولی Hs-578T و Sum-159 به طور معنی‌داری ($p < 0.01$) تحت تأثیر نوع تیمار (اسانس و عصاره‌ی آبی گیاه و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن) قرار گرفت.

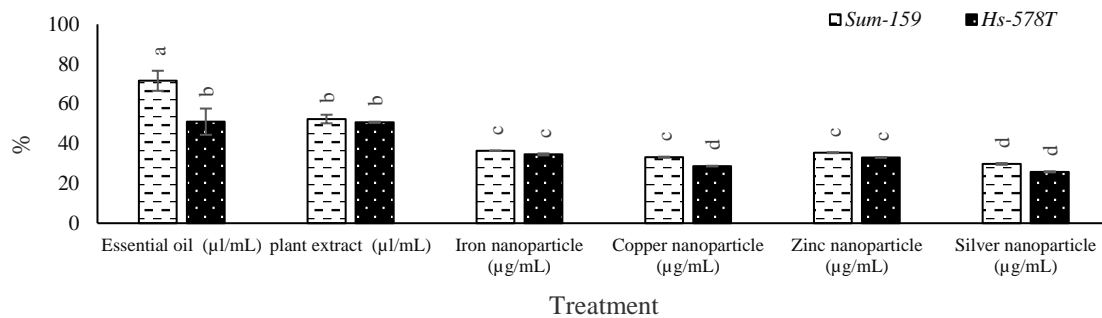
جدول ۴. تجزیه واریانس میزان IC_{50} لاین‌های سلول Hs-578T و Sum-159 تحت تأثیر اسانس روغنی و عصاره آبی رازیانه و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن (آزمون دانکن)

Table 4. Variance analysis of IC_{50} value of Hs-578T and Sum-159 cell lines under the effect of essential oil and aqueous extract of fennel and metal nanoparticles biosynthesized from it (Duncan's test).

منابع تغییرات Source of Variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS	
		Sum-159 Cell line	Hs-578T Cell line
Treatment	5	510.59 **	239.74 **
Error	12	10.15	14.68
CV(%)	-	15.27	19.89

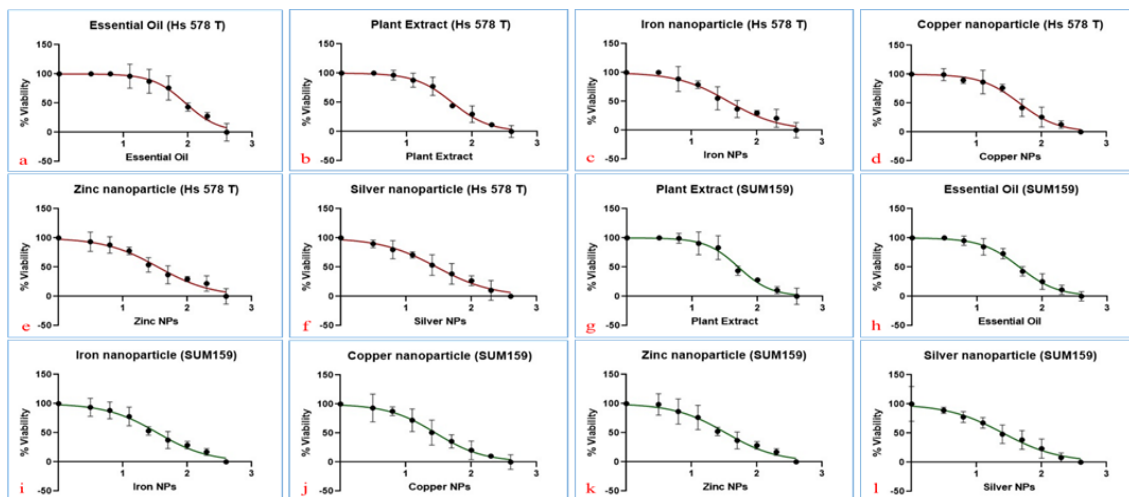
** : significant at 1% level of probability

طبق نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۷)، از نظر میزان IC_{50} (حداقل غلظتی که می‌تواند حداقل ۵۰ درصد سلول‌ها را از بین ببرد) بین لاین‌های سلولی Hs-578T و Sum-159 تیمار شده با اسانس روغنی و عصاره گیاه رازیانه و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن، اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده شد. همچنین این اختلاف معنی‌دار نیز درون هر لاین سلولی و بین تیمارهای مختلف مشاهده شد. به طوریکه در تمامی موارد میزان IC_{50} لاین سلولی Sum-159 به طور معنی‌داری بیشتر از لاین سلولی Hs-578T بود که بیانگر این موضوع می‌باشد که برای از بین بردن حداقل ۵۰ درصد از کل جمعیت لاین سلولی Sum-159 نسبت به لاین سلولی Hs-578T به غلظت‌های بالاتری از اسانس روغنی و عصاره آبی گیاه رازیانه و نانوذرات آهن، مس، روی و نقره نیاز است (شکل ۷). از طرفی دیگر در بررسی‌ها مشخص شد که تیمار لاین‌های سلولی Sum-159 با اسانس روغنی گیاه رازیانه به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارهای دیگر بود این امر در مورد لاین سلولی Hs-578T نیز صادق بود. همچنین از غلظت‌های مختلف اسانس روغنی و عصاره آبی گیاه رازیانه (بر حسب میکرولیتر بر میلی‌لیتر) و نانوذرات آهن، مس، روی و نقره بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه مذکور (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر) جهت محاسبه میزان IC_{50} لاین‌های سلولی Hs-578T و Sum-159 استفاده شد (شکل ۸).



شکل ۷. تأثیر اسانس، عصاره آبی گیاه رازیانه و نانوذرات آهن، مس، نقره و روی بیوسنتز شده از آن IC_{50} لاین‌های سلولی Hs-578T و Sum-159

Figure 7. Effect of essential oil, aqueous extract of fennel plant and nanoparticles of iron, copper, silver and zinc biosynthesized from it on IC_{50} cell lines Hs-578T and Sum-159



شکل ۸. نمودار میزان IC_{50} : a, b, c, d, e و f) به ترتیب تأثیر اسانس روغنی گیاه رازیانه، عصاره آبی گیاه رازیانه، نانوذرات، آهن، مس، نقره بر لاین سلولی Hs-578T و g, h, i, j, k و l) به ترتیب تأثیر اسانس روغنی گیاه رازیانه، عصاره آبی گیاه رازیانه، نانوذرات، آهن، مس، نقره بر لاین سلولی Sum-159

Figure 8. IC_{50} chart; a, b, c, d, e and f) the effect of fennel essential oil, fennel aqueous extract, nanoparticles, iron, copper, zinc and silver on Hs-578T and g, h, i cell lines, respectively. j, k and l) the effects of fennel essential oil, fennel aqueous extract, nanoparticles, iron, copper, zinc and silver on Sum-159 cell line, respectively

سنجش خواص ضدسرطانی اسانس و عصاره‌ی آبی گیاه رازیانه و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن به کمک روش فلو سیتومتری: نتایج حاصل از تجزیه واریانس میزان خواص ضد سرطانی اسانس و عصاره‌ی آبی گیاه رازیانه و نانوذرات آهن، مس، روی و نقره بیوسنتز شده از آن (در غلظت‌های به دست آمده از میزان IC_{50}) بر روی لاین سلولی Hs-578T و Sum-159 نشان داد که درصد سلول‌های نکروزه شده، درصد سلول‌های موجود در مرحله پیش‌آپتوزی و پس‌آپتوزی سلول‌های سرطانی مذکور به طور معنی‌داری ($p < 0.01$) تحت تأثیر نوع تیمار استفاده شده قرار دارد (جدول ۵).

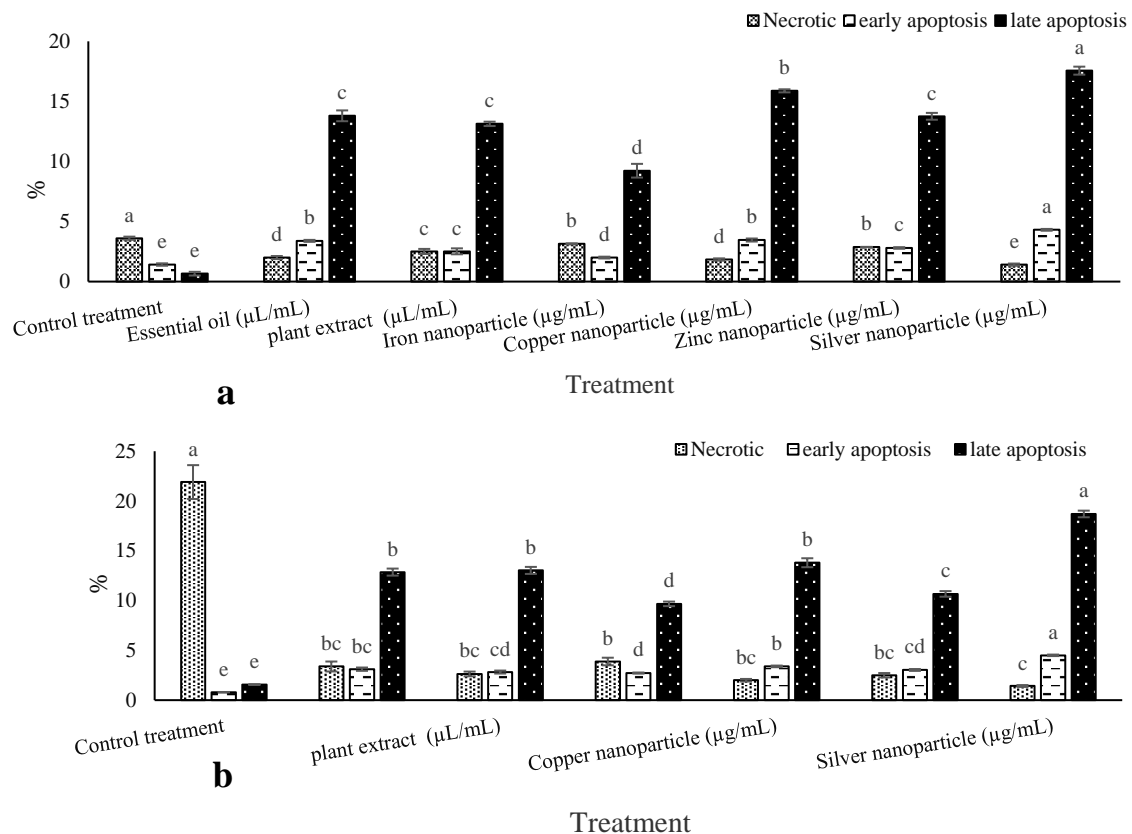
جدول ۵. تأثیر اسانس و عصاره‌ی آبی گیاه رازیانه و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن بر درصد سلول‌های نکروزه شده، درصد سلول‌های موجود در مرحله پیش‌آپتوزی و پس‌آپتوزی لاین سلولی Hs-578T و Sum-159 (آزمون دانکن)

Table 5. Effect of essential oil and aqueous extract of fennel plant and metal nanoparticles biosynthesized from it on percentage of necrotic cells, percentage of cells in pre-apoptotic and post-apoptotic stage of cell line Sum-159 and Hs-578T (Duncan's test)

S. O. V	df	Hs-578T			Sum-159		
		Necrotic	Early apoptosis	Late apoptosis	Necrotic	Early apoptosis	Late apoptosis
Treatment	6	160.97 **	5.25 **	90.24 **	1.82 **	2.85 **	94.96 **
Error	14	1.46	0.03	0.29	0.15	0.16	3.63
CV(%)	-	10.56	4.66	3.49	10.34	9.89	12.34

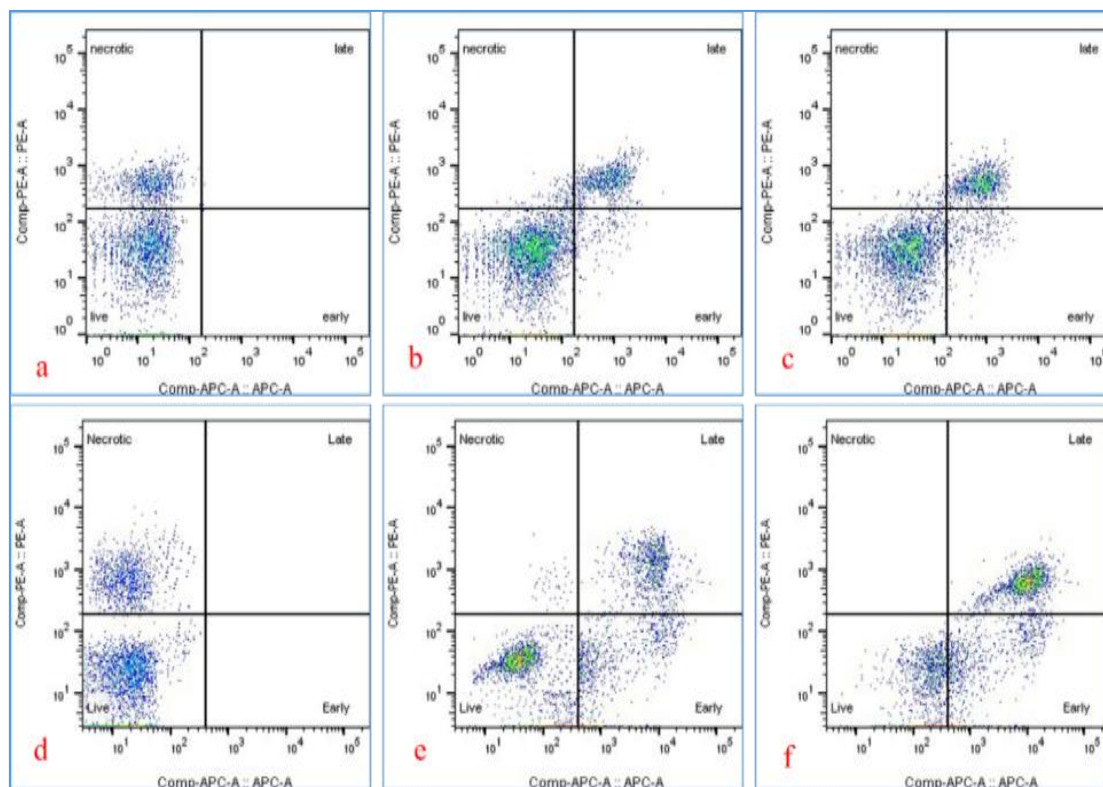
طبق نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۹-ا)، درصد سلول‌های نکروزه شده، درصد سلول‌های موجود در مرحله پیش‌آپتوزی و پس‌آپتوزی لاین سلولی Sum-159 طور معنی‌داری تحت تأثیر غلظت‌های به دست آمده از سنجش IC_{50} اسانس و عصاره‌ی آبی گیاه رازیانه و نانوذرات آهن، مس، روی و نقره بیوسنتز شده از آن قرار گرفت. همان طوری که در شکل ۹ مشاهده می‌شود بیشترین درصد سلول‌های Sum-159 نکروزه شده (۳/۶۱ درصد) مربوط به تیمار کنترل می‌باشد که به طور معنی‌داری بیشتر از اکثر تیمارها بود. علاوه بر این، بیشترین درصد سلول‌های Sum-159 واقع در مرحله پیش‌آپتوزیس (۴/۳۱ درصد) و پس‌آپتوزی سلولی (۱۷/۵۶ درصد) مربوط به تیمار سلول‌های مذکور با نانوذرات نقره بیوسنتز شده بود که به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۹-ب). همچنین از نظر درصد سلول‌های نکروزه شده، سلول‌های موجود در مرحله پیش‌آپتوزی و پس‌آپتوزی لاین سلولی Hs-578T بین تیمارها (اسانس و عصاره‌ی آبی گیاه رازیانه و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن در غلظت‌های محاسبه شده در سنجش IC_{50}) اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده شد (شکل ۹-ب و شکل ۱۰).

وجود در صد بالای سلول‌های نکروزه شده در تیمار شاهد (شکل ۱۱) می‌تواند به دلیل تراکم بالا در اثر رشد زیاد و در نتیجه مرگ بیشتر سلول‌های سرطانی در اثر کاهش منابع تأمین کننده انرژی باشد. بیشترین درصد سلول‌های نکروزه شده (۲۱/۹ درصد) مربوط به تیمار شاهد بود. همچنین بیشترین درصد لاین‌های سلولی Hs-578T واقع در مرحله پیش و پس‌آپوتوزیس (به ترتیب ۴/۵ و ۱۸/۷ درصد) مربوط به تیمار لاین‌های سلولی مذکور با نانوذرات نقره بیوسنتز شده بود (شکل ۹-b و شکل ۱۰).



شکل ۹. تأثیر اسانس و عصاره‌ی آبی گیاه رازیانه و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن بر درصد سلول‌های نکروزه شده، در صد سلول‌های موجود در مرحله پیش‌آپوتوزی و پس‌آپوتوزی لاین‌های سلولی (a) Sum-159 و (b) Hs-578T

Figure 9. Effect of essential oil and aqueous extract of fennel plant and metal nanoparticles biosynthesized from it on percentage of necrotic cells, percentage of cells in pre-apoptotic and post-apoptotic stage of a) Sum-159 and b) Hs-578T cell line



شکل ۱۰. نتایج فلو سایتومتری: a، b و c) لاین سلولی Hs-578T تیمار شده به ترتیب تیمار شاهد، عصاره آبی گیاه رازیانه و نانوذره نقره بیو سنتز شده از عصاره آبی گیاه رازیانه؛ d، e و f) لاین سلولی Sum-159 تیمار شده به ترتیب تیمار شاهد، عصاره آبی گیاه رازیانه و نانوذره نقره بیو سنتز شده از عصاره آبی گیاه رازیانه

Figure 10. Flow cytometry results: a, b and c) Hs-578T cell line treated with control treatment, aqueous extract of fennel plant and silver nanoparticle biosynthesized from aqueous extract of fennel plant respectively; d, e and f) Sum-159 cell line treated with control treatment, aqueous extract of fennel plant and silver nanoparticle biosynthesized from aqueous extract of fennel plant respectively

بذرها و اندام هوایی گیاه رازیانه دارای ترکیبات شیمیایی مهم دارویی از جمله کربوهیدرات‌ها، ساپونین‌ها، تانن‌ها، استروئیدها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، کوئینون‌ها، ترکیبات فنولی، آلکالوئیدها کوئرستین، روتین، کمپفرول، اسیدگالیک و غیره هستند که جهت پیشگیری و درمان سرطان، فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ambreen & Asad 2020). گیاه رازیانه سرشار از ترکیبات فلاونوئیدی به خصوص کوئرستین است که دارای خواص ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در این پژوهش مشخص شد علاوه بر این که وجود ترکیباتی نظیر کوئرستین، روتین، کمپفرول، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در عصاره آبی

گیاه رازیانه تأیید می‌شود (جدول ۱). هم‌چنین بیوسنتز نانوذرات فلزی هم‌چون آهن، مس، روی و نقره توسط عصاره آبی گیاه رازیانه توسط آزمون XRD و FTIR تأیید شد (شکل ۳ و ۴). استفاده از نانوذرات جهت انتقال ترکیبات دارویی و آنتی‌اکسیدانی گیاهی همانند کوئرستین به سلول‌های سرطانی (دارورسانی هدفمند) موجب افزایش پتانسیل ضدسرطانی و کاهش اثرات جانبی آن می‌شود (Lan et al. 2019). کوئرستین به عنوان یک ترکیب دارویی ضد رشد سلول‌های MCF-7 با کاهش فسفوریلاسیون P38MAPK به عنوان نشانه بارز تکثیر سلولی بازی می‌کند (Kim et al. 2019). کوئرستین موجود در ترکیبات گیاهی بر فاز G₁ سلول‌های توموری تأثیر می‌گذارد و با سرکوب بیان سیکلین D1، P21 و Twist در سلول MCF-7 باعث بروز آپوپتوز سلولی می‌شود (Hasan et al. 2022). علاوه بر این مشخص شده است که کوئرستین باعث القای آپوپتوز و نکروز سلول‌های MCF-7 می‌شوند (Kedhari Sundaram et al. 2019). هم‌چنین مشخص شده است که کوئرستین موجود در ترکیبات گیاهی موجب جلوگیری از تکثیر لاین‌های سلولی BT-474 با بیان بیش از حد آنزیم HER2 از طریق فعال نمودن مرحله آپوپتوز بیرونی وابسته به کاسپاز و سرکوب سیگنال‌دهی STAT3 می‌شود (Almatroodi et al. 2021). در پژوهشی Mohamad et al. (2011) با ارزیابی روش‌های مختلف استخراج ترکیبات فیتوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بیان کردند که عصاره متانولی به دست آمده از اندام هوایی گیاه رازیانه بر روی زنده‌مانی و تکثیر لاین‌های سلول سرطانی MCF-7 موثر بوده و میزان IC₅₀ قابل قبولی داشته است (Mohamad et al. 2011). در این پژوهش نیز مشخص شد که اسانس و عصاره آبی به دست آمده از اندام هوایی گیاه رازیانه بر روی رشد و زنده‌مانی لاین‌های سلولی Hs-578T و Sum-159 موثر است (شکل ۷ و ۸). طبق نتایج به دست آمده در این پژوهش میزان IC₅₀ حاصل در لاین سلولی Hs-578T تیمار شده با عصاره حاصل از نمونه‌های رشد یافته در شرایط طبیعی، اسانس حاصل و عصاره‌های آبی حاصل از نمونه کالوس‌های منتخب کمتر از لاین سلولی Sum-159 بود، که بیانگر مقاومت بیشتر لاین سلولی Sum-159 در برابر ترکیبات دارویی حاصل بوده است. با توجه به اندازه بزرگ نانوذرات در مقایسه با دارو، جذب آن به سلول‌ها به میزان بسیاری کمتری صورت می‌گیرد در حالی که انتقال آن به سلول‌های سرطانی به دلیل لیگاندهای سطحی افزایش می‌یابد. این استراتژی موجب می‌شود تا کارایی دارو بر بافت سرطانی افزایش یافته و در عین حال عوارض جانبی دارو بر سلول‌ها و بافت نرمال کاهش یابد. گیرنده‌های فولیک اسید به دلیل استفاده آن در چرخه سنتز DNA و با توجه به سرعت بالایی تقسیم DNA در سلول‌های سرطانی به طور قابل توجهی در سطح سلول‌های سرطانی بیشتر بیان می‌شوند. از این رو، مطالعات متعددی به منظور پوشش سطح نانوذرات مختلف با استفاده از فولیک اسید و با هدف افزایش بازده انتقال به سلول‌های سرطانی در سال‌های گذشته انجام گرفته است (Dave et al. 2020). مطابق نتایج به دست آمده در این پژوهش Keyhanfar & Mansouri Tehrani (2022)، با ارزیابی اثرات نانوذرات مس بر روی سلول‌های نرمال و سلول‌های سرطانی پروستات (1-HFF و 3-P)، بیان کردند که نانوذرات مس تأثیر مناسبی بر روی رده سلول‌های سرطانی دارند. نانوذرات اکسید روی، موجب کاهش رشد و زنده‌مانی سلول‌های سرطان پستان انسان (MCF-7) می‌شود. در حالی که تأثیری بر روی سلول‌های سالم نداشتند (Keyhanfar & Mansouri

(Tehrani 2022). با آزمایشی که توسط Al-Nuairi et al. (2020) بر روی نانوذرات نقره استخراج شده از گیاه بیابانی *Cyperus conglomeratus* انجام دادند، گزارش نمودند که نانوذرات نقره حاصل موجب عدم رشد و نابودی سلول‌های سرطان پستان MCF-7 می‌شود. همچنین گزارش نمودند که نانوذرات نقره بیوسنتز شده خواص فیزیکی مطلوبی داشته و خواص سیتوتوکسیک انتخابی را روی سلول‌های MCF-7 نشان دادند در حالی که بر سلول‌های فیروبلاست تأثیری نداشتند (Al-Nuairi et al. 2020). در این پژوهش مشخص شد که میزان IC_{50} لاین‌های سلولی Hs-578T و Sum-159 تیمار شده با نانوذرات آهن و روی بیوسنتز شده و عصاره آبی حاصل تقریباً برابر می‌باشد، اما میزان IC_{50} لاین‌های سلولی مذکور تیمار شده با نانوذرات مس و نقره بسیار کمتر از عصاره آبی گیاه رازیانه بود (شکل ۷ و ۸). که بیانگر تأثیر مثبت نانوذرات مس و نقره بر زنده‌مانی و رشد لاین‌های سلولی Hs-578T و Sum-159 در مقایسه با نانوذرات آهن و روی و همچنین عصاره آبی نمونه گیاه رشد یافته در طبیعت بود.

نتیجه‌گیری: از جمله نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از گیاهان دارویی می‌توان به نانوذرات طلا، نقره، پلاتین، مس، پالادیم، روی، نیکل و آهن که در پژوهش‌های مختلف اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی آن‌ها تأیید شده است. در این پژوهش از گیاه رازیانه جهت بیوسنتز نانوذرات آهن، مس، روی و نقره و تأثیرات آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی آن‌ها، عصاره آبی گیاه رازیانه و نانوذرات نانوذرات آهن، مس، روی و نقره بیوسنتز شده از آن استفاده شد. طبق نتایج به دست آمده در این پژوهش نانوذره نقره بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه رازیانه با بالاترین میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی خود، بهترین عملکرد را داشت.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی به خاطر حمایت مالی و حمایت معنوی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

- Ahamed M, Akhtar MJ, Khan MM, et al. (2016) Cobalt iron oxide nanoparticles induce cytotoxicity and regulate the apoptotic genes through ROS in human liver cells (HepG2). *Colloids Surf B* 148, 665-673.
- Ajinkya N, Yu X, Kaithal P, et al. (2020) Magnetic iron oxide nanoparticle (IONP) synthesis to applications: present and future. *J Mater* 13, e4644.
- Akbari A, Akbarzadeh A, Tehrani MR, et al. (2020) Development and characterization of nanoliposomal hydroxyurea against BT-474 breast cancer cells. *Adv Pharm Bull* 10, e39.
- Al-Nuairi AG, Mosa KA, Mohammad MG, et al. (2020) Biosynthesis, characterization, and evaluation of the cytotoxic effects of biologically synthesized silver nanoparticles from *Cyperus conglomeratus* root extracts on breast cancer cell line MCF-7. *Biol Trace Elem Res* 194, 560-569.

- Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Noorbakhsh H, et al. (2016) Study of the Antibacterial Activity of Methanolic and Aqueous Extracts of *Myrtus communis* on Pathogenic Strains Causing Infection. *Zahedan J Res Med Sci* 18, e5989.
- Almatroodi SA, Alsahli MA, Almatroudi A, et al. (2021) Potential therapeutic targets of quercetin, a plant flavonol, and its role in the therapy of various types of cancer through the modulation of various cell signaling pathways. *Molecules* 26, e1315.
- Alphandéry E (2020) Bio-synthesized iron oxide nanoparticles for cancer treatment. *Int J Pharm* 586, e119472.
- Ambreen A, Asad MJ (2020) Chapter-7 Phytochemistry. Chief Editor 109, e109.
- Andhare DD, Patade SR, Kounsalye JS, Jadhav K (2020) Effect of Zn doping on structural, magnetic and optical properties of cobalt ferrite nanoparticles synthesized via. Co-precipitation method. *Phys B Condens* 583, e412051.
- Bai J, Zheng Y, Wang G, Liu P (2016) Protective effect of D-limonene against oxidative stress-induced cell damage in human lens epithelial cells via the p38 pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2016, e5962832.
- Bandeira M, Giovanela M, Roesch-Ely M, et al. (2020) Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism of formation. *Sustain. Chem. Pharm* 15, e100223.
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016a) Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. *Czech J Anim Sci* 61, e487.
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016b) Predicting CpG Islands and Their Relationship with Genomic Feature in Cattle by Hidden Markov Model Algorithm. *Iran J Appl Anim Sci* 6 (3), 571-579.
- Bhuyan T, Mishra K, Khanuja M, et al. (2015) Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles from *Azadirachta indica* for antibacterial and photocatalytic applications. *Mater Sci Semicond* 32, 55-61.
- Boevé J-L, Sonet G, Jacobson HR, Angeli S (2023) Cypress terpenes in sawfly larva of *Susana cupressi* (Hymenoptera: Symphyta: Tenthredinoidea). *Sci Nat* 110, e13.
- Bost M, Houdart S, Oberli M, et al. (2016) Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J Trace Elem Med Biol* 35, 107-115.
- Bruna T, Maldonado-Bravo F, Jara P, Caro N (2021) Silver nanoparticles and their antibacterial applications. *Int J Mol Sci* 22, e7202.
- Cragg GM, Newman DJ (2005) Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol* 100, 72-79.

- Dağlıoğlu Y, Yılmaz Öztürk B (2019) A novel intracellular synthesis of silver nanoparticles using *Desmodesmus* sp. (Scenedesmaceae): different methods of pigment change. *Rend Lincei Sci Fis Nat* 30, 611-621.
- Dappula SS, Kandrakonda YR, Shaik JB, et al. (2023) Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using aqueous extract of *Andrographis alata*: Characterization, optimization and assessment of their antibacterial, antioxidant, antidiabetic and anti-Alzheimer's properties. *J Mol Struct* 1273, e134264.
- Dave V, Sharma R, Gupta C, Sur S (2020) Folic acid modified gold nanoparticle for targeted delivery of *Sorafenib tosylate* towards the treatment of diabetic retinopathy. *Colloids Surf B* 194, e111151.
- Dinparvar S, Bagirova M, Allahverdiyev AM, et al. (2020) A nanotechnology-based new approach in the treatment of breast cancer: Biosynthesized silver nanoparticles using *Cuminum cyminum* L. seed extract. *J Photochem Photobiol* 208, e111902.
- Gopinath V, Priyadarshini S, Al-Maleki A, et al. (2016) *In vitro* toxicity, apoptosis and antimicrobial effects of phyto-mediated copper oxide nanoparticles. *RSC Advances* 6, 110986-110995.
- Gur T, Meydan I, Seckin H, et al. (2022) Green synthesis, characterization and bioactivity of biogenic zinc oxide nanoparticles. *Environ Res* 204, e111897.
- Hasan AA, Tatarskiy V, Kalinina E (2022) Synthetic pathways and the therapeutic potential of quercetin and curcumin. *Int J Mol Sci* 23, e14413.
- Hassanpour SH, Dehghani M (2017) Review of cancer from perspective of molecular. *J Cancer Res Pract* 4, 127-129.
- Hurst W, Martin Jr R, Zoumas B (1979) Application of HPLC to characterization of individual carbohydrates in foods. *J Food Sci* 44, 892-895.
- Islam F, Shohag S, Uddin MJ, et al. (2022) Exploring the journey of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) toward biomedical applications. *J Mater* 15, e2160.
- Jabeen S, Qureshi R, Munazir M, et al. (2021) Application of green synthesized silver nanoparticles in cancer treatment—a critical review. *Mater Res Express* 8, e092001.
- Jamkhande PG, Ghule NW, Bamer AH, Kalaskar MG (2019) Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *J Drug Deliv Sci Technol* 53, e101174.
- Jin C, Wang K, Oppong-Gyebi A, Hu J (2020) Application of nanotechnology in cancer diagnosis and therapy-a mini-review. *Int J Med Sci* 17, e2964.

- Kang G, Mishyna M, Appiah KS, et al. (2019) Screening for plant volatile emissions with allelopathic activity and the identification of L-Fenchone and 1, 8-Cineole from star anise (*Illicium verum*) leaves. *Plant J* 8, e457.
- Kedhari Sundaram M, Raina R, Afroze N, et al. (2019) Quercetin modulates signaling pathways and induces apoptosis in cervical cancer cells. *Biosci Rep* 39, BSR20190720.
- Kędziora A, Speruda M, Krzyżewska E, et al. (2018) Similarities and differences between silver ions and silver in nanofoms as antibacterial agents. *Int J Mol Sci* 19, e444.
- Keidar M (2015) Plasma for cancer treatment. *Plasma Source Sci Technol* 24, e033001.
- Keyhanfar M, Mansouri Tehrani HA (2022) The role of plant antioxidants in the synthesis of metal nanoparticles. *J Plant Process Func* 12, 67-76.
- Khaniabadi PM, Shahbazi-Gahrouei D, Jaafar MS, et al. (2017) Magnetic iron oxide nanoparticles as T2 MR imaging contrast agent for detection of breast cancer (MCF-7) cell. *Avicenna J Med Biotechnol* 9(4), 181-188.
- Kim S-H, Yoo E-S, Woo J-S, et al. (2019) Antitumor and apoptotic effects of quercetin on human melanoma cells involving JNK/P38 MAPK signaling activation. *Eur J Pharmacol* 860, e172568.
- Kooti W, Moradi M, Ali-Akbari S, et al. (2015) Therapeutic and pharmacological potential of *Foeniculum vulgare* Mill: a review. *J HerbMed Pharmacol* 4, 1-9.
- Lan C-Y, Chen S-Y, Kuo C-W, et al. (2019) Quercetin facilitates cell death and chemosensitivity through RAGE/PI3K/AKT/mTOR axis in human pancreatic cancer cells. *J Food Drug Anal* 27, 887-896.
- Lima AL, Alves AF, Xavier AL, et al. (2016) Anti-inflammatory activity and acute toxicity studies of hydroalcoholic extract of *Herissantia tiubae*. *Rev Bras Farmacogn* 26, 225-232.
- Modena MM, Rühle B, Burg TP, Wuttke S (2019) Nanoparticle characterization: what to measure? *Adv Mater* 31, e1901556.
- Mohamad RH, El-Bastawesy AM, Abdel-Monem MG, et al. (2011) Antioxidant and anticarcinogenic effects of methanolic extract and volatile oil of fennel seeds (*Foeniculum vulgare*). *J Med Food* 14, 986-1001.
- Mohammadabadi MR, Mozafari MR (2018) Enhanced efficacy and bioavailability of thymoquinone using nanoliposomal dosage form. *J Drug Deliv Sci Technol* 47 (1), 445-453.
- Moradi S, Razavi S, Vasiee A (2014) Antioxidant and antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* L. on some pathogenic bacteria 'in vitro'. *Adv Agric* 3, 124-130.
- Mughal B, Zaidi SZJ, Zhang X, Hassan SU (2021) Biogenic nanoparticles: Synthesis, characterisation and applications. *Appl Sci* 11, e2598.

- Nasir A, Yabalak E (2021) Investigation of antioxidant, antibacterial, antiviral, chemical composition, and traditional medicinal properties of the extracts and essential oils of the *Pimpinella species* from a broad perspective: A review. *J Essent Oil Res* 33, 411-426.
- Naz S, Gul A, Zia M (2020) Toxicity of copper oxide nanoparticles: a review study. *IET Nanobiotechnol* 14, 1-13.
- Popescu R, Savu D, Dorobantu I, et al. (2020) Efficient uptake and retention of iron oxide-based nanoparticles in HeLa cells leads to an effective intracellular delivery of doxorubicin. *Sci Rep* 10, e10530.
- Reddy CV, Reddy IN, Akkinapally B, et al. (2019) Mn-doped ZrO₂ nanoparticles prepared by a template-free method for electrochemical energy storage and abatement of dye degradation. *Ceram Int* 45, 15298-15306.
- Roy A, Park H-J, Jung HA, Choi JS (2018) Estragole exhibits anti-inflammatory activity with the regulation of NF- κ B and Nrf-2 signaling pathways in LPS-induced RAW 264. 7 cells. *Nat Prod Sci* 24, 13-20.
- Sadhukhan P, Kundu M, Chatterjee S, et al. (2019) Targeted delivery of quercetin via pH-responsive zinc oxide nanoparticles for breast cancer therapy. *Mater Sci Eng C* 100, 129-140.
- Schwaminger SP, Syhr C, Berensmeier S (2020) Controlled synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles: magnetite or maghemite? *Crystals* 10, e214.
- Shnoudeh AJ, Hamad I, Abdo RW, et al. (2019) Synthesis, characterization, and applications of metal nanoparticles. *J Biomater Nanobiotechnol* 2019, 527-612.
- Shu H, Zhang W, Yun Y, et al. (2020) Metabolomics study on revealing the inhibition and metabolic dysregulation in *Pseudomonas fluorescens* induced by 3-carene. *Food Chem* 329, e127220.
- Singh R, Hano C, Nath G, Sharma B (2021) Green biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Carissa carandas* L. and their antioxidant and antimicrobial activity against human pathogenic bacteria. *Biomolecules* 11, e299.
- Soetaert F, Korangath P, Serantes D, et al. (2020) Cancer therapy with iron oxide nanoparticles: Agents of thermal and immune therapies. *Adv Drug Deliv Rev* 163, 65-83.
- Ssekatawa K, Byarugaba DK, Angwe MK, et al. (2022) Phyto-mediated copper oxide nanoparticles for antibacterial, antioxidant and photocatalytic performances. *Front Bioeng Biotechnol* 10, e820218.
- Sun Y-S, Zhao Z, Yang Z-N, et al. (2017) Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci* 13, e1387.

- Tao H, Wu T, Aldeghi M, et al. (2021) Nanoparticle synthesis assisted by machine learning. *Nat Rev Mater* 6, 701-716.
- Tian Q, Wang L, Sun X, et al. (2019) Scopoletin exerts anticancer effects on human cervical cancer cell lines by triggering apoptosis, cell cycle arrest, inhibition of cell invasion and PI3K/AKT signalling pathway. *J BUON* 24, 997-1002.
- Wagner GJ (1979) Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiol* 64, 88-93.
- Waks AG, Winer EP (2019) Breast cancer treatment: a review. *Jama* 321, 288-300.
- Wang L, Lankhorst L, Bernards R (2022) Exploiting senescence for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer* 22, 340-355.
- Warrington L, Absolom K, Conner M, et al. (2019) Electronic systems for patients to report and manage side effects of cancer treatment: systematic review. *J Med Internet Res* 21(1), e10875.
- Wong SP, Leong LP, Koh JHW (2006) Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem* 99, 775-783.
- Yan L, Liu X, Liu W-X et al. (2015) Fe₂O₃ nanoparticles suppress Kv1.3 channels via affecting the redox activity of Kvβ2 subunit in Jurkat T cells. *Nat Nanotechnol* 26, e505103.
- Zhao Y, Zhao X, Cheng Y, et al. (2018) Iron oxide nanoparticles-based vaccine delivery for cancer treatment. *Mol Pharmaceutics* 15, 1791-1799.

