



بررسی اثر سیتوتوکسیسیته نانو ذرات اکسید روی پوشش دار شده با کیتوزان توسط سیانوباکتریوم *Aliinostoc sp.* در مقابل سلول های سرطانی (Hep G-2)

بهاره نوروژی^{۱*}، محمد جباری^۱

^۱ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۱

چکیده

امروزه روش های سنتز سبز برای سنتز نانو ذرات به منظور جایگزینی روش های شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است. این مطالعه باهدف بیوسنتز نانو ذرات اکسید روی از عصاره سیانوباکتری و بررسی فعالیت سیتوتوکسیسیته آن در مقابل سلول های سرطانی هپاتوسلولار انسانی انجام شد. ابتدا نانو ذرات اکسید روی به سه روش مختلف (سوپرناتانت، فیکوسیائین و با کمک پلی ساکاریدهای خارج سلولی) از عصاره سیانوباکتریوم *Aliinostoc sp.* تهیه شدند و به منظور پایداری نانو ذرات سنتز شده با کیتوزان پوشش داده شدند. سپس اثر سیتوتوکسیسیته این ذرات بر روی سلول های سرطانی HepG-2 بررسی شد. آنالیز آماری داده های حاصل با نرم افزار SPSS (نسخه ۲۴) و Excel و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی انجام گردید. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نانو ذرات روی، میزان زنده ماندن سلول ها به طور معنی داری کاهش یافت. به طوری که در نمونه های ریز پوشانی شده، کمترین میزان زنده ماندن در $200 \mu\text{g/mL}$ و پس از آن در $100 \mu\text{g/mL}$ نانو ذرات روی به ترتیب با مقادیر $37/40$ و $44/03$ درصد و همچنین در نمونه های ریز پوشانی نشده، کمترین زنده ماندن در $200 \mu\text{g/mL}$ و پس از آن در $100 \mu\text{g/mL}$ نانو ذرات روی به ترتیب با مقادیر $46/80$ و $56/83$ درصد ملاحظه شد. پوشش دهی نانو ذرات سنتز شده با کیتوزان اثر کشندگی را بیشتر کرد و زنده ماندن سلول های سرطانی به طور قابل توجهی کاهش یافت.

واژه های کلیدی: سیانوباکتری، نانو ذرات اکسید روی، سیتوتوکسیسیته، سلول سرطانی

* bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir

مقدمه

در قرن ۲۱، نانو تکنولوژی زمینه تحقیقاتی جدید و نوظهوری را با سنتز موادی با اندازه نانو ایجاد کرده است. نانو ذرات مواد یا ذره‌های هستند که باید حداقل در یک بعد در دامنه اندازه ۱ تا ۱۰۰ نانومتر داشته باشند. نانو ذرات کوچک‌تر نسبت سطح به حجم بالاتر را نشان می‌دهند که این یک ویژگی حیاتی برای واکنش‌پذیری کاتالیزوری، هدایت حرارتی، فعالیت ضد میکروبی، ثبات شیمیایی و عملکرد نوری غیرخطی است. نانو ذرات به خاطر ویژگی‌های منحصربه‌فرد الکترونیکی، نوری، مکانیکی، مغناطیسی و شیمیایی به‌طور قابل توجهی متفاوت از مواد حجیم هستند. چنین ویژگی‌هایی در حال حاضر نقش مهمی در تشخیص پزشکی، سیستم‌های داروسازی، کاربردهای درمانی و ژن درمانی و مهندسی بافت ایفا می‌کنند (۱، ۲). نانو ذرات ضد میکروبی با بسیاری از گونه‌های میکروارگانیسم‌ها مقابله می‌کنند. همچنین استفاده از نانو ذرات ضد میکروبی بسیار مقرون به صرفه است. نانو ذرات

نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها ضرر کمتری دارند و در برابر شرایط سخت مقاومت بیشتری دارند. نانو ذرات به صورت یکنواخت در بافت هدف توزیع می‌شوند (۳). امروزه از جلبک‌ها در سنتز نانو ذرات استفاده می‌کنند. سنتز سبز نانو ذرات روز به روز در حال افزایش است زیرا جلبک‌ها منبع غنی هستند. متابولیت‌های ثانویه، کشت آسان، رشد سریع و مقیاس‌پذیر هستند. در دوران اخیر سنتز سبز نانو ذرات به عنوان یک روش ایمن، ساده، پایدار و مقرون به صرفه توجه گسترده‌ای را به خود جلب کرده است. در میان طیف متنوع جلبک‌ها، جلبک‌هایی که به‌طور گسترده برای بیوسنتز نانو ذرات مورد بررسی قرار گرفته‌اند، سیانوباکتری‌ها هستند. به دلیل زیست سازگاری، ایمنی و خواص فیزیکی و شیمیایی منحصربه‌فرد نانو ذرات، نانو ذرات بیوسنتز شده توسط سیانوباکتری‌ها برای بسیاری از کاربردهای زیست پزشکی شامل ضد باکتری، ضد قارچ، ضد سرطان، فعالیت‌های ضد رسوب، زیست پالایی و زیست حسگر مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴).

جدول ۱- انواع توکسین‌های سیانوباکتری (۵)

توکسین	جنس	تأثیرات طولانی مدت سلامتی	تأثیرات سلامتی کوتاه مدت
Microcystins	Anabaena, Aphanocapsa, Hapalosphon, Microcystis, Nostoc, Oscillatoria, Planktothrix	تومور و نارسایی کبد که منجر به مرگ می‌شود	درد گوارشی، التهاب کبد و خونریزی، نارسایی کبد که منجر به مرگ، ذات‌الریه و درمانیت می‌شود
Nodularins	Nodularia	مشابه میکروسیستین‌ها	مشابه میکروسیستین‌ها
Saxitoxins	Anabaena, Aphanizomenon, Cyndrospermopsis, Lyngbya	ناشناخته	سوزن سوزن شدن، سوزش، بی‌حسی، خواب‌آلودگی، گفتار ناهماهنگ و فلج تنفسی منجر به مرگ می‌شود
Anatoxins	Anabaena, Aphanizomenon, Oscillatoria, Planktothrix	آریتمی قلبی منجر به مرگ	سوزن سوزن شدن، سوزش، بی‌حسی، خواب‌آلودگی، گفتار ناهماهنگ و فلج تنفسی منجر به مرگ می‌شود
Cylindrospermopsin	Aphanizomenon, Cyndrospermopsis, Umezakia	بی‌اشتهایی و نارسایی کبد منجر به مرگ	درد گوارشی، التهاب کبد و خونریزی، ذات‌الریه و درمانیت
Lipopolysaccharide	Aphanizomenon oscillatoria	ناشناخته	درد گوارشی و درمانیت
Lyngbyatoxins	Lyngbya	تومورهای پوستی	درمانیت

و یک نگرانی مهم برای سلامت عمومی است. HepG-2 یک رده سلولی محبوب کبدی است. در طیف وسیعی از مطالعات از انکوژنز گرفته تا سمیت سلولی مواد روی کبد استفاده می‌شود (۱۰).

در این بررسی ابتدا با سه روش مختلف، نانوذره از سویه سیانوباکتری تهیه شد. سپس نانوذره سنتز شده، توسط چهار تکنیک مختلف نشان ویژه سازی انجام گرفت و در نهایت باهدف بررسی فعالیت ضد سیتوتوکسیسیته، فعالیت زیستی نانو ذرات سنتز شده در مقابل سلول‌های سرطانی هپاتوسلولار انسانی Hep G-2 بررسی شد. در این بررسی هر روشی که دارای بیشترین کارایی جهت سنتز نانوذره بود انتخاب و در مراحل بعدی مورد بررسی گرفت. با توجه به خواص نانو ذرات سنتز شده، هدف از این تحقیق تولید سبز نانو ذرات اکسید روی توسط سویه سیانوباکتری های بومی ایران است و کاربرد نانو بیوتکنولوژی ذرات سنتز شده برای از بین بردن سلول‌های سرطانی هپاتوسلولار انسانی Hep G-2 است. استفاده از این فناوری در ایران توسط سویه *Aliinostoc sp.* برای اولین بار می‌تواند گامی مهم در معرفی اهمیت تولید و سنتز سبز نانو ذرات سیانوباکتری ها قلمداد گردد.

مواد و روش‌ها

کشت سویه سیانوباکتری *Aliinostoc sp.*

ابتدا سویه سیانوباکتری *Aliinostoc sp.* از مجموعه کشت سیانوباکتری های Cyanobacteria culture collection (CCC) کشت و از خالص و آکترنیک بودن کشت‌ها اطمینان حاصل شد. کشت نمونه‌های خالص شده در محیط کشت مایع BG11^۵ در اتاقک رشد با دمای $28 \pm 2^\circ\text{C}$ و روشنایی ممتد فلورسنت با شدت ۳۰۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه برای ۳۰ روز انجام شد (۱۱) (۱۲، ۱۳).

بیوسنتز نانو ذرات اکسید روی روش اول: استفاده از سوپرناتانت

در میان نانو ذرات، نانو مواد ZnO به دلیل مزایای بسیاری مانند: ۱- نقش اساسی روی در فرآیندهای فیزیولوژیکی ۲- استفاده طولانی مدت ۳- سازگاری زیستی ۴- تجزیه پذیری زیستی ۵- عامل دار شدن آسان تر به دلیل دارا بودن سطح غنی از گروه OH^- ۶- سنتز آسان تر و ۷- هزینه کم نانو ذرات اکسید روی اغلب به عنوان حامل انتقال بیومولکول‌های مختلف (دارو، ژن و غیره) استفاده می‌شوند. همچنین می‌توان از آن‌ها برای درمان بیماری‌های مختلف مانند سرطان عفونت میکروبی، دیابت و بیماری‌های قلبی عروقی استفاده کرد. علاوه بر این ZnO-NP ها کاربردهای عالی برای بهبود زخم و مهندسی بافت دارند. علاوه بر کاربردهای درمانی، ZnO-NP ها همچنین می‌توانند برای اهداف تشخیصی مفید باشند (۶، ۷).

بسیاری از ویژگی‌های خاص ZnO با این واقعیت تأیید می‌شوند که در بین تمام عناصر گروه ششم جدول تناوبی، انرژی یونیزاسیون برای اکسیژن بالاترین است که به قوی ترین رابطه بین Zn (3d) و O (2p) منجر می‌شود. ZnO کاربردهای متعددی دارد و معمولاً در ترکیب لوسیون های ضد آفتاب و کاتالیزورها به دلیل زیست سازگاری زیاد و سمیت کم و اقتصادی استفاده می‌شود.

ZnO همچنین به عنوان یک افزودنی در تعداد زیادی از محصولات صنعتی مانند رنگ، لاستیک، لوازم آرایشی و پوشش استفاده می‌شود. نانو ساختارهای ZnO برای سلول‌های خورشیدی و همچنین در نمایشگرهای کریستال به کار می‌روند (۸). کیتوزان یک پلی ساکارید طبیعی فراوان است که به علت خواص بسیار مفید آن به عنوان یک حامل نانو ذرات شناخته شده است. در مقایسه با پلیمرهای مصنوعی، کیتوزان به دست آمده توسط استیل زایی کیتین به دلیل زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و پایداری بهتر و سمیت کمتر برای تشکیل نانو ژل‌ها مناسب است (۹).

سرطان کبد سومین علت مرگ ناشی از سرطان در سراسر جهان است. سرطان کبد تأثیر چشمگیری بر زندگی ما دارد

محلول نترات روی هگزا هیدرات $[Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O]$ یک میلی مولار و pH ۷ انجام شد. سپس مخلوط حاصل در $25^\circ C$ نور فلورسنت قرار گرفت و طیف سنجی در فواصل ۱۲ ساعت انجام شد (۱۵).

روش سوم: بیوستتر نانوذره اکسید روی با استفاده از پلی ساکاریدهای خارج سلولی

بیومس سویه در فاز لگاریتمی، به کمک سانتریفیوژ در rpm ۳۰۰۰ جداسازی شد سوپرناتانت برای جداسازی پلی ساکاریدهای خارج سلولی استفاده گردید. حجم مساوی با سوپرناتانت، اتانول ۹۵٪ اضافه شد و در فریزر $20^\circ C$ در کل شب قرار گرفت. پلی ساکاریدها رسوب شده و به کمک سانتریفیوژ در سرعت rpm ۱۰۰۰۰ جداسازی شد. رسوب حاصل فریزدرای گردید و کل وزن آن محاسبه شد. سپس ۱/۳ میلی گرم بر میلی لیتر پلی ساکارید خشک شده در ۳ ml محلول نترات روی هگزا هیدرات $[Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O]$ یک میلی مولار و pH ۷ معلق شد و سپس در دو لوله آزمایش تقسیم و محلول به دست آمده در $25^\circ C$ و نور فلورسنت قرار گرفت. سپس طیف سنجی در فواصل ۱۲ ساعت انجام شد (۱۶).

از کشت های فاز لگاریتمی ۱۰۰ سی سی برداشته شد و داخل دو عدد فالکن ۵۰ میلی لیتری ریخته شد، سپس با دور rpm ۵۰۰۰ و ۵ دقیقه، سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت به دست آمده (۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد) به یک میلی مولار محلول نترات روی هگزا هیدرات $[Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O]$ در غلظت های مختلف اضافه شد (۱۴).

روش دوم: بیوستتر نانوذره اکسید روی با استفاده از رنگدانه فیکوسیاینین

برای جداسازی فیکوسیاینین، ۵۰۰ ml از محیط کشت ۱۴ روزه در rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ و رسوب حاصله با بافر فسفات ۷/۲ pH شسته و لیوفیلیزه شد. دو گرم از بیومس فریزدرای شده در ۵۰۰ ml بافر سدیم فسفات (۰/۱ مولار، pH ۷/۲) معلق شد. فیکوبیلی پروتئین ها با تکرار روش فریز کردن در $20^\circ C$ - دوباره ذوب کردن در دمای اتاق و تاریکی استخراج شد. مخلوط در $10000 \times g$ برای سی دقیقه در $5^\circ C$ سانتریفیوژ شد و محتوای فیکوسیاینین جمع آوری شد. خلوص رنگدانه با استفاده از نسبت ۶۲۰/۲۸۰ سنجیده و مخلوط حاصل فریزدرای گردید. بیوستتر نانو ذرات اکسید روی با حل کردن ۵ میلی گرم بر میلی لیتر اکسید روی در ۱۰ میلی لیتر

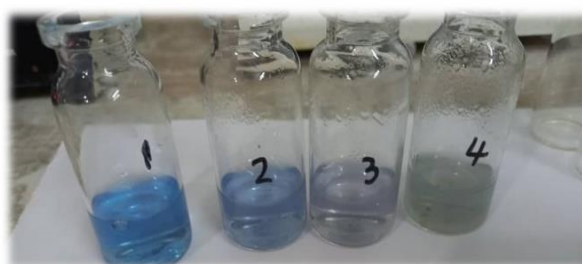
A



B



C



شکل ۱- سنتز نانوذره نقره با سه روش مختلف A: با استفاده از سوپرناتانت، B: با استفاده از رنگدانه فیکوسیاینین، C: با استفاده از پلی ساکاریدهای خارج سلولی.

طیف‌سنجی نانو ذرات

مخلوط‌های تلقیح شده روی شیکر بین 28°C – 30°C به‌طور ممتد شیک شد و نمونه‌برداری در دوره‌های زمانی مختلف (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) انجام گرفت. یک میلی‌لیتر محلول مایع در هر دوازده ساعت برداشت شد. بعد از انجام سانتریفیوژ، طیف‌سنجی در طول موج‌های ۳۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر انجام شد. پیک‌های موجود بین طیف‌های ۴۰۰ و ۴۵۰ نانومتر به‌عنوان نانوذره تولیدشده محسوب شدند (۱۵).

پایدارسازی و پوشش‌دار کردن نانوذره تولیدشده

نانو ذرات اکسید روی پایدار شده با کیتوزان با جرم مولکولی بالا از طریق احیای شیمیایی محلول نیترات روی هگزا هیدرات $[\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ تولید شد. به‌این‌ترتیب که دو میلی‌لیتر محلول اسیدی کیتوزان ۰/۷ درصد وزنی حجمی (با حل کردن ۳۵ میلی گرم پلی ساکارید در ۵ میلی‌لیتر محلول اسید استیک ۰/۵ درصد حجمی) به یک میلی‌لیتر نانوذره تولیدشده اضافه و برای یک ساعت مخلوط شد. نیم ساعت بعد محلول آبی سه‌ساعته NaBH_4 (دو میلی‌لیتر، ۵۰ میلی مول بر لیتر) قطره‌قطره اضافه گردید. هم زدن تقریباً دو ساعت ادامه یافت تا واکنش به‌طور کامل انجام شود و سپس در دمای 4°C درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۷).

تخمین و نشان ویژه سازی نانوذره اکسید روی

آنالیز میکروسکوپ الکترونی ترنس‌میشن (TEM)

تجزیه و تحلیل TEM با استفاده از ۳ میکرولیتر از محلول نمونه قرار داده شده بر روی شبکه‌های مسی با پوشش کربن انجام شد. یک لایه نازک از نمونه روی شبکه ساخته شد و نمونه‌های اضافی با استفاده از یک مخروط کاغذ لکه‌برداری برداشته شد. به‌طور متوالی در یک جعبه توری نگهداری و تصاویر TEM تهیه گردید. ولتاژ ۲۰۰ Kv مورد استفاده قرار گرفت. اندازه میانگین نانو ذرات اکسید روی با اندازه‌گیری حداقل ۱۰۰ ذره تعیین شد (۱۸).

طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR)
تغییرات گروه‌های عاملی متصل به سطح نانو ذرات روی با یک طیف‌سنج FTIR شناسایی شدند. نانو ذرات خشک‌شده با بروماید پتاسیم به نسبت ۱:۱۰۰ مخلوط شدند. نمونه ۱۰۰ میکرو لیتری در آنالایزر بازتاب کلی ضعیف قرار داده شد. محلول نانو ذرات اکسید روی توسط ATR-FTIR آنالیز شد. طیف پرتوهای IR در طول ۴۰۰–۴۰۰۰ سانتی‌متر باحالت بازتاب منتشر در وضوح 4 cm^{-1} اسکن شد (۱۲، ۱۹).

آزمون توزیع اندازه ذرات (DLS)

DLS برای بررسی اندازه هیدرودینامیکی، پراکندگی چندگانه و تجمع نانو ذرات روی استفاده شد. برای اندازه‌گیری توزیع اندازه نانو ذرات روی سنتز شده از یک سیستم نانو زتاسایزر (Malvern Instruments) استفاده گردید (۲۰، ۲۱).

آزمون پتانسیل زتا

پتانسیل زتا نانو ذرات روی بیوستتر شده با قرار دادن ۲ میلی‌لیتر از نمونه‌ها در یک کووت پلاستیکی شفاف چهاروجهی در دستگاه زتا سایزر در دمای 25°C تعیین شد. اندازه‌گیری مستقیماً در سلول زتا یک بار مصرف شفاف انجام گرفت (۲۲).

آزمون سیتوتوکسیسیته در مقابل Hep G-2 (سلول‌های سرطانی هپاتوسلولار انسانی Hep G-2)

برای تعیین سیتوتوکسیسیته سلول‌های سرطانی Hep G-2 کشت داده شد. سپس به‌وسیله سمپلر سلولی داخل باکس‌های ۹۶ تایی ریخته شد. سپس نانو ذرات اکسید روی پوشش‌دار شده را داخل آن‌ها ریخته و رقت سازی انجام گرفت و داخل آنکو باتور CO_2 دار به مدت دو روز قرار گرفت. بعد از دو

طول موج حدوداً ۳۸۰ نانومتر برای نانو ذرات اکسید روی رخ داده است.

مقایسه طیف جذبی نانو ذرات اکسید روی تهیه شده به روش فیکوسیائین در زمان‌های مختلف نشان داد که برای تمامی نمونه‌ها، مشخصه باند جذب تشدید پلاسمون سطحی در طول موج حدوداً ۳۸۰ نانومتر برای نانو ذرات اکسید روی رخ داده است. با توجه به اینکه نانو ذرات اکسید روی در طول موج حدوداً ۳۸۰ نانومتر جذب نور دارند، در مطالعه حاضر با استناد بر میزان جذب‌های به دست آمده، تولید نانو ذرات اکسید روی توسط فیکوسیائین تأیید شد.

مقایسه طیف جذبی نانو ذرات اکسید روی تهیه شده به روش پلی ساکارید خارج سلولی در زمان‌های مختلف نشان داد که برای تمامی نمونه‌ها، مشخصه باند جذب تشدید پلاسمون سطحی در طول موج حدوداً ۳۸۰ نانومتر برای نانو ذرات اکسید روی رخ داده است. با توجه به اینکه نانو ذرات اکسید روی در طول موج حدوداً ۳۸۰ نانومتر جذب نور دارند، در مطالعه حاضر با استناد بر میزان جذب‌های به دست آمده، تولید نانو ذرات اکسید روی توسط پلی ساکارید خارج سلولی تأیید شد.

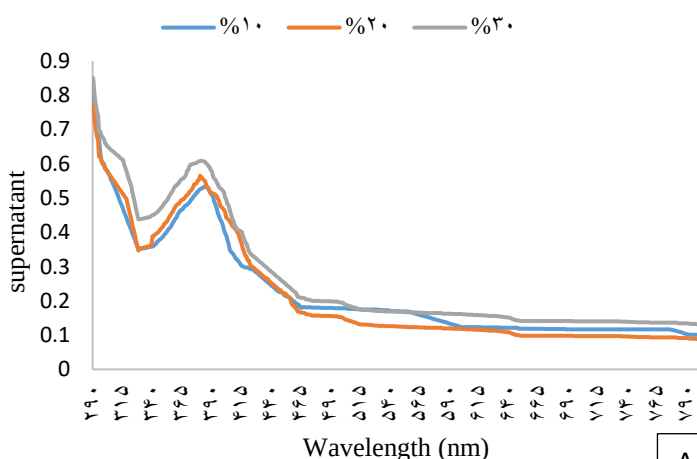
روز داخل پلیت ریدر گذاشته شد که بر اساس جذب نور سلولی آنالیزها انجام شد (۲۳).

روش‌های آماری

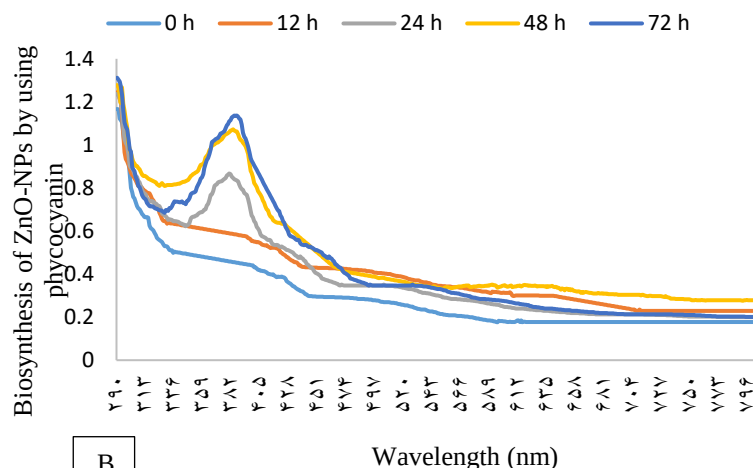
آنالیزهای آماری داده‌های حاصل از هر آزمایش با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۴) و Excel انجام شد. تمام داده‌ها حاصل از نتایج سه تکرار بود. تفاوت معنی‌دار بین عوامل اندازه‌گیری شده با آنالیز واریانس یک‌طرفه با حدود اطمینان ۹۵ درصد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام گردید و نتایج مربوط به مقایسه‌ها به صورت نمودار با برنامه Excel نشان داده شد.

نتایج

نتایج مقایسه طیف‌های جذبی نانو ذرات روی بیوسنتز شده توسط *Aliinostoc* sp. با روش‌های سوپرناتانت، فیکوسیائین و پلی ساکارید خارج سلولی به ترتیب در شکل ۲ ارائه شده است. مقایسه طیف جذبی نانو ذرات اکسید روی تهیه شده به روش سوپرناتانت در مولاریته‌های مختلف نشان داد که برای هر سه نمونه مشخصه باند جذب تشدید پلاسمون سطحی در



A



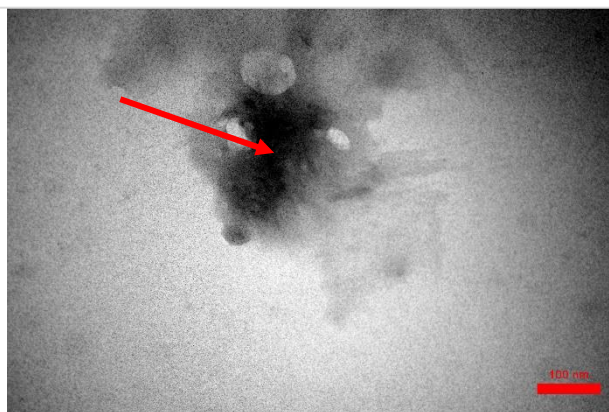
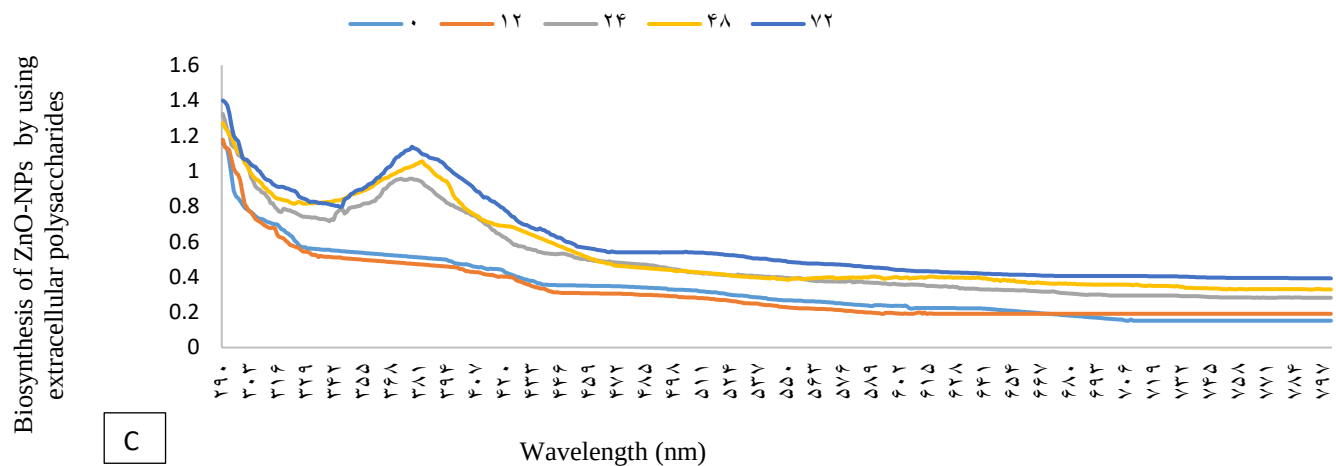
B

شکل ۲- A. مقایسه طیف جذبی نانو ذرات اکسید روی تهیه شده به روش سوپرناتانت در درصدهای مختلف B. مقایسه طیف جذبی نانو ذرات اکسید روی تهیه شده به روش پلی ساکارید خارج سلولی در ساعت‌های مختلف C. مقایسه طیف جذبی نانو ذرات اکسید روی تهیه شده به روش پلی ساکارید خارج سلولی در ساعت‌های مختلف.

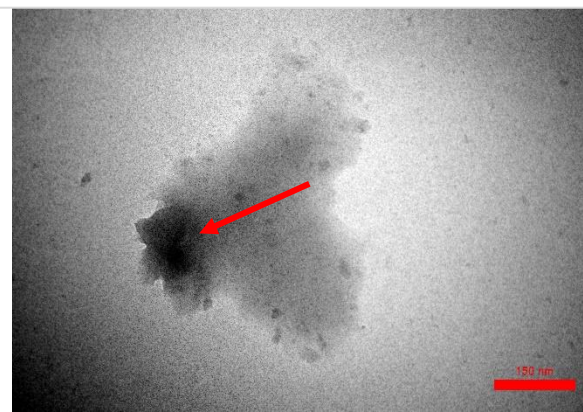
زیر نشان داده شده است. نانو ذرات اکسید روی پوشش دهی شده به صورت کره‌های به هم چسبیده با ابعاد حدودی ۶۰۰-۷۰۰ نانومتر ملاحظه شدند.

نتایج بررسی نانو ذرات اکسید روی ریز پوشانی شده با کیتوزان توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

نتایج بررسی نانو ذرات اکسید روی ریز پوشانی شده با کیتوزان توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری در شکل‌های



(a)



(b)

شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه‌های نانو ذرات اکسید روی (a) و (b): نانو ذره‌های به هم چسبیده با پوشش کیتوزان با ابعاد حدود ۵۰۰-۶۰۰ نانومتر

در جداول ۲ و ۳ و شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که نمونه‌های سوپرناتانت و پلی ساکارید خارج سلولی، به ترتیب با مقادیر ۱۵۹/۹ و ۲۰۶/۲ نانومتر دارای

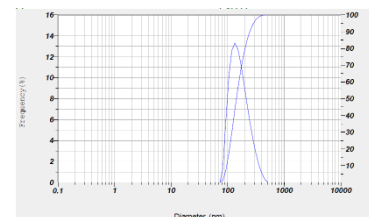
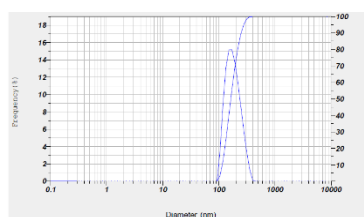
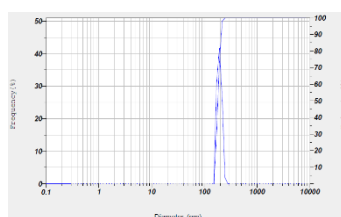
نتایج اندازه ذرات و پتانسیل زتا

میانگین اندازه نانو ذرات اکسید روی تولید شده با روش‌های مختلف بر حسب نانومتر و شاخص چند پراکندگی (PI) آن‌ها

کوچک‌ترین و بزرگ‌ترین میانگین اندازه ذرات بودند. مقادیر ۰/۴۴۴ و ۰/۳۷۵ دارای بزرگ‌ترین و کوچک‌ترین PI همچنین نمونه‌های سوپرناتانت و فیکوسیائین، به ترتیب با بودند.

جدول ۲- نتایج اندازه ذرات اکسید روی تولیدشده با روش‌های مختلف

نمونه	میانگین اندازه ذرات (نانومتر)	PI
سوپرناتانت	۱۵۹/۹C	۰/۴۴۴a
فیکوسیائین C	۱۸۹/۹b	۰/۳۷۵C
پلی ساکاریدهای خارج سلولی	۲۰۶/۲a	۰/۴۳۰b

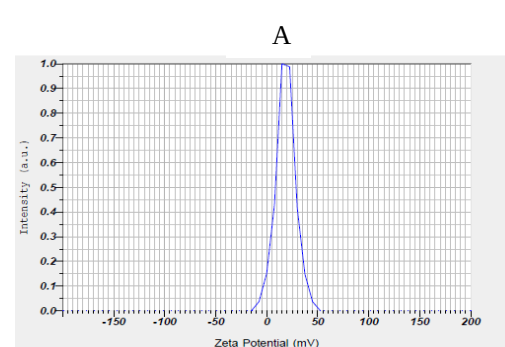
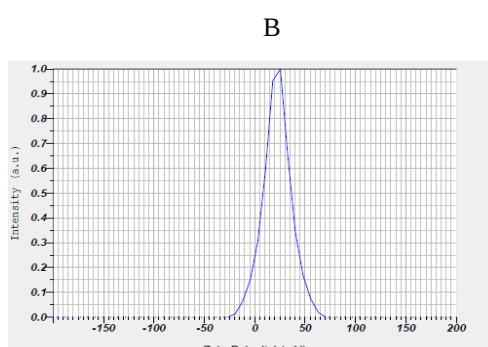
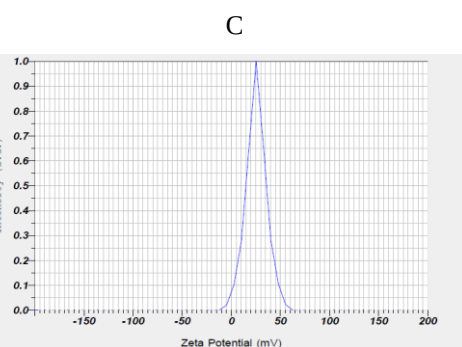


شکل ۴- A-اندازه ذرات نانو ذرات اکسید روی تهیه‌شده به روش سوپرناتانت؛ B - اندازه ذرات نانو ذرات اکسید روی تهیه‌شده به روش فیکوسیائین؛ C - اندازه ذرات نانو ذرات اکسید روی تهیه‌شده به روش پلی ساکارید خارج سلولی.

میانگین پتانسیل زتای نانو ذرات اکسید روی تولیدشده با روش‌های مختلف برحسب میلی ولت در جدول ۳ و شکل ۵ ارائه شده است. نتایج نشان داد که نمونه‌های سوپرناتانت و پلی ساکارید خارج سلولی، به ترتیب با مقادیر ۲۵/۴ و ۱۸/۷ میلی ولت دارای بزرگ‌ترین و کوچک‌ترین پتانسیل زتا بودند.

جدول ۳ - نتایج اندازه ذرات اکسید روی تولیدشده با روش‌های مختلف

نمونه	پتانسیل زتا (mV)
سوپرناتانت	۲۵/۴ a
فیکوسیائین C	۲۲/۴ b
پلی ساکاریدهای خارج سلولی	۱۸/۷ c

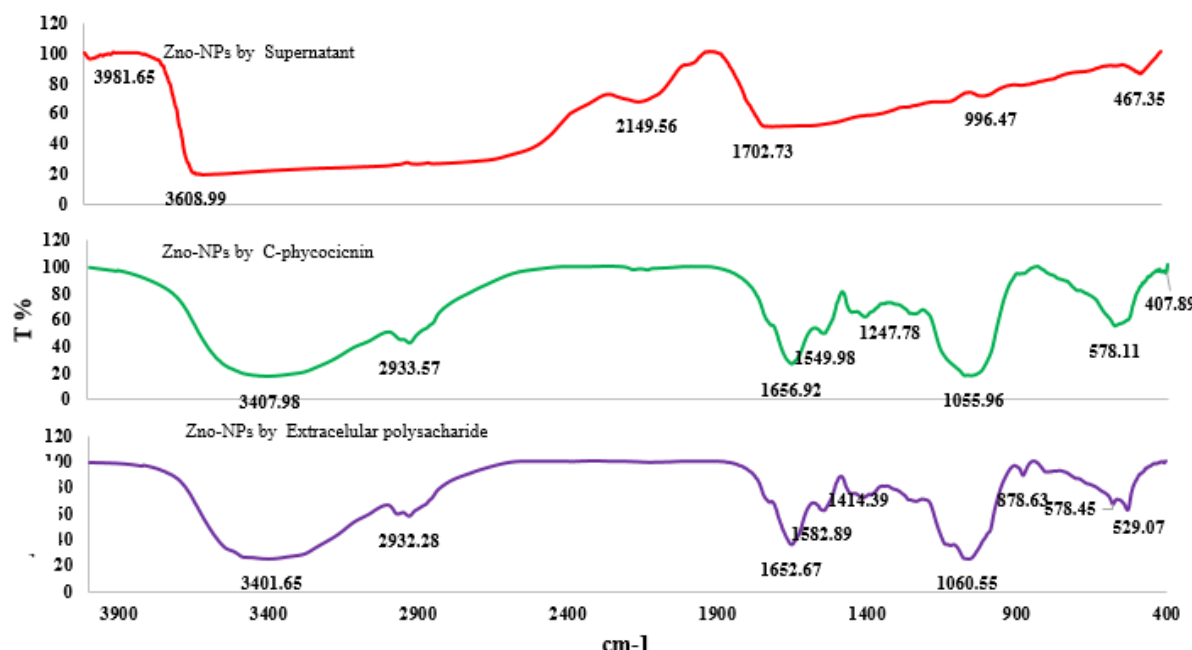


شکل ۵-A: پتانسیل زتای نانو ذرات اکسید روی تهیه شده به روش پلی ساکارید خارج سلولی B: پتانسیل زتای نانو ذرات اکسید روی تهیه شده به روش فیکوسیاین C: پتانسیل زتای نانو ذرات اکسید روی تهیه شده به روش سوپرناتانت

ساکارید خارج سلولی ناشی از ارتعاش کششی لاتیس اکسید روی است. در نمونه سوپرناتانت پیک‌های دیگر در عدد موجی ۲۱۴۹/۵۶ و ۱۷۰۲/۷۳ سانتی متر معکوس در نمونه فیکوسیاین، در عدد موجی ۱۶۵۶/۹۲، ۱۵۴۹/۹۸، ۱۲۴۷/۷۸ و ۱۰۵۵/۹۶ سانتی متر معکوس در نمونه‌های پلی ساکاریدهای خارج سلولی و در عدد موجی ۱۰۶۰/۵۵، ۱۴۱۴/۳۹، ۱۶۵۲/۶۷ و ۱۵۸۲/۸۹ سانتی متر معکوس همگی مربوط به مواد سازنده اکسید روی هستند (به ترتیب مربوط به ارتعاش کششی حلقه آروماتیک، ارتعاش کششی گروه C-O، ارتعاش خمشی پیوند CH₂ و CH هستند) و می‌توان به پروتئین نسبت داده شوند.

نتایج طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FT-IR)

طیف FT-IR نانو ذرات اکسید روی در شکل ۶ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود پیک در محدوده ۳۲۰۰ تا ۳۷۰۰ مربوط به ارتعاش کششی پیوند OH است که در نمونه‌های سوپرناتانت، فیکوسیاین و پلی ساکارید خارج سلولی به ترتیب در اعداد موجی ۳۶۰۸/۹۹، ۳۴۰۷/۹۸ و ۳۴۰۱/۶۵ سانتی متر معکوس خود را نشان داده است که ناشی از حضور رطوبت در سامانه از پیش یا به هنگام گرفتن طیف است. پیک دوم در عدد موجی ۴۶۵/۳۷ سانتی متر معکوس در نمونه سوپرناتانت، عدد موجی ۵۷۸/۱۱ و ۴۰۷/۸۹ سانتی متر معکوس در نمونه فیکوسیاین و پیک دوم در عدد موجی ۵۲۹/۰۷ و ۵۷۸/۴۵ سانتی متر معکوس در نمونه پلی



شکل ۶- مقایسه طیف FT-IR نانو ذرات اکسید روی تولید شده با روش‌های سوپرناتانت، فیکوسیاین c و پلی ساکارید خارج سلولی

جدول ۵- نتایج حاصل از گروه‌های عاملی حاصل از طیف FTIR

سوپرناتانت	فیکوسیاین	پلی ساکارید خارج سلولی
------------	-----------	------------------------

گروه عاملی	عدد موجی (cm^{-1})	گروه عاملی	عدد موجی (cm^{-1})	گروه عاملی	عدد موجی (cm^{-1})	گروه عاملی	عدد موجی (cm^{-1})
ارتعاش کششی		ارتعاش کششی		ارتعاش کششی		ارتعاش کششی	
پیوند OH ناشی از		پیوند OH ناشی از		پیوند OH ناشی از		پیوند OH ناشی از	
حضور رطوبت در	۳۶۰۸/۹۹	حضور رطوبت در	۳۴۰۷/۹۸	حضور رطوبت در	۳۴۰۱/۶۵	حضور رطوبت در	۳۴۰۱/۶۵
سامانه از پیش یا به		سامانه از پیش یا به		سامانه از پیش یا به		سامانه از پیش یا به	
هنگام گرفتن طیف		هنگام گرفتن طیف		هنگام گرفتن طیف		هنگام گرفتن طیف	
ارتعاش کششی	۴۶۵/۳۷	ارتعاش کششی	۵۷۸/۱۱، ۴۰۷/۸۹	ارتعاش کششی	۵۲۹/۰۷، ۵۷۸/۴۵	ارتعاش کششی	۵۲۹/۰۷، ۵۷۸/۴۵
لاتیس اکسید روی		لاتیس اکسید روی		لاتیس اکسید روی		لاتیس اکسید روی	
ارتعاش کششی		ارتعاش کششی		ارتعاش کششی		ارتعاش کششی	
حلقه آروماتیک،		حلقه آروماتیک،		حلقه آروماتیک،		حلقه آروماتیک،	
ارتعاش کششی	۲۱۴۹/۵۶	ارتعاش کششی	۱۶۵۶/۹۲	ارتعاش کششی	۱۰۶۰/۵۵	ارتعاش کششی	۱۰۶۰/۵۵
گروه C-O،		گروه C-O،		گروه C-O،		گروه C-O،	
ارتعاش خمشی	۱۷۰۲/۷۳	ارتعاش خمشی	۱۵۴۹/۹۸	ارتعاش خمشی	۱۴۱۴/۳۹	ارتعاش خمشی	۱۴۱۴/۳۹
پیوند CH_3 و CH_2		پیوند CH_3 و CH_2		پیوند CH_3 و CH_2		پیوند CH_3 و CH_2	
ارتعاش خمشی		ارتعاش خمشی		ارتعاش خمشی		ارتعاش خمشی	
پیوند CH_3 و CH_2		پیوند CH_3 و CH_2		پیوند CH_3 و CH_2		پیوند CH_3 و CH_2	
هستند		هستند		هستند		هستند	

نتایج آزمایش‌های سیتوتوکسیتی

نتایج آزمایش‌های سیتوتوکسیتی نانو ذرات اکسید روی ریز پوشانی شده و ریز پوشانی نشده در جدول ۶ ارائه شده است. نتایج بیانگر این مطلب است که با افزایش غلظت نانو ذرات روی، میزان زنده‌مانی سلول‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت.

در نمونه‌های ریز پوشانی شده، کمترین میزان زنده‌مانی در ۲۰۰ $\mu\text{g/mL}$ و پس‌از آن در ۱۰۰ $\mu\text{g/mL}$ نانو ذرات روی به

ترتیب با مقادیر ۳۷/۴۰ و ۴۴/۰۳ درصد و همچنین در نمونه‌های ریز پوشانی نشده، کمترین میزان زنده‌مانی در ۲۰۰ $\mu\text{g/mL}$ و پس‌از آن در ۱۰۰ $\mu\text{g/mL}$ نانو ذرات روی به ترتیب با مقادیر ۴۶/۸۰ و ۵۶/۸۳ درصد ملاحظه شد. از طرفی می‌توان بیان نمود که در تمامی غلظت‌های موردبررسی، سیتوتوکسیتی نمونه‌های ریز پوشانی شده بیشتر از نمونه‌های ریز پوشانی نشده بود.

جدول ۶- نتایج آزمایش‌های سیتوتوکسیتی نانو ذرات اکسید روی ریز پوشانی شده و ریز پوشانی نشده

غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید روی ($\mu\text{g/mL}$)		درصد زنده‌مانی (%)	
		پوشش‌دار نشده	پوشش‌دار شده
۲۰۰	(a) $46/8 \pm 0/1$	(a) $37/40 \pm 5/1$	
۱۰۰	(b) $56/83 \pm 4/2$	(b) $44/03 \pm 3/2$	
۵۰	(c) $77/73 \pm 2/1$	(c) $55/38 \pm 5/1$	
۲۵	(d) $79/90 \pm 2/7$	(d) $61/54 \pm 4/2$	
۱۲/۵	(d) $83/50 \pm 3$	(d) $65/58 \pm 7/5$	
۶/۲۵	(e) $90/23 \pm 3/2$	(d) $69/68 \pm 3/10$	
۳/۱۲۵	(e) $92/03 \pm 5/4$	(e) $72/08 \pm 8/11$	
۱/۵۶	(e) $93/77 \pm 9/8$	(e) $74/31 \pm 7/12$	

۸۱/۹۱±۴/۷۸(f)	۹۶/۸۳±۱۰ (e)	۰/۷۸
۸۹/۱۴±۹/۱۱(f)	۱۰۰±۱ (e)	۰/۳۹
۹۶/۸۷±۶/۱۱(g)	۱۰۰±۱۱/۰۸(e)	۰/۱۹
۱۰۰±۲/۴(g)	۱۰۰±۱۳/۲(e)	۰

بحث

سنتز سبز نانو ذرات یک روش سازگار با محیط زیست برای تولید نانو ذرات با خواص بیولوژیک، فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد است. امروزه روش‌های سنتز بیولوژیک دارای معایب سنتز فیزیکی و شیمیایی شامل بازده سمی، زمان و مصرف انرژی و هزینه بالا است. در میان میکروارگانیسم‌های مختلف، سیانوباکتری‌ها به دلیل توانایی در انباشت فلزات سنگین از محیط زیست و همچنین تولید انواع ترکیبات زیست فعال مانند رنگدانه‌ها و آنزیم‌ها، کاندیدای مناسبی به عنوان عوامل احیا کننده و تثبیت کننده هستند. در واقع سنتز سبز نانو ذرات توسط سیانوباکتری‌ها به عنوان یک پروتکل ایمن، ساده، پایدار، مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست برای کاربردهای زیست پزشکی توجه گسترده‌ای را به خود جلب کرده است. استفاده از روش‌های شیمیایی برای تولید نانو ذرات به دلیل مضرات بالا توجه دانشمندان را به روش‌های مقرون به صرفه‌تر، زیست سازگار و ایمن برای سنتز نانو مواد معطوف کرده است. روش‌های سنتز سبز امکان ساخت نانو ذرات با اشکال مختلف و گوناگون را می‌دهد. در این روش برای تولید نانو ذرات از باکتری‌ها، قارچ‌ها و آنزیم‌ها استفاده می‌شود. از سیانوباکتری‌ها به دلیل سرعت رشد برای سنتز ذرات در مقیاس نانو استفاده می‌شود. در این میان متابولیت‌های ثانویه سنتز شده توسط سیانوباکتری‌ها با قابلیت احیای فلزات و اکسید فلزات به صورت داخل و خارج سلولی بسیار قابل توجه هستند و دارای پتانسیل ضد باکتری، ضد قارچ، ضد جلبک، ضد سرطان و فعالیت‌های فتوکاتالیستی هستند. (۲۴)

در یک تحقیق از LSPR (طیف‌سنجی رزونانس پلاسما سطحی موضعی) برای تشخیص مولکول‌های شیمیایی استفاده شد که در آن پلاسما سطحی فلزات اندازه‌گیری می‌شود. در مطالعه حاضر، با استناد بر میزان جذب‌های

به دست آمده، تولید نانو ذرات اکسید روی توسط سوپرناتانت تأیید شد در تحقیق حاضر میزان جذب در نمونه با غلظت ۳ میلی مولار به طور معنی داری بالاتر از نمونه‌های دیگر بود. طبق نظریه‌هایی که وجود دارد تنها یک باند SPR در طیف جذب نانو ذرات کروی انتظار می‌رود در حالی که ذرات ناهمسان گرد می‌توانند دو یا چند باند SPR ایجاد کنند و این باند همچنین به دیگر مولکول‌های روی سطح نیز بستگی دارد و هر چقدر ذرات بزرگ‌تری تشکیل شود طول موج‌های بلندتری نیز تشکیل می‌شود (۲۵).

مقایسه طیف جذبی نانو ذرات اکسید روی تهیه شده به روش فیکوسیترین در زمان‌های مختلف نشان داد که برای تمامی نمونه‌ها، مشخصه باند جذب تشدید پلاسما سطحی در طول موج حدوداً ۳۸۰ نانومتر برای نانو ذرات اکسید روی رخ داده است که نشان می‌دهد عصاره سیانوباکتریایی *Aliinostoc sp.* مسئول سنتز نانو ذرات اکسید روی هست. در تحقیق حاضر میزان جذب با افزایش زمان به طور معنی داری افزایش یافت به طوری که میزان جذب در ۷۲ ساعت به طور معنی داری بالاتر از زمان‌های دیگر بود.

در مطالعه حاضر، با استناد بر میزان جذب‌های به دست آمده تولید نانو ذرات اکسید روی توسط پلی ساکارید خارج سلولی تأیید شد. تحقیق حاضر میزان جذب با افزایش زمان به طور معنی داری افزایش یافت. به طوری که میزان جذب در ۷۲ ساعت به طور معنی داری بالاتر از زمان‌های دیگر بود. تفاوت در پتانسیل سنتز نانو ذرات سیانوباکتری‌ها ممکن است به دلیل تفاوت‌های کمی و کیفی در مواد پروتئینی در عصاره‌های سلولی باشد. از نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌توان گفت نانو ذرات به دست آمده کروی بودند و با افزایش زمان و غلظت عصاره اندازه بزرگ‌تری داشتند که مطابق با نتایج به دست آمده از مورفولوژی نانو ذرات حاصل از SEM بود.

آنالیز DLS روشی فیزیکی برای تعیین توزیع ذرات است. در این روش پس از برهمکنش نور لیزر با ذره، پراکندگی و تغییرات شدت نور برحسب حرکات براونی ذرات، ارزیابی شده و بر اساس آن توزیع ابعاد ذرات محاسبه می‌گردد. PDI نشان‌دهنده همگنی اندازه ذرات است هرچه مقدار پراکندگی بالاتر باشد، نشان‌دهنده یکنواختی کمتر اندازه ذرات است که علاوه براین، یک نمونه با توزیع اندازه بسیار گسترده دارای مقدار PDI بالاتر از ۰/۷ برای تجزیه و تحلیل DLS مناسب نیست. در مطالعه ما میزان PDI تمامی نمونه‌ها مقدار پایینی داشت که نشان‌دهنده پایداری کلی و همگنی خوب است.

نتایج نشان داد که نمونه‌های سوپرناتانت و Ex پلی ساکارید خارج سلولی، به ترتیب دارای کوچک‌ترین و بزرگ‌ترین میانگین اندازه ذرات بودند. همچنین نمونه‌های سوپرناتانت و فیکوسیاینین به ترتیب دارای بزرگ‌ترین و کوچک‌ترین PI بودند. نتایج نشان داد که نمونه‌های سوپرناتانت و پلی ساکارید خارج سلولی، به ترتیب دارای بزرگ‌ترین و کوچک‌ترین پتانسیل زتا بودند.

نتایج طیف‌سنجی FTIR به‌دست‌آمده به سه روش سوپرناتانت، فیکوسیاینین و با استفاده از پلی ساکاریدهای خارج سلولی به دست آمد. داده‌های FTIR بر اساس Kanipandian و همکاران (۲۰۱۴) آنالیز شدند. تفاوت اندکی در شدت پیک وجود دارد که به دلیل تفاوت در تعداد گروه‌های عاملی و اتم‌های تشکیل‌دهنده هر طیف است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که پیک در محدوده ۳۲۰۰ تا ۳۷۰۰ مربوط به ارتعاش کششی پیوند OH است که در نمونه‌های سوپرناتانت، فیکوسیاینین و پلی ساکارید خارج سلولی به ترتیب در اعداد موجی ۳۶۰۸/۹۹، ۳۴۰۷/۹۸ و ۳۴۰۱/۶۵ سانتی‌متر معکوس خود را نشان داده است که ناشی از حضور رطوبت در سامانه از پیش یا به هنگام گرفتن طیف است (۲۶). پیک دوم در عدد موجی ۴۶۵/۳۷ سانتی‌متر معکوس در نمونه سوپرناتانت، عدد موجی ۵۷۸/۱۱ و ۴۰۷/۸۹ سانتی‌متر معکوس در نمونه فیکوسیاینین و پیک دوم در عدد موجی ۵۲۹/۰۷ و ۵۷۸/۴۵ سانتی‌متر معکوس در نمونه پلی ساکارید

خارج سلولی، ناشی از ارتعاش کششی لانیس اکسید روی است. در نمونه سوپرناتانت، پیک‌های دیگر در عدد موجی ۲۱۴۹/۵۶، ۱۷۰۲/۷۳ سانتی‌متر معکوس، در نمونه فیکوسیاینین، پیک‌های دیگر در عدد موجی ۱۶۵۶/۹۲، ۱۵۴۹/۹۸، ۱۲۴۷/۷۸ و ۱۰۵۵/۹۶ سانتی‌متر معکوس، در نمونه‌های پلی ساکارید خارج سلولی، پیک‌های دیگر در عدد موجی ۱۰۶۰/۵۵، ۱۴۱۴/۳۹، ۱۶۵۲/۶۷ و ۱۵۸۲/۸۹ سانتی‌متر معکوس همگی مربوط به مواد سازنده اکسید روی هستند (به ترتیب مربوط به ارتعاش کششی حلقه آروماتیک، ارتعاش کششی گروه C-O، ارتعاش خمشی پیوند CH₂ و CH₃ هستند) و می‌توان به پروتئین نسبت داده شوند. چندین گزارش رویکرد سنتز نانو ذرات را از زیست‌توده سلولی فیلتر شده را توصیف نموده‌اند که در این روش، زیست‌توده‌های فعال نظیر پروتئین‌ها و آنزیم‌های موجود در فیلتراسیون سلول‌ها، نقش مهمی در ساخت بیولوژیک و تثبیت نانو ذرات دارند.

در مطالعه Minhas و همکاران (۲۰۲۳) بیوسنتز نانو ذرات اکسید روی با واسطه سیانوباکتری‌ها با استفاده از *Nostoc sp.* انجام شد. نتایج طیف‌سنجی FTIR نشان داد که عصاره *Nostoc sp.* حاوی ترکیبات آلی است که به‌عنوان عوامل تثبیت‌کننده، پوشاننده و کاهش‌دهنده برای نانو ذرات اکسید روی عمل می‌کنند (۲۷). بر اساس مطالعه Azizi و همکاران (۲۰۱۴) برهمکنش بین مولکول‌های روی در پیش سازهای نمکی و گروه‌های عاملی حاوی اکسیژن در عصاره سلولی *Sargassum muticum* منجر به بیوسنتز نانو ذرات اکسید روی می‌شود (28).

تجزیه و تحلیل داده‌های FT-IR در مطالعه El-Belely و همکاران (۲۰۲۱) نقش مواد آلی موجود در عصاره *A. platensis* را در کاهش، پوشاندن و تثبیت نانو ذرات اکسید روی بیوسنتز شده نشان داد (۲۹). طبق نتایج بررسی نانو ذرات اکسید روی ریز پوشانی شده با کیتوزان توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری، بیانگر نانو ذرات اکسید روی پوشش دهی شده به صورت کره‌های به هم چسبیده با ابعاد حدودی ۶۰۰-۷۰۰ نانومتر بود. AbdElhady و همکاران (۲۰۱۲) طی تهیه و

شناسایی نانو ذرات کیتوزان/اکسید جهت ایجاد اثرات ضد میکروبی، بیان نمودند که در غلظت ۰/۵ درصد، نانوذره‌های ZnO با اندازه‌های متوسط ۱۰ تا ۲۰ نانومتر تشکیل شدند. درحالی که با افزایش غلظت ZnO تا ۰/۷۵ درصد، میانگین طول نانو میله‌های ZnO به ۶۰ نانومتر افزایش یافت و میانگین عرض ۵ تا ۱۵ نانومتر حفظ شد که علت این امر به غلظت کمتر ZnO (۰/۵٪) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد) نسبت داده شد که منجر به رشد ناقص نانو ذرات کمپلکس کیتوزان/ZnO شده است. از سوی دیگر غلظت اکسید روی تا ۰/۷۵ درصد رشد کامل نانو میله‌ها را به همراه داشت. همچنین افزایش دما از ۶۰ درجه سانتی‌گراد به ۸۰ درجه سانتی‌گراد با تجزیه نانو میله‌ها به نانوذره‌ها با تجمع بیشتر نانو ذرات اندازه کوچک‌تر با ۵ تا ۱۰ نانومتر همراه بود (۳۰).

نتایج بیانگر این مطلب است که هر دو مورد با افزایش غلظت نانو ذرات روی، میزان زنده‌مانی سلول‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. از طرفی می‌توان بیان نمود که در تمامی غلظت‌های مورد بررسی، سیتوتوکسیسیته نمونه‌های ریز پوشانی شده بیشتر از نمونه‌های ریز پوشانی نشده بود. Liu و همکاران (۲۰۱۷) سمیت سلولی دو نوع نانو ذرات ZnO با اندازه‌های مختلف را بررسی کردند و نشان دادند که گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نقش اساسی را در سمیت سلولی ناشی از نانو ذرات اکسید روی ایفا می‌کنند. آن‌ها نشان دادند که نانو ذرات ZnO باعث القا پاسخ‌های توکسیک در رده سلولی SHSY5Y نوروبلاستومای انسانی در یک روش وابسته به اندازه می‌شود که ممکن است به توانایی یون ریزش آن‌ها مرتبط باشد (۳۱).

Malaikozhundan و همکاران (۲۰۱۷) اثرات سیتوتوکسیک نانو ذرات Pp-ZnO بر روی سلول‌های سرطان سینه MCF-7 بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که درمان

با Pp-ZnO در غلظت‌های بیشتر از ۵۰ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر زنده ماندن سلول را کاهش می‌دهد. اثر سمی نانو ذرات CEN-ZnO بیوستتر شده روی سلول‌های سرطانی ریه A549 از ۲۵ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر شروع می‌شود که اثر سمی بیشتری نسبت به ZnONP های بیوستتر شده توسط عصاره دانه *P. pinnata* دارد. نانو ذرات CEN-ZnO بیوستتر شده در ۵۰ میلی‌گرم، ۷۷ درصد از سلول‌های سرطانی (A549) (۲۳) درصد از سلول‌ها زنده بودند) را از بین برد اما ۵۹ درصد از سلول‌ها پس از درمان سلول‌های سالم ریه (MRC-5) با غلظت مشابه زنده ماندند این بدان معنی است که نانو ذرات CEN-ZnO در یک غلظت مشابه، سلول‌های سرطانی را دو برابر بیشتر از سلول‌های سالم از بین می‌برد (۳۲).

نتیجه‌گیری

این مطالعه باهدف سنتز نانو ذرات اکسید روی با استفاده از سویه *Aliinostoc sp.* به سه روش مختلف (استفاده از غلظت‌های مختلف نیترا روی هگزاهیدرات ۱، ۲ و ۳ میلی مولار) با کمک سوپرناتانت، فیکوسیائین و پلی ساکارید خارج سلولی انجام شد. از پوشش کیتوزان برای پایدار کردن نانو ذرات سنتز شده استفاده شد. نتایج طیف‌سنجی سنتز نانو ذرات توسط هر سه روش را تأیید کرد. بررسی‌های انجام‌شده نشان داد که سنتز نانو ذرات به‌صورت کرووی بود. در نتایج طیف‌سنجی FTIR تفاوت اندکی در شدت پیک وجود داشت که به دلیل تفاوت در تعداد گروه‌های عاملی و اتم‌های تشکیل‌دهنده هر طیف است. بررسی اثر سیتوتوکسیسیته نشان داد که پوشش دهی با کیتوزان اثر کشندگی را بیشتر کرد و زنده‌مانی سلول‌های سرطانی به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. پتانسیل زتا نانو ذرات سنتز شده در هر سه روش مثبت بود که نشان‌دهنده بار مثبت ذرات پراکنده در سوسپانسیون هست.

منابع

1. Bin-Meferij MM, Hamida RS. Biofabrication and antitumor activity of silver nanoparticles utilizing novel nostoc sp. Bahar M. International Journal of Nanomedicine. 2019;9019-29.
2. Patel V, Berthold D, Puranik P, Gantar M. Screening of cyanobacteria and microalgae for their ability to synthesize silver nanoparticles with antibacterial activity. Biotechnology Reports. 2015;5:112-9.
3. Cruz J, Ortiz C, Guzman F, Fernández-Lafuente R, Torres R. Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms. Current medicinal chemistry. 2014;21(20):2299-321.
4. Chaudhary R, Nawaz K, Khan AK, Hano C, Abbasi BH, Anjum S. An overview of the algae-mediated biosynthesis of nanoparticles and their biomedical applications. Biomolecules. 2020;10(11):1498:(
5. Nowruzi B, Porzani SJ. Toxic compounds produced by cyanobacteria belonging to several species of the order Nostocales: A review. Journal of Applied Toxicology. 2021;41(4):510-48.
6. Mocchegiani E, Romeo J, Malavolta M, Costarelli L, Giacconi R, Diaz L-E, et al. Zinc: dietary intake and impact of supplementation on immune function in elderly. Age. 2013;35:839-60.
7. Barui AK, Kotcherlakota R, Patra CR. Biomedical applications of zinc oxide nanoparticles. Inorganic frameworks as smart nanomedicines: Elsevier; 2018. p. 239-78.
8. Sharma DK, Shukla S, Sharma KK, Kumar V. A review on ZnO: Fundamental properties and applications. Materials Today: Proceedings. 2022;49:3028-35.
9. Chan P, Kurisawa M, Chung JE, Yang Y-Y. Synthesis and characterization of chitosan-g-poly (ethylene glycol)-folate as a non-viral carrier for tumor-targeted gene delivery. Biomaterials. 2007;28(3):540-9.
10. Arzumanyan VA, Kiseleva OI, Poverennaya EV. The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise. International journal of molecular sciences. 2021;22(23):13135.
11. Andersen RA. Algal culturing techniques: Elsevier; 2005.
12. فیروزآباد ذ، نوروزی، فلسفی، سروناز. مقایسه کاربرد صنعتی اگزوپلی ساکاریدهای دو سویه سیانوباکتری ایزی و خاکزی Nostoc punensis و Neowestiellopsis Persica A138 در تصفیه زیستی فلزات سنگین. زیست شناسی میکروارگانیسم ها. 2023.
13. Nowruzi B, Lorenzi AS. Production of the neurotoxin homoanatoxin-a and detection of a biosynthetic gene cluster sequence (anaC) from an Iranian isolate of Anabaena. South African Journal of Botany. 2021;139:300-5.
14. Ebadi M, Zolfaghari MR, Aghaei SS, Zargar M, Shafiei M, Zahiri HS, et al. A bio-inspired strategy for the synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) using the cell extract of cyanobacterium Nostoc sp .EA03: from biological function to toxicity evaluation. RSC advances. 2019;9(41):23508-25.
15. Mishra SK, Shrivastav A, Pancha I, Jain D, Mishra S. Effect of preservatives for food grade C-Phycocerythrin, isolated from marine cyanobacteria Pseudanabaena sp .International journal of biological macromolecules. 2010;47(5):597-602.
16. Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. Plasmonics. 2007;2:107-18.
17. Frank L, Onzi G, Morawski A, Pohlmann A, Guterres S, Contri R. Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications. Reactive and Functional Polymers. 2020;147:104459.
18. Al-Dhafri K, Ching CL. Phyto-synthesis of silver nanoparticles and its bioactivity response towards nosocomial bacterial pathogens. Biocatalysis and agricultural biotechnology. 2019;18:101075.
19. Richert L, Golubic S, Guédès RL, Ratiskol J, Payri C, Guezennec J. Characterization of exopolysaccharides produced by cyanobacteria isolated from Polynesian microbial mats. Current Microbiology. 2005;51:379-84.
20. Hoo CM, Starostin N, West P, Mecartney ML. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. Journal of Nanoparticle Research. 2008;10:89-96.
21. Gebauer JS, Malissek M, Simon S, Knauer SK, Maskos M, Stauber RH, et al. Impact of the nanoparticle-protein corona on colloidal stability and protein structure. Langmuir. 2012;28(25):9673-9.
22. Ahmadi M, Habibi A, Pourafshary P, Ayatollahi S, editors. Zeta potential investigation and mathematical modeling of nanoparticles deposited on the rock surface to reduce fine migration. SPE Middle East Oil and Gas Show and Conference; 2011: SPE.
23. Kheirollahi A, Pordeli M, Safavi M, Mashkouri S, Naimi-Jamal MR, Ardestani SK. Cytotoxic and apoptotic effects of synthetic benzochromene derivatives on human cancer cell lines. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. 2014;387:1199-208.
24. Hamida RS, Ali MA, Redhwan A, Bin-Meferij MM. Cyanobacteria—a promising platform in green nanotechnology: a review on nanoparticles fabrication and their prospective applications.

International Journal of Nanomedicine. 2020;6033-66.

.25 Cepoi L, Rudi L, Chiriac T, Valuta A, Zinicovscaia I, Duca G, et al. Biochemical changes in cyanobacteria during the synthesis of silver nanoparticles. Canadian journal of microbiology. 2015;61(1):13-21.

.26 Kanipandian N, Kannan S, Ramesh R, Subramanian P, Thirumurugan R. Characterization, antioxidant and cytotoxicity evaluation of green synthesized silver nanoparticles using *Cleistanthus collinus* extract as surface modifier. Materials Research Bulletin. 2014;49:494-502.

.27 Minhas LA, Mumtaz AS, Kaleem M, Farraj DA, Kamal K, Minhas MAH, et al. Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Nostoc* sp. and Their Multiple Biomedical Properties. Catalysts. 2023;13(3):549.

.28 Azizi S, Ahmad MB, Namvar F, Mohamad R. Green biosynthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using brown marine macroalga *Sargassum muticum* aqueous extract. Materials Letters. 2014;116:275-7.

.29 El-Belely EF, Farag MM, Said HA, Amin AS, Azab E, Gobouri AA, et al. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) using *Arthrospira platensis* (Class: Cyanophyceae) and evaluation of their biomedical activities. Nanomaterials. 2021;11(1):95.

.30 Abdelhady M. Preparation and characterization of chitosan/zinc oxide nanoparticles for imparting antimicrobial and UV protection to cotton fabric. International journal of carbohydrate chemistry. 2012;2012.

.31 Liu J, Kang Y, Yin S, Song B, Wei L, Chen L, et al. Zinc oxide nanoparticles induce toxic responses in human neuroblastoma SHSY5Y cells in a size-dependent manner. International journal of nanomedicine. 2017;8085-99.

.32 Malaikozhundan B, Vaseeharan B, Vijayakumar S, Pandiselvi K, Kalanjiam MAR, Murugan K, et al. Biological therapeutics of *Pongamia pinnata* coated zinc oxide nanoparticles against clinically important pathogenic bacteria, fungi and MCF-7 breast cancer cells. Microbial pathogenesis. 2017;104:268-77.

Evaluation of cytotoxic effect of zinc oxide nanoparticles coated with chitosan by the cyanobacterium *Aliinostoc* sp. against cancer cells (Hep G-2)

Bahareh Nowruzi^{1*}, Mohammad Jabari¹

¹Department of Biotechnology, Faculty of Converging Sciences and Technologies, Islamic Azad Science and Research Branch, Tehran, Iran University,

Abstract

Today, green synthesis methods for the synthesis of nanoparticles are being considered to replace chemical methods. This study was conducted with the aim of biosynthesis of zinc oxide nanoparticles from cyanobacterial extract and its cytotoxic activity against human hepatocellular cancer cells. First, zinc oxide nanoparticles were prepared by three different methods (supernatant, phycocyanin and with the help of extracellular polysaccharides) from the extract of cyanobacterium *Aliinostoc* sp. and coated with chitosan to stabilize the synthesized nanoparticles. Then the cytotoxic effect of these particles on HepG-2 cancer cells was investigated. The statistical analysis of the obtained data was done with SPSS software (version 24) and Excel, one-way analysis of variance and Tukey's test. The results showed that with increasing concentration of zinc nanoparticles, cell viability decreased significantly. So in the microcoated samples, the lowest survival in 200 µg/mL and then in 100 µg/mL zinc nanoparticles with values of 37.40% and 44.03%, respectively, and also in non-encapsulated samples, the lowest survival was observed at 200 µg/mL and then at 100 µg/mL zinc nanoparticles with values of 46.8 and 56.83%, respectively. The coating of synthesized nanoparticles with chitosan increased the killing effect and the life of cancer cells decreased significantly.

Keywords: Cyanobacteria, zinc oxide nanoparticles, cytotoxicity, cancer cells

* bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir