

Investigating the Anticancer Properties of the Essential Oil and Aqueous Extract of *Moringa oleifera* and its Biosynthesized Metal Nanoparticles on MCF-7 and BT-549 Cell Lines

Mehran Noruzpour^{1*}, Rasool Asghari Zakaria², Nasser Zare², Hossein Ali Ebrahimi³, Hamed Parsa⁴, Shima Bourang¹

¹Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

²Department of Plant Production and Genetics, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

³Department of Pharmaceutics, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

⁴Department of Pharmacognosy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

Received: 2023/11/12
Accepted: 2024/01/06

*Corresponding Author:
m.noruzpour@gmail.com

Ethics Approval:
IR.UMA.REC.1402.054

Abstract

Introduction: In recent years, with the advancement of nanotechnology, new methods have been invented to treat cancer. The Moringa plant (*Moringa oleifera*) is rich in flavonoid compounds, especially quercetin, which has anticancer and antioxidant properties. In this research, the characteristics of metal nanoparticles of Iron, Copper, Zinc, and Silver biosynthesized from the aqueous extract of the *M. oleifera* plant were studied, and then the effect of the essential oil and aqueous extract obtained from the aerial parts of this plant and the synthesized metal nanoparticles on the growth and survival of cancer cell lines MCF-7 and BT-549 were investigated.

Methods: In this research, after the biosynthesis of metal nanoparticles such as iron, copper, zinc, and silver from the aqueous extract of the plant *M. oleifera* and checking their properties in terms of size with the help of Dynamic Light Scattering (DLS) and verifying the structure with the help of Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR), the number of secondary compounds of the essential oil (using Gas chromatography-Mass spectrophotometry (GC-Mass)) and the aqueous extract of Moringa plant (with the help of HPLC) were investigated. , the anticancer properties of the essential oil and aqueous extract of the plant *M. oleifera* and its biosynthesized metal nanoparticles were evaluated on two cell lines, MCF-7 and BT-549. The experiment was conducted in a completely randomized design with three replications. GraphPad Prism8 and FlowJ softwares were used to check cell viability and flow cytometry results, respectively.

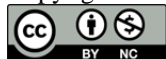
Results: According to the results obtained from DLS, the sizes of iron, copper, zinc, and silver nanoparticles were 35, 32, 33, and 34 nm, respectively. According to the results obtained in this research, the IC50 value of MCF-7 and BT-549 cell lines was significantly affected by the type of treatment used at the probability level of 1%. The highest amount of IC50 (35.9 µL/mL) corresponds to the MCF-7 cell line treated with the essential oil obtained from the aerial parts of the Moringa plant. Furthermore, in this research, it was found that the percentage of necrotic cells, and the percentage of cells in the pre-apoptotic and post-apoptotic stage of the MCF-7 and BT-549 cell lines were significantly affected by the type of treatment used at the probability level of 1%. In the case of the MCF-7 cell line, the highest percentage of necrotic cells, cells located in the pre-and post-apoptotic stage (2.03, 3.42, and 22.5 percent), respectively, related to the control treatment, aqueous extract obtained from aerial parts, and synthesized copper nanoparticles from aqueous extract were obtained. Meanwhile, the highest percentage of necrotic cells, cells located in the pre-and post-apoptotic stage of the BT-549 cell line (6.33, 4.32, and 17.56 percent) were related to the control treatment, biosynthesized copper nanoparticles from the aqueous extract.

Conclusion: According to the results obtained in this research, the copper nanoparticle biosynthesized from the Moringa plant aqueous extract had the highest anticancer effect on MCF-7 and BT-549 cell lines.

Keywords

BT-549, Metal nanoparticles, Moringa oleifera and MCF-7

Copyright © 2024 Noruzpour et al. Published by Breast Cancer Research Center, ACECR



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Introduction

Cancer is a deadly disease with a high mortality rate, which leads to many psychological and economic conflicts. Breast cancer is one of the most common types of cancer (1). Depending on the type of cancer and its progress, various methods have been developed to treat this disease, including surgery, chemotherapy, radiation therapy, hormone therapy, stem cell transplantation, targeted drug delivery systems, and nanotechnology. Nanoparticles, due to their small size (10-100 nm) with their high density and surface charge, have a high contact surface that facilitates binding to organic compounds such as DNA, RNA, peptides, aptamers, and antibodies (2). Gold, silver, platinum, copper, palladium, zinc, nickel, and iron nanoparticles can be mentioned among the widely used metal nanoparticles that have been used at the research level to treat cancer. There are different methods for the synthesis of various types of metal nanoparticles, which can be referred to as physical, chemical, and biological methods (synthesis by microorganisms and plants) (3). Synthesis of nanoparticles via plant extracts offers a simple one-step reduction process with large-scale production. Numerous reports have been presented on the synthesis of nanoparticles using plant extracts with significant biological activities. The *M. oleifera* is rich in flavonoid compounds, especially quercetin, which has anticancer and antioxidant properties. Due to its antioxidant properties, quercetin in the leaf and seed samples of *M. oleifera* causes the chelation of metals and the inhibition of free radicals. Flavonoids are the main source of some isoflavonoids, such as genistein, rutin, and quercetin, which prevent the growth of cancer cells (4). In this research, the characteristics of metal

nanoparticles of iron, copper, zinc, and silver biosynthesized from the aqueous extract of *M. oleifera* plant were studied, and then the effect of essential oil, aqueous extract, and synthesized metal nanoparticles, iron, copper, zinc, and silver on the growth and survival of cancer cell lines MCF-7 and BT-549 were investigated.

Materials & Methods

In this research, after the biosynthesis of metal nanoparticles such as iron, copper, zinc, and silver from the aqueous extract of the plant *M. oleifera* and checking their properties in terms of size with the help of Dynamic Light Scattering (DLS) and verifying the structure with the help of Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR), the number of secondary compounds of the essential oil (using GC-Mass) and the aqueous extract of Moringa plant (with the help of HPLC) were investigated. In addition, the anticancer properties of the essential oil and aqueous extract of the plant *M. oleifera* and its biosynthesized metal nanoparticles were evaluated on two cell lines, MCF-7 and BT-549. The experiment was conducted in a completely randomized design with three replications. GraphPad Prism8 and FlowJ softwares were used to check cell viability and flow cytometry results, respectively.

Results

The results of DLS shown in Figure 1 confirmed the dimensions of the synthesized nanoparticles. The nanoparticles of iron, copper, silver, and zinc biosynthesized from the aqueous extract of the plant (*M. oleifera*) have an average size of 35, 32, 33, and 34 nm, respectively (Figure 1).

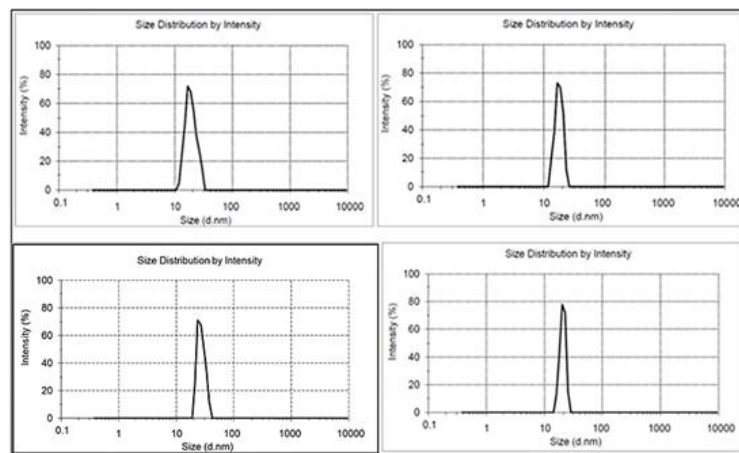


Figure 1: Size distribution of nanoparticles biosynthesized from the aqueous extract of the plant (*M. oleifera*): A) iron, B) copper, C) silver, and D) zinc nanoparticles

The presence of double peaks in FTIR images (Figure 2), iron, copper, silver, and zinc nanoparticles in the 4000-3500 range represent the stretching vibrations of the H-O group. As well as the presence of double peaks and elongated peaks in the region of 2800-3500 indicates the presence of metal nanoparticles. Furthermore, in the areas of

500-1500, the tensile peaks were related to C=O, N-H, and O-C bonds. Since the organic compounds of plant extracts are placed around the nanoparticles and cause the stability of the nanoparticles, the movements of these organic groups can be seen in the FTIR spectrum (Figure 2).

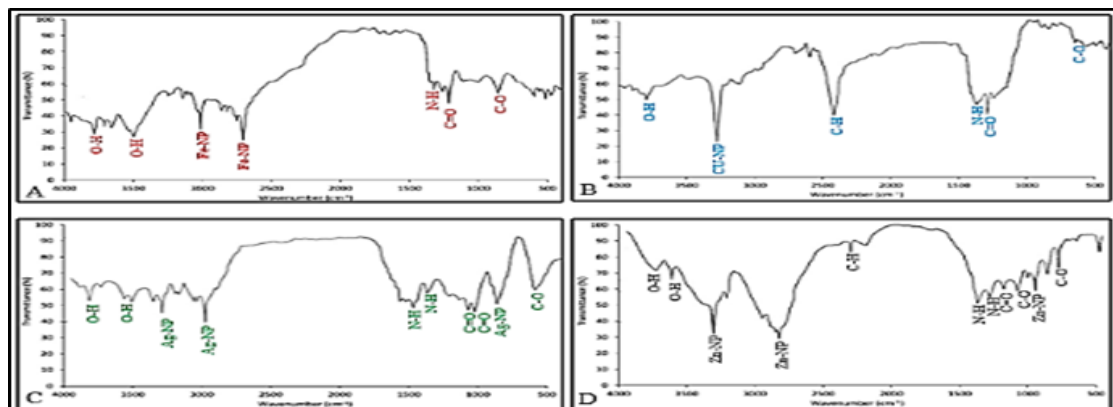


Figure 2: Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR) spectrum of nanoparticles biosynthesized from aqueous extract of plant (*M. oleifera*): A) iron, B) copper, C) silver, and D) zinc nanoparticles

Based on the results from the comparison of the means (Figure 3), a statistically significant difference was observed in the IC50 value between MCF-7 and BT-549 cell lines treated with essential oil and the aqueous extract of *M. oleifera* plant and biosynthesized metal nanoparticles. Furthermore, this significant difference was observed within each cell line and between different treatments. So that in all

cases, the IC50 of MCF-7 cell lines was significantly higher than BT-549 cell line, which indicates that to eliminate at least 50% of the total population of MCF-7 cell line compared to cell line BT-549 requires higher concentrations of essential oil and water extract of Moringa plant and nanoparticles of iron, copper, zinc, and silver.

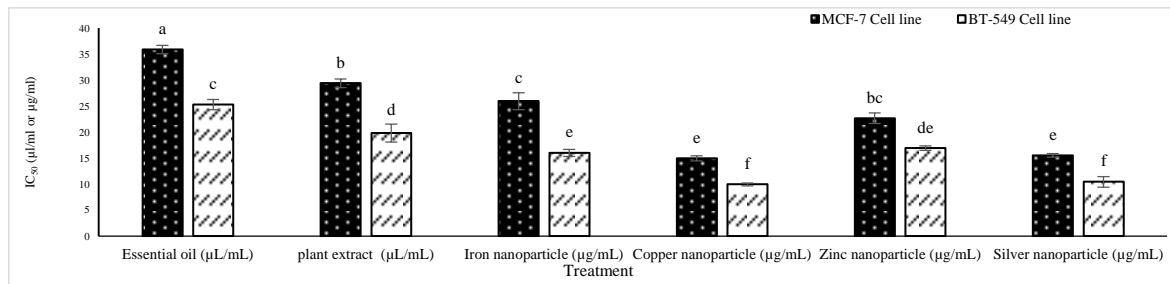


Figure 3: Survival percentage of MCF-7 and BT-549 cell lines under the influence of essential oil and aqueous extract of Moringa plant (*M. oleifera*) and biosynthesized iron, copper, zinc, and silver nanoparticles

According to the obtained results, the percentage of necrotic cells and the percentage of cells in the pre-apoptotic and post-apoptotic stages of the MCF-7 cell line were significantly affected by the concentrations obtained from the IC₅₀ assay of Moringa essential oil and aqueous extract (*M. oleifera*) and iron, copper, zinc, and silver nanoparticles biosynthesized from it were placed (Figure 4a). The presence of a high percentage of necrotic cells in the control treatment can be due to the high-density resultant from high growth and the death of more cancer cells due to the reduction of energy sources. In addition, the highest percentage of MCF-7 cells in the pre-apoptotic stage (3.42%) was related to the treatment of said cells

with the resulting aqueous extract. The highest percentage of post-apoptotic cells (22.5%) was observed in the treatment of cells with biosynthesized copper nanoparticles, which was significantly higher than other treatments. Furthermore, in terms of necrotic cells, the percentage of cells in the pre-apoptotic and post-apoptotic stage of the BT-549 cell line between the treatments (moringa essential oil and aqueous extract and its biosynthesized metal nanoparticles in the concentrations calculated in the IC₅₀ assay) statistically significant difference was observed (Figure 4b). The highest percentage of necrotic cells (6.33%) was related to the control treatment. As well as,

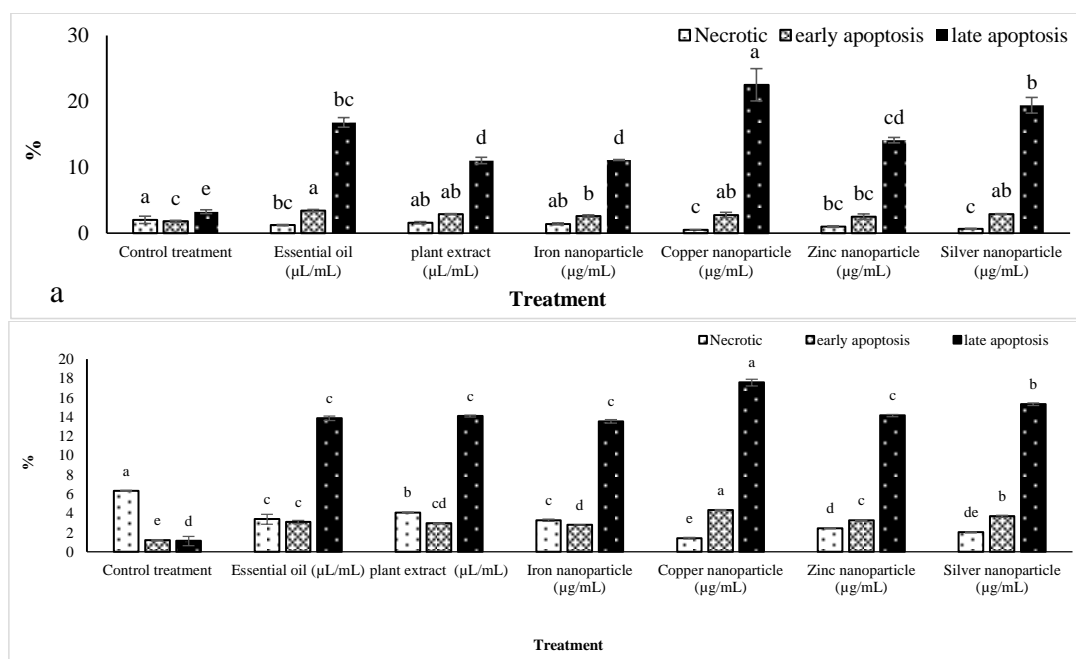


Figure 4: Effect of the essential oil and aqueous extract of Moringa plant (*M. oleifera*) and its biosynthesized metal nanoparticles on the percentage of necrotic cells, the percentage of cells in pre-apoptotic and post-apoptotic stage a) MCF-7 cell line and b) cell line BT-549

the highest percentage of BT-549 cell lines located in the pre- and post-apoptotic stage (4.32% and 17.56%, respectively) was related to the treatment of the mentioned cell lines with biosynthesized copper nanoparticles.

Discussion

The leaves and shoots of *M. oleifera* have important medicinal chemical compounds such as carbohydrates, saponins, tannins, steroids, flavonoids, coumarins, quinones, phenolic compounds, alkaloids quercetin, rutin, kaempferol, gallic acid, and so on, which are used for cancer prevention and treatment, antimicrobial and antifungal activity. Targeted drug delivery increases the anticancer potential and reduces the side effects of the mentioned compounds. Bharali et al. reported that the extracts obtained from *M. oleifera* leaves have a high potential in dealing with chemical carcinogens through liver pathways (5). Due to the large size of nanoparticles compared to drugs, its absorption into cells is much lower, while its transfer to cancer cells increases due to surface ligands (6). In this research, it was found that the IC₅₀ of MCF-7 and BT-549 cell lines treated with biosynthesized iron and zinc nanoparticles and the resulting aqueous extract are almost equal, while the IC₅₀ of the mentioned cell lines treated with nanoparticles copper and silver were much less than the aqueous extract obtained from the sample grown in nature.

Conclusion

Novel approaches to treating cancer have been developed in recent years due to the progress of nanotechnology in medical science and therapy. These metal nanoparticles, which have been shown in numerous studies to have antioxidant and anticancer properties, include gold, silver, platinum, copper, palladium, zinc, nickel, and iron. These nanoparticles are biosynthesized from medicinal plants. Based on the obtained results, MCF-7 and BT-549 cell lines were most positively

affected by copper nanoparticles biosynthesized from Moringa plant aqueous extract.

References

- 1- Mahdavi N, Pakzad R, Ghoncheh M, Pakzad I, Moudi A, Salehiniya H. Spatial analysis of breast cancer incidence in Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2016;17: 59-64.
2. Tao H, Wu T, Aldeghi M, Wu TC, Aspuru-Guzik A, Kumacheva E. Nanoparticle synthesis assisted by machine learning. *Nature reviews materials*. 2021;6(8):701-16.
3. Jamkhande PG, Ghule NW, Bamer AH, Kalaskar MG. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal of drug delivery science and technology*. 2019;53:101174.
4. Wang L, Lankhorst L, Bernards R. Exploiting senescence for the treatment of cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2022;22(6):340-55.
5. Bharali R, Tabassum J, Azad MRH. Chemomodulatory effect of *Moringa oleifera*, Lam, on hepatic carcinogen metabolising enzymes, antioxidant parameters and skin papillomagenesis in mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2003;4(2):131-40.
6. Dave V, Sharma R, Gupta C, Sur S. Folic acid modified gold nanoparticle for targeted delivery of Sorafenib tosylate towards the treatment of diabetic retinopathy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020;194:111151.

بررسی اثرات ضدسرطانی اسانس و عصاره آبی گیاه مورینگا (*Moringa oleifera*) و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن بر لاین‌های سلولی MCF-7 و BT-549

مهران نوروزپور^{۱*}، رسول اصغری زکریا^۱، ناصر زارع^۱، حسینعلی ابراهیمی^۲، حامد پارسا^۲، شیما بورنگ^۱

^۱ گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، اردبیل، ایران

^۲ گروه فارماسیوتیکس، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده داروسازی، اردبیل، ایران

^۳ گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده داروسازی، اردبیل، ایران

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر با پیشرفت نانو تکنولوژی روش‌های نوینی جهت درمان بیماری سرطان ابداع شده است. گیاه مورینگا (*Moringa oleifera*) سرشار از ترکیبات فلاونوئیدی به خصوص کوئرستین است که دارای خواص ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در این پژوهش ویژگی‌های نانوذرات فلزی آهن، مس، روی و نقره بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه *M. oleifera* مورد مطالعه قرار گرفته و در ادامه به بررسی تأثیر اسانس روغنی و عصاره آبی حاصل از اندام هوایی این گیاه و نانوذرات فلزی حاصل از آن بر رشد و زنده‌مانی لاین‌های سلولی سرطانی MCF-7 و BT-549 پرداخته شد.

تاریخ ارسال: ۱۴۰۲/۰۸/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۶

* نویسنده مسئول:

m.noruzpuor@gmail.com

روش بررسی: در این پژوهش پس از بیوسنتز نانوذرات فلزی آهن، مس، روی و نقره از عصاره آبی گیاه *M. oleifera* و بررسی خواص آن‌ها از نظر اندازه به کمک DLS و تأیید ساختار به کمک FTIR، میزان ترکیبات ثانویه اسانس (به کمک GC-MS) و عصاره آبی گیاه مورینگا (به کمک HPLC) مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین خواص ضدسرطانی اسانس و عصاره آبی گیاه (*M. oleifera*) و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن بر دو لاین سلولی MCF-7 و BT-549 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 FlowJ استفاده شد.

یافته‌ها: طبق نتایج به دست آمده از *DLS* اندازه نانوذرات آهن، مس، روی و نقره به ترتیب برابر با ۳۵، ۳۲، ۳۳ و ۳۴ نانومتر بود. میزان *IC₅₀* لاین‌های سلولی MCF-7 و BT-549 به‌طور معنی‌داری و در سطح احتمال یک درصد تحت تأثیر نوع تیمار مورد استفاده قرار گرفت. بیشترین میزان *IC₅₀* (۳۵/۹) میکرولیتر در میلی‌لیتر) مربوط به لاین سلولی MCF-7 تیمار شده با اسانس روغنی حاصل از اندام هوایی گیاه مورینگا می‌باشد. هم‌چنین درصد سلول‌های نکروزه شده، درصد سلول‌های موجود در مرحله پیش‌آپوپتوزی و پس‌آپوپتوزی لاین‌های سلولی MCF-7 و BT-549 مذکور به‌طور معنی‌داری و در سطح احتمال یک درصد تحت تأثیر نوع تیمار استفاده شده قرار گرفت. در مورد لاین سلولی MCF-7 بیشترین درصد سلول‌های نکروزه شده، سلول‌های موجود در مرحله پیش و پس آپوپتوزیس (به ترتیب ۲/۰۳، ۳/۴۲ و ۲۲/۵ درصد) مربوط به تیمار شاهد، عصاره آبی حاصل از اندام هوایی و نانوذرات مس بیوسنتز شده از عصاره آبی حاصل بود. بیشترین درصد سلول‌های نکروزه شده، سلول‌های واقع در مرحله پیش و پس آپوپتوزیس لاین سلولی BT-549 (به ترتیب ۶/۳۳، ۴/۳۲ و ۱۷/۵۶ درصد) نیز مربوط به تیمار کنترل، نانوذرات مس بیوسنتز شده از عصاره آبی حاصل بود.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج به دست آمده در این پژوهش نانوذره مس بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه مورینگا بالاترین میزان خاصیت ضدسرطانی بر روی لاین‌های سلولی MCF-7 و BT-549 داشت.

واژه‌های کلیدی: گیاه مورینگا، نانوذرات فلزی، MCF-7 و BT-549

مقدمه

سرطان یک بیماری مهلک با درصد مرگومیر بالاست که درگیری‌های روانی و اقتصادی زیادی به دنبال دارد (۱). سرطان پستان (BC) یکی از رایج‌ترین انواع سرطان‌ها است که سالانه حدود ۲/۳ میلیون مورد جدید (۱۱/۷) درصد از کل سرطان‌های تشخیص داده شده) از این نوع سرطان در مراحل ابتدایی و پیشرفته خود تشخیص داده می‌شود و در سال ۲۰۲۰ حدود ۶۸۵۰۰۰ مرگ ناشی از این نوع سرطان به ثبت رسیده است که انتظار می‌رود این رقم در سال ۲۰۷۰ به ۴/۴ میلیون نفر افزایش یابد (۲). شایع‌ترین نوع سرطان در بین زنان ایرانی سرطان پستان با پراکندگی ۷۶ درصدی از کل سرطان‌های تشخیص داده شده است (۳). مطالعات انجام شده نشان داده است که بیش از ۴۰ درصد از مبتلایان به این نوع از سرطان ۴۰ الی ۵۰ سال دارند که نشان‌دهنده این است که میانگین سنی مبتلایان به این نوع سرطان در ایران کمتر از میانگین جهانی است (۴). میزان بروز سرطان پستان در ایران به میزان ۲۰ مورد جدید در هر ۱۰۰۰۰۰ زن در سال است که برابر ۶۰۰۰ مورد جدید در سال است (۵). سرطان پستان به سه زیرگروه مولکولی اصلی: ۱) گیرنده هورمونی (HR) مثبت، ۲) HER₂ مثبت و ۳) سرطان پستان سه‌گانه منفی (TNBC) که بر روی نشانگرهای مولکولی مانند گیرنده استروژن (ER)، گیرنده پروژسترون (PR) شکل می‌گیرد، تقسیم‌بندی می‌شود. برای انتخاب یک روش درمانی مؤثر، شناسایی زیرگروه مولکولی سلول‌های سرطان پستان از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا هر نوع سرطان بر اساس بیان گیرنده‌های هورمونی موجود در سطح خود و حساسیت یا مقاومت منحصر به فرد خود نسبت به داروهای خاص دارد. لاین سلولی MCF-7 جزء گروه اول (لاین سلولی مثبت) و BT-549 جزء گروه سوم (لاین سلولی منفی) دسته‌بندی می‌شوند، که هر کدام از آن‌ها به داروها و ترکیبات دارویی مختلف پاسخ متفاوتی دارند (۶). بسته به نوع سرطان و میزان پیشرفت آن، روش‌های مختلفی جهت درمان این بیماری از جمله جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی، هورمون درمانی، پیوند سلول‌های بنیادی و سیستم دارورسانی هدفمند و فناوری نانو ابداع شده است (۷). هر یک از این روش‌های درمانی دارای موانع و عوارض جانبی خاص خود هستند. درمان ترکیبی مزایای قابل‌توجهی را در مقایسه

با روش درمانی منفرد سنتی در درمان سرطان پستان از طریق هم‌افزایی اثر عوامل شیمی‌درمانی مکمل ارائه می‌دهد که می‌تواند بر مقاومت تومور غلبه کند و باعث کاهش بروز عود تومور شود (۸). استفاده از ترکیبات مناسب گیاهی با عوارض جانبی کمتر و هم‌چنین ایجاد راهکاری به‌منظور افزایش جذب این ترکیبات توسط بافت سرطانی (هدف) و کاهش جذب آن توسط بافت‌های نرمال (غیرهدف) جهت درمان سرطان ضروری به نظر می‌رسد (۹).

فناوری‌نانو به عنوان یک رشته چند بخشی، چندین حوزه علمی از جمله پزشکی، مهندسی، کشاورزی، راه و ساختمان و غیره را در برمی‌گیرد. 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 آنتی‌بادی‌ها را تسهیل می‌کند (۱۰). انواع مختلفی از نانوذرات جهت درمان بیماری سرطان وجود دارند که از جمله آن می‌توان به نانوذرات آلی، ترکیبی و معدنی اشاره نمود که هر کدام از آن‌ها ویژگی‌ها و مزایای منحصر به فرد خود را در درمان تومورها تظاهر می‌نمایند (۱۱). از جمله نانوذرات فلزی پرکاربردی 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 (۱۲). نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) نوعی از نانوذرات اکسید فلزی است که ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی دارد و در برخی از فرایندهای فیزیولوژیکی نقش اساسی دارند (۱۳). 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 (۱۴). 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⁺ آزاد می‌کنند که موجب بروز اختلال در عملکرد میتوکندری سلول‌های توموری، فوران ROS، پراکسیداسیون لیپیدی، آسیب به DNA و درنهایت بروز مرحله آپوپتوز سلولی در سلول‌های هدف توموری می‌شوند (۱۵). Sadhukhan و همکاران (۲۰۱۹) از نانوذرات اکسیدروی جهت انتقال هدفمند کوئرستین به سلول‌های سرطان پستان انسان (MCF-7)

بدون آسیب رساندن به سلول‌های طبیعی شوند (۲۳). در یکی از مطالعات، تأثیر نانوذرات نقره بیوسنتز شده از عصاره دانه زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) بر رده سلولی آدنوکارسینوم پستان انسان (MCF-7 و AU565) مطالعه و گزارش شد که نانوذرات نقره بیوسنتز شده اثر ضدسرطانی زیادی بر روی هر دو نوع سرطان داشتند (۲۴).

روش‌های مختلفی جهت سنتز انواع نانوذرات فلزی وجود دارد که می‌توان به روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی اشاره نمود (۲۵). روش بیولوژیکی به معنای سنتز نانوذرات با استفاده از باکتری، قارچ، جلبک، مخمر و گیاهان است. روش‌های فیزیکی و شیمیایی دارای مزایا و معایب گوناگونی می‌باشند که از جمله مزایای این نانوذرات توزیع اندازه باریک آن‌ها و معایب اصلی آن مصرف انرژی بالا، زمان، هزینه بالا و سمیت بالا و زیست سازگاری پایین آن‌ها می‌باشد که امروزه کمتر مورد توجه قرار گرفته است (۲۶). روش‌های بیولوژیکی مزایای بیشتری نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی نظیر سازگاری با محیط زیست، هزینه کم تولید، عدم پردازش پایین دستی و بازدهی بالای دارند. از این رو، سنتز نانوذرات از طریق عصاره گیاهان، فرآیند کاهش یک مرحله‌ای ساده را با تولید در مقیاس بزرگ ارائه می‌دهد. گزارش‌های متعدد در مورد سنتز نانوذرات با استفاده از عصاره‌های گیاهی با فعالیت‌های بیولوژیکی قابل توجه ارائه شده است (۲۷). ترکیبات با ارزش دارویی نظیر فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، فنل‌ها، آلکالوئیدها، تانن‌ها و غیره موجود در عصاره‌های گیاهان دارویی به عنوان عوامل احیاکننده، پوشاننده و تثبیت کننده نانوذرات فلزی عمل می‌کنند. 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 (۲۸). *M. oleifera* سرشار از ترکیبات فلاونوئیدی به خصوص کوئرستین است که دارای خواص ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. کوئرستین موجود در نمونه‌های برگ و بذر گیاه *M. oleifera* به دلیل خاصیت آنتی-اکسیدانی موجب کلات شدن فلزات و مهار رادیکال‌های آزاد می‌شوند. فلاونوئیدها مرجع اصلی برخی از ایزوفلاونوئیدهایی نظیر ژنیستین، روتین و کوئرستین

استفاده کردند. آن‌ها نانوذرات اکسیدروی کوئرژوگه اسید فیل بورونیک (PBA) را که با کوئرستین بارگذاری شده بودند، سنتز نموده و گزارش نمودند که استفاده از نانوذرات اکسید روی جهت دارورسانی هدفمند به سلول‌های هدف (MCF-7) از کارایی بالایی برخوردار است (۱۶). از دیگر نانوذرات فلزی پرکاربرد در برنامه‌های تحقیقاتی برای مقابله با سلول‌های سرطانی جهت دارورسانی هدفمند استفاده از نانوذرات اکسید آهن می‌باشد. انواع مختلفی از نانوذرات مبتنی بر اکسید آهن شامل مگنتیت‌ها (Fe_3O_4)، ماگمیت‌ها (Fe_2O_3) و فریت‌های مخلوط (MFe_2O_4)، که در آن M می‌تواند Ni, Mn, Co یا Zn باشد) است (۱۷). Bhattacharya و همکاران (۲۰۲۳)، نانوذرات اکسید آهن دارای پوششی از جنس پلی‌لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید و پلی‌اتیلن گلیکولین به همراه داروی متوترکسات را جهت مقابله با سرطان پستان (MCF-7) سنتز و گزارش نمودند که ترکیب حاصل تقسیم و سازماندهی سلولی را مهار می‌نماید. هم‌چنین آن‌ها گزارش نمودند که نسبت سلول‌ها در فاز G1 و G2 نسبت به گروه کنترل به طور قابل توجهی افزایش یافتند (۱۸).

نانوذرات مس (CuNPs) به دلیل خواص مکانیکی، الکتریکی، مغناطیسی و حرارتی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته‌اند و در تصفیه آب، سیستم‌های انتقال حرارت و پوشش‌های ضد میکروبی برای ابزارهای جراحی استفاده می‌شوند (۱۹). از جمله مزیت عمده استفاده از نانوذرات مس ارزان بودن و در دسترس بودن آن است، به طوری که سنتز نانوذرات اکسیدمس مقرون به صرفه است (۲۰). نانوذرات اکسیدمس به طور انتخابی آپوپتوز سلولی در سلول‌های توموری را القا نموده و با ممانعت از رشد سلولی، از متاستاز ملانوم ممانعت می‌نماید (۲۱).

گزارش‌هایی جهت استفاده از نانوذرات اکسیدمس برای مقابله با سلول‌های توموری پروستات، پستان، کبد، مغز، کلیه، روده بزرگ و ریه در سطح آزمایشگاهی و گاهی بالینی ارائه شده است (۲۲). نقره یک عنصر اساسی با خواص غیرسمی و پتانسیل حرارتی و الکتریکی قابل توجه است. نانوذرات نقره از طریق بازدارندگی آبشارهای سیگنالینگ در سلول‌های سرطانی، خواص ضدسرطانی دارند. نانوذرات نقره می‌توانند سمیت سلولی را در سلول‌های سرطانی القا نموده و مانع از پیشرفت تومور

اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه

جهت اندازه‌گیری مقدار فلاونوئید کل عصاره آبی نمونه برگ‌های گیاه *M. oleifera* از روش Moradi و همکاران (۲۰۱۶) با کمی تغییر استفاده شد (۳۲). ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد (جرمی-حجمی)، ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم‌استات یک مولار به یک میلی‌لیتر عصاره حاصل اضافه شد و مقادیر جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۸ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد کوئرستین با استفاده از غلظت‌های مختلف کوئرستین (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آب مقطر) تهیه و برای کمی‌سازی میزان فلاونوئید کل در نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. سپس با استفاده از فرمول $T=(C \times V)/M$ مقدار فلاونوئید برحسب میلی‌گرم در یک گرم بافت کالوس محاسبه گردید. در این فرمول T ، میزان فلاونوئید برحسب میلی‌گرم در یک گرم بافت کالوس؛ C ، غلظت فلاونوئید برحسب میلی‌گرم کوئرستین در میلی‌لیتر؛ V ، حجم نهایی عصاره و M ، وزن نمونه (بافت کالوس برحسب گرم) است. برای اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین نیز از روش (۱۹۹۷) Wagner استفاده شد (۳۳). برای این منظور جذب نوری عصاره‌های حاصل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس میزان آنتوسیانین با استفاده از فرمول $A=\epsilon bc$ و ضریب خاموشی $M^{-1}cm^{-1}$ ۳۳۰۰۰ محاسبه شد. در فرمول فوق A برابر مقدار عدد جذبی، b برابر عرض کووت، ϵ برابر ضریب خاموشی و c برابر غلظت آنتوسیانین است.

اندازه‌گیری مقدار متابولیت‌های ثانویه به روش

HPLC

به منظور اندازه‌گیری مقدار متابولیت‌های ثانویه (روتین، کوئرستین و کمپفرول) با استفاده از دستگاه HPLC، از روش Hurst و همکاران (۱۹۸۳) استفاده شد (۳۴). ابتدا یک گرم از نمونه خشک شده توسط ازت مایع و در هاون چینی ساییده شده و پس از افزودن ۱۰ میلی‌لیتر 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 $35^{\circ}C$ نگاه‌داری شد و پس از ۳ ساعت دوباره تیمار ورتکس و اولتراسوند تکرار شد. سپس

هستند که از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کنند (۲۹).

اگرچه 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 *M. oleifera* 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 آلکالوئیدی در این گیاه (۳۰)، به نظر می‌رسد این گیاه از پتانسیل بالایی در تولید نانوذرات فلزی برخوردار باشد. لذا در این پژوهش ویژگی‌های نانوذرات فلزی آهن، مس، روی و نقره بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه *M. oleifera* مورد مطالعه قرار گرفت و در ادامه به بررسی تأثیر اسانس روغنی و عصاره آبی حاصل از اندام هوایی گیاه *M. oleifera* و نانوذرات فلزی آهن، مس، روی و نقره حاصل از آن بر رشد و زنده‌مانی لاین‌های سلولی سرطانی MCF-7 و BT-549 پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی

مواد گیاهی مورد استفاده در این آزمایش از گیاهان *M. oleifera* رشد یافته در گلخانه دانشگاه محقق اردبیلی جمع‌آوری شدند. سرشاخه‌های جوان فاقد بیماری و مناسب از نظر ظاهری انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه برگ‌ها پس از جداسازی، در دمای $25^{\circ}C$ خشک شدند. به منظور استخراج متابولیت‌های ثانویه نمونه‌های جمع‌آوری شده از روش Alizadeh و همکاران (۲۰۱۶) با کمی تغییرات استفاده شد (۳۱). بدین منظور ابتدا ۱ گرم از نمونه گیاهی درون هاون چینی و به کمک ازت مایع ساییده شد. پس از انتقال به لوله سربیچ‌دار ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار اتوکلاو شده به آن اضافه شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۷۲ ساعت در روی شیکر با سرعت پایین و دمای $25^{\circ}C$ و در شرایط تاریکی نگاه‌داری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و 4000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی پس از جمع‌آوری و عبور دادن از فیلتر 0.2 میکرونی، جهت اندازه‌گیری مقدار فلاونوئید و آنتوسیانین در دمای $20^{\circ}C$ - نگاه‌داری شدند.

- بیوسنتز نانوذره مس

بیوسنتز نانوذرات مس به روش Akintelu و همکاران (۲۰۱۸) با کمی تغییرات انجام شد (۳۶). بدین منظور ابتدا ۱۰ میلی‌مولار سولفات مس به ۱۰ میلی‌لیتر عصاره آبی گیاه اضافه شد. سپس محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت و در دمای 50°C 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 80°C - نگهداری شدند.

- بیوسنتز نانوذره نقره

جهت بیوسنتز نانوذرات نقره ابتدا یک میلی‌مولار نترات 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 10000°C دور در دقیقه و دمای 25°C 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 80°C - نگهداری شد (۳۷).

- بیوسنتز نانوذره روی

برای بیوسنتز نانوذرات روی ابتدا 0.02 مولار استات روی به ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه شده اضافه و به کمک همزن برقی مغناطیسی به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق هم زده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره آبی گیاه در طی چند مرحله به آن اضافه گردید. پس از ۱۰ دقیقه و به صورت قطره قطره یک میلی‌لیتر 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 (۳۸) با افزایش دمای دستگاه همزن برقی مغناطیسی به 50°C 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 10000°C دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب نهایی

نمونه‌ها در 10000°C دور در دقیقه و برای مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس عصاره رویی جهت اندازه‌گیری ترکیبات بیوشیمیایی فوق با استفاده از دستگاه HPLC (GermanyAZURA.KENUVER) ستون فاز معکوس C18 توسط فیلتر سرسرنگی 0.2 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 257 nm ، 368 nm و 368 nm انجام گرفت. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نمونه خالص روتین (NAWAH-Egypt HIKA2001)، کوئرستین (Sigma-Aldrich) و کمپفرول (Sigma-Aldrich) استفاده شد.

بیوسنتز نانوذرات فلزی

- بیوسنتز نانوذره آهن

جهت بیوسنتز نانوذرات آهن از روش Shebl و همکاران (۲۰۱۹) با کمی تغییرات استفاده شد (۳۵). بدین منظور در ابتدا مقدار $3/33$ گرم از نمک آهن (III) کلرید ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) و $1/59$ 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 80°C بالا برده شد. سپس در بازه زمانی ۱۰ دقیقه ۱۵ میلی‌لیتر از عصاره آبی گیاه (*M. oleifera*) 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 10000°C دور در دقیقه از لوله‌های آزمایشی جمع‌آوری شدند و پس از ۲۴ ساعت استقرار در یخچال 80°C - جهت حذف آب موجود درون نمونه‌های حاصل درون دستگاه فریزدرای و به مدت سه ساعت خشک شدند.

جمع‌آوری شده و توسط دستگاه فریزدرای خشک شدند. ترکیب نهایی برای آزمایش‌های نهایی در دمای -80°C نگهداری شد (۳۹).

بررسی خصوصیات نانوذرات فلزی

اندازه متوسط نانوذرات آهن، مس، روی و نقره بیوسنتز شده با استفاده از دستگاه پراکندگی نور دینامیکی (DLS، شرکت Horiba، ساخت کشور ژاپن) تعیین شد. همچنین تشکیل نانوذرات مگنتیت توسط طیف‌سنجی FTIR (شرکت Thermo Scientific، ساخت کشور آمریکا) تأیید شد.

اسانس‌گیری از اندام هوایی

اسانس روغنی گیاه مورینگا (*M. oleifera*) به‌وسیله تقطیر با آب و از اندام هوایی آن و به کمک دستگاه کلونجر انجام شد. برای این منظور نمونه اندام هوایی گیاه مورینگا از نمونه‌های رشد یافته در گلخانه دانشگاه محقق از نظر ظاهری شناسایی و 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 شد و سپس اسانس روغنی نمونه برگ‌های گیاه مورینگا توسط دستگاه کلونجر و حلال آبی، استخراج شد (۴۰).

تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی (GC-Mass)

تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی اسانس آبی برگ گیاه مورینگا به کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی با آشکارساز طیف‌سنجی جرمی- ساخت شرکت Agilent کشور آمریکا Agilent 7890B series GC با ستون GC ذوب شده (۲۰۱۰) و پوشش داده شده با سیلیکون پلی‌متیل (۰/۲۵ نانومتر \times ۳۰ متر) انجام شد.

کشت لاین‌های سلول سرطانی

فرایند آزمایشات مربوط به بخش سرطان و تأثیر عصاره آبی گیاه *M. oleifera* و نانوذرات آهن، مس، نقره و روی بیوسنتز شده از آن و عصاره آبی نمونه کالوس‌های

سنجش میزان IC_{50} میزان IC_{50} (غلظتی از یک ترکیب که موجب نابودی حداقل ۵۰ درصد سلول‌ها می‌شود) ترکیبات موردنظر به کمک دستگاه الیزاریدر تعیین گردید. پس از تأیید تراکم مناسب سلولی (به کمک تریپان بلو) ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت دارای تراکم سلولی بالا به هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ تایی استریل شده به کمک اشعه UV اضافه شدند. سپس غلظت‌های مشخصی از اسانس روغنی، عصاره آبی گیاه *M. oleifera* هر کدام به‌طور مجزا (۲۰۰ و 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 مورینگا هر کدام به صورت مجزا (۲۰۰ و ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۲۵، ۱ و صفر (شاهد) میکروگرم در لیتر) به درون هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد و سپس حجم نهایی هر چاهک به کمک محیط کشت پایه به ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس نمونه‌ها برای مدت زمان ۲۴ ساعت به دستگاه انکوباتور CO_2 فاقد روشنایی، CO_2 (۵درصد) و دمای 37°C منتقل شدند. جهت بررسی میزان زنده‌مانی سلولی و درنهایت میزان IC_{50} از WST-1 به‌عنوان تشخیص‌دهنده استفاده شد. WSTs (نمک‌های تترازولیوم محلول در آب) از طیف‌های جذبی مختلف فورمازان‌های جهت ارزیابی فعالیت متابولیک سلولی و زنده مانی سلولی استفاد می‌کند. WST-1 برخلاف MTT با واسطه الکترون PMS ترکیب می‌شوند و فورمازان محلول در آب تولید می‌کنند. از جمله مزیت سنجش WST-1 نسبت به MTT می‌توان

ساخت کشور آمریکا، درصد زنده‌مانی سلولی، درصد سلول‌های نکروزه شده، درصد سلول‌های واقع در مرحله پیش آپوپتوزی و مرحله پس آپوپتوزی سلولی مشخص شدند (۴۲).

طرح آزمایشی و تجزیه آماری

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. میزان زنده‌مانی سلولی (بررسی میزان IC_{50} سلول‌های سرطانی) به کمک نرم‌افزار GraphPad Prism8 بررسی شد. هم‌چنین بررسی نتایج فلوسیتومتری به کمک نرم‌افزار FlowJ انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver. 26 (در سطح احتمال یک درصد) انجام گرفت. مطالعه حاضر توسط کارگروه کمیته اخلاق دانشگاه محقق اردبیلی (به شماره شناسه IR.UMA.REC.1402.054) تأیید شد.

یافته‌ها

میزان فلاونوئید، آنتوسیانین، روتین، کوئرستین و کمپفرول عصاره آبی گیاه *M. oleifera* طبق نتایج به دست آمده در این پژوهش میزان فلاونوئید، آنتوسیانین، روتین، کوئرستین و کمپفرول عصاره آبی گیاه *M. oleifera* به ترتیب ۰/۸۹ میلی‌گرم در گرم، ۱۳/۰۵ میکرومول در گرم، ۳۴/۵۵ میلی‌گرم در گرم، ۱۵/۷۸ میلی‌گرم در گرم و ۱۰/۱۵ میلی‌گرم در گرم بود (جدول ۱). سنجش میزان روتین، کوئرستین و کمپفرول عصاره آبی گیاه *M. oleifera* توسط HPLC شناسایی و مشخص شدند (شکل ۱).

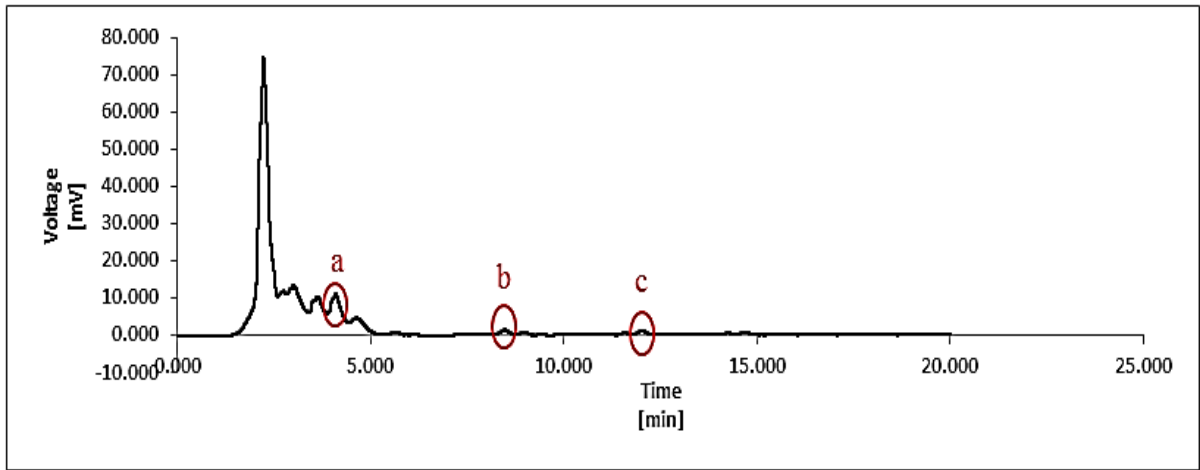
به (۱) می‌توان مستقیماً نتایج حاصل از WST-1 را قرائت نمود (برخلاف MTT که نیاز به مرحله انحلال دارد)، (۲) سیگنال مؤثرتری نسبت به MTT می‌دهد و (۳) سمیت کمتری نسبت به روش MTT برای سلول‌ها دارد. برای این منظور به هر کدام از چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر WST-1 (شرکت Roche، کشور آلمان) اضافه شد و پس از گذشت ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه میزان جذب نمونه‌های مورد نظر در طول موج ۴۴۰ نانومتر توسط دستگاه الیزاریدر قرائت شد (۴۲).

سنجش خواص ضدسرطانی ترکیبات مورد نظر به کمک روش فلوسیتومتری

پس از شناسایی غلظت IC_{50} ترکیبات موردنظر، به بررسی خواص ضدسرطانی اسانس، عصاره آبی گیاه *M. oleifera* و نانوذرات آهن، مس، نقره و روی بیوسنتز 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 تریبان بلو) به هر کدام از پلیت‌ها اضافه شد. سپس غلظت مناسبی از ترکیبات موردنظر (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 آنکوباتور CO_2 فاقد روشنایی، CO_2 ۵ درصد و دمای $37^{\circ}C$ منتقل شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت به کمک دستگاه فلوسیتومتری (Becton Dickinson FACSCALIBUR Analyzer- 2018 Cytometer) ساخت کشور آلمان و کیت تشخیصی (ANNEX-V FITKit شرکت Immunostep (2023)

جدول ۱: میزان فلاونوئید، آنتوسیانین، روتین، کوئرستین و کمپفرول عصاره آبی گیاه *M. oleifera* و عصاره آبی نمونه کالوس‌های جمع‌آوری شده از محیط کشت حاوی محرک

نمونه	فلاونوئید ($mg.g^{-1}$)	آنتوسیانین ($\mu mole.g^{-1}$)	روتین ($mg.g^{-1}$)	کوئرستین ($mg.g^{-1}$)	کمپفرول ($mg.g^{-1}$)
مقدار در نمونه آبی گیاه	۰/۸۹ ± ۰/۰۱	۱۳/۰۵ ± ۰/۰۱	۳۴/۵۵ ± ۰/۰۱	۱۵/۷۸ ± ۰/۰۱	۱۰/۱۵ ± ۰/۰۱

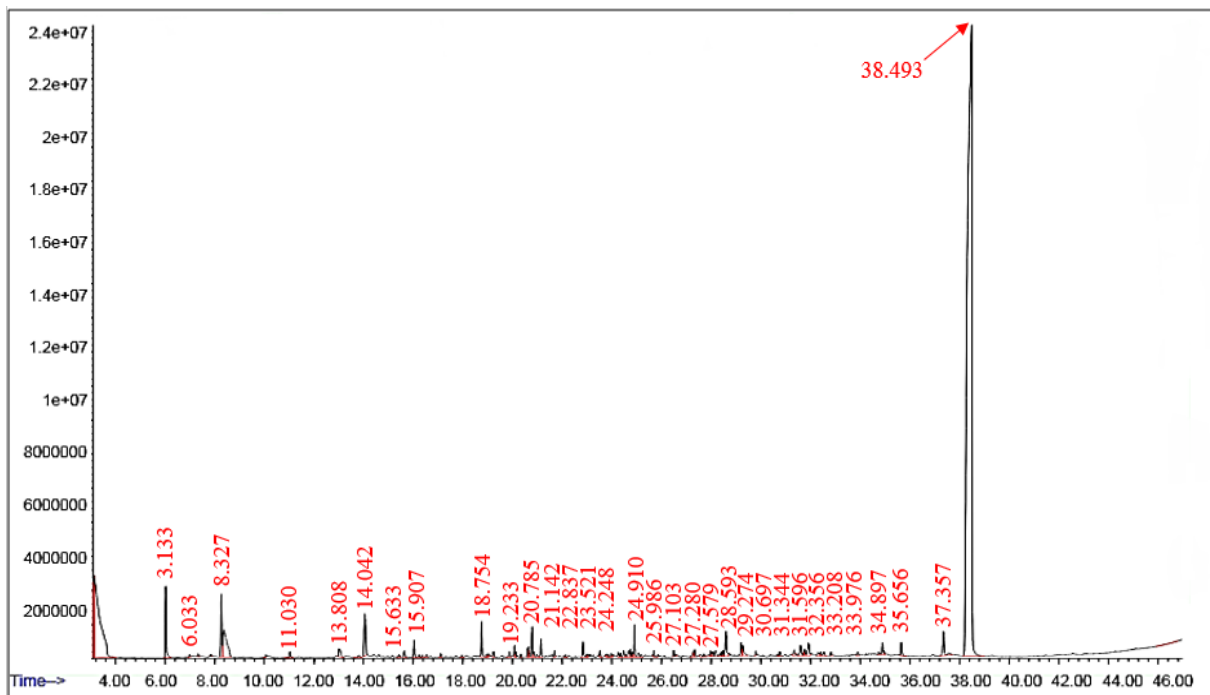


شکل ۱: تصویر شماتیک نتایج حاصل از HPLC عصاره آبی برگ گیاه مورینگا؛ (a) روتین، (b) کوئرستین و (c) کمپفرول

Oxalic acid, 6-، Cyclotrisiloxane, hexamethyl- Phenol, 2,4-bis(1,1-ethyl-3-yl heptyl ester Hexadecane, 2,6,10,14-، dimethylethyl)-، tetramethyl- و غیره با خواص ضدالتهابی، ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، ضددیابت، ضدسرطان و حشره‌کش تأیید شد.

تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی (GC-Mass)

طبق نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی (GC-Mass) حاصل از اسانس گیاه مورینگا (شکل ۲ و جدول ۲)، وجود ترکیبات فلاونوئیدی همانند-Oxime-، methoxy-phenyl- 1-



شکل ۲: تصویر شماتیک نتایج حاصل از GC-Mas اسانس گیاه مورینگا (*M. oleifera*)

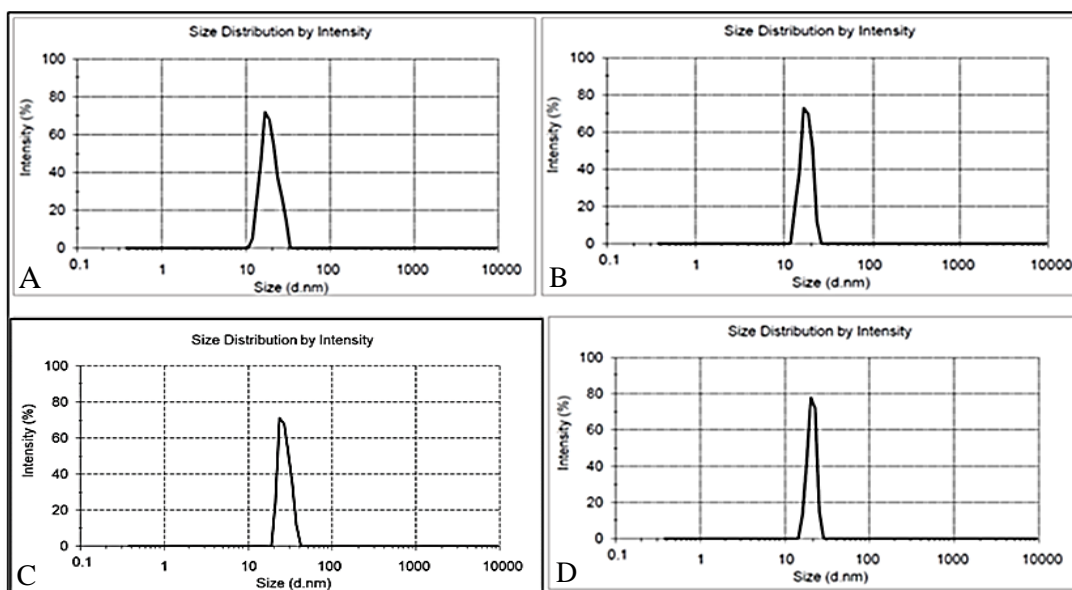
جدول ۲: نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) اسانس گیاه مورینگا (*M. oleifera*)

NO	Compounds	Molecular formula	Retention Time	Total (%)	Recorded pharmacological activity	References
1	Heptane, 2,4-dimethyl-	C ₉ H ₂₀	3.133	6.57	fungal metabolite	(43)
2	Methoxy phenyl-Oxime	C ₈ H ₉ N ₂ O ₂	6.033	1.57	Antibacterial	(44)
3	Decane	C ₁₀ H ₂₂	8.327	1.912	-	-
4	Hexamethylcyclotrisiloxane	C ₆ H ₁₈ O ₃ Si ₃	11.030	0.168	antioxidant	(45)
5	Silane, cyclohexyldimethoxymethyl-	C ₉ H ₂₀ O ₂ Si	13.011	0.398	antioxidant	(45)
6	1-hexyl-3-methyl-Cyclopentane	C ₁₂ H ₂₄	13.808	0.107	-	-
7	Dodecane	C ₁₂ H ₂₆	14.042	0.868	antibacterial, antifungal antitumor, neurotrophic and anti-inflammatory	(46)
8	2,4-Dimethylundecane	C ₁₃ H ₂₈	15.638	0.194	-	-
9	Tetradecane.acid	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	18.754	0.758	Larvicidal and repellent activity, antifungal, antioxidant, cancer preventive, nematicide, hypercholesterolemic	(43)
10	Oxalic acid, 6-ethyloct-3-yl heptyl ester	C ₁₉ H ₃₆ O ₄	19.233	0.164	anti-inflammatory, antibacterial, antioxidant, anthelmintic, antidiabetic, anticancer, mosquitocidal, and insecticidal activity	(47)
11	Heptadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	C ₂₁ H ₄₄	20.073	0.190	-	-
12	Tridecane, 1-iodo	C ₁₃ H ₂₇	20.785	0.600	-	-
13	Heptadecane, 4-methyl-	C ₁₈ H ₃₈	20.857	0.142	-	-
14	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	C ₁₇ H ₃₀ OSi	21.142	0.415	anticancerous, antiviral, hypoglycaemic, antibacterial and anti-inflammatory	(48)
15	Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	C ₂₀ H ₄₂	22.837	0.349	-	-
16	Eicosane	C ₂₀ H ₄₂	23.521	0.164	antimicrobial	(49)
17	Dodecane, 2-methyl-	C ₁₃ H ₂₈	24.248	0.130	-	-
18	Nonadecane	C ₁₉ H ₄₀	24.475	0.210	Antimicrobial and Antioxidant	(50)
19	Decane, 2,3,5-trimethyl-	C ₁₃ H ₂₈	24.675	0.191	-	-
20	2-Bromo dodecane	C ₁₂ H ₂₅ Br	24.747	0.173	-	-
21	Heptadecane, 2,6,10,15-tetramethyl-	C ₂₁ H ₄₄	24.910	0.645	-	-
22	Octadecane acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	26.486	0.142	Antifungal, antibacterial, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic	(45)
23	Eicosane	C ₂₀ H ₄₂	27.280	0.178	antimicrobial	(49)
24	Heneicosane	C ₂₁ H ₄₄	27.579	0.216	antimicrobial	(51)
25	Tetra Triacontane	C ₃₄ H ₇₀	28.593	0.816	-	-
26	Octadecane. acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	29.274	0.375	Antifungal, antibacterial, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic	(45)
27	Heptadecane, 3-methyl-	C ₁₈ H ₃₈	30.697	0.132	-	-
28	Hexanedioic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	31.344	0.172	Antioxidant, hypocholesterolemic nematicide, pesticide, antiandrogenic favor, hemolytic, 5-alpha reductase inhibitor, antimicrobia	(45, 47)
29	Phthalic acid, iso hexyl isopropyl	C ₁₇ H ₂₄ O ₄	31.596	0.331	-	-
30	Decane, 3,8-dimethyl-	C ₁₂ H ₂₆	33.902	0.116	-	-
31	1-Cyclohexyldimethylsilyloxy-3,5-dimethylbenzene	C ₁₆ H ₂₆ OSi	34.897	0.306	-	-
32	Hexanedioic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	35.656	0.361	Antioxidant, hypocholesterolemic nematicide, pesticide, antiandrogenic favor, hemolytic, 5-alpha reductase inhibitor, antimicrobia	(45, 47)
33	Di-n-octyl phthalate	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	37.353	0.761	-	-
34	1,2,benzenedicarboxylic acid	C ₈ H ₆ O ₄	38.493	65.229	Antimicrobial, antifouling, Antioxidant	(43)

بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه (*M. oleifera*) دارای اندازه متوسط به ترتیب ۳۵، ۳۲، ۳۳ و ۳۴ نانومتر می‌باشد (شکل ۳).

نتایج DLS

نتایج حاصل از توزیع اندازه نانوذرات بیوسنتز شده (DLS) نشان داده شده در شکل ۱ ابعاد نانوذرات سنتز شده را تأیید کرد. نانوذرات آهن، مس، نقره و روی

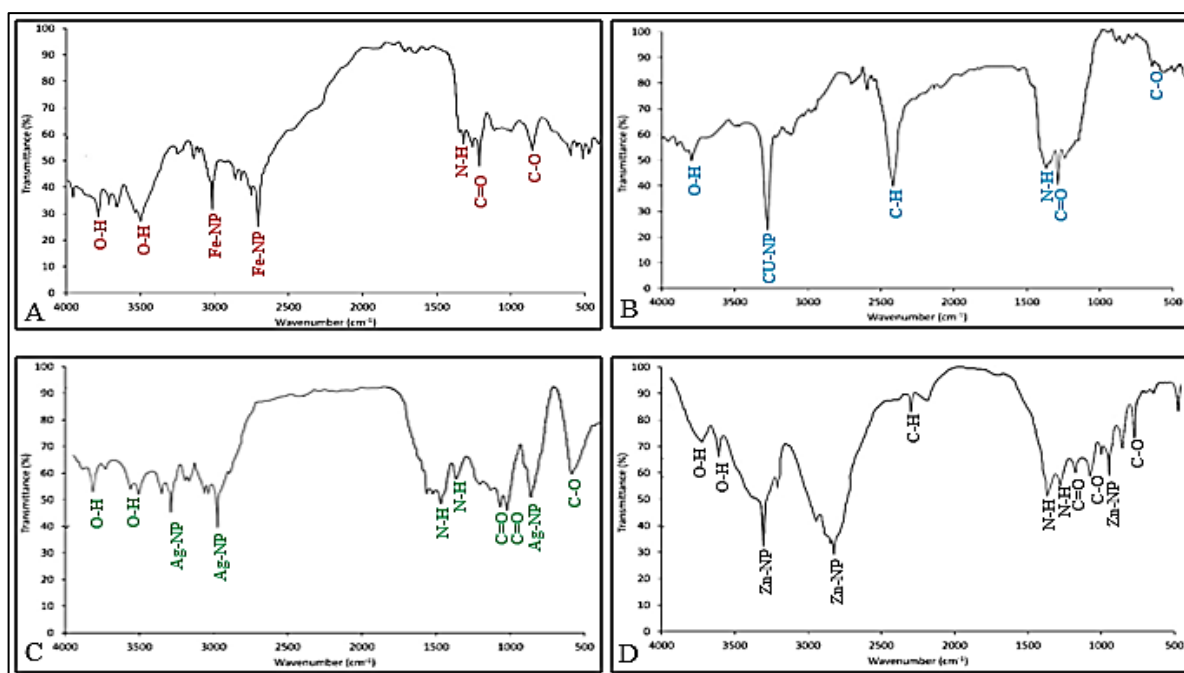


شکل ۳: توزیع اندازه نانوذرات بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه (*M. oleifera*): نانوذرات (A آهن، B مس، C نقره و D روی)

نتایج FTIR

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).

وجود پیک‌های دو گانه و پشت سرهم در تصاویر FTIR (شکل ۲)، نانوذرات آهن، مس، نقره و روی در نواحی ۳۵۰۰-۴۰۰۰ نمایانگر ارتعاشات کششی گروه H-O می‌باشد. همچنین وجود پیک‌های دوتایی و پیک‌های کشیده در ناحیه ۲۸۰۰-۳۵۰۰ نمایانگر حضور نانوذرات



شکل ۴: طیف FTIR نانوذرات بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه (*M. oleifera*): نانوذرات (A آهن، B مس، C نقره و D روی)

میزان IC_{50} لاین‌های سلولی MCF-7 و BT-549 به‌طور معنی‌داری ($p < 0.01$) تحت تأثیر نوع تیمار استفاده شده (اسانس و عصاره‌ی آبی گیاه مورینگا (*M. oleifera*) و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده).

میزان فعالیت ضدسرطانی اسانس و عصاره‌ی آبی گیاه مورینگا (*M. oleifera*) و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده

ارزیابی میزان IC_{50}

طبق نتایج به‌دست آمده از جدول تجزیه واریانس (جدول ۳).

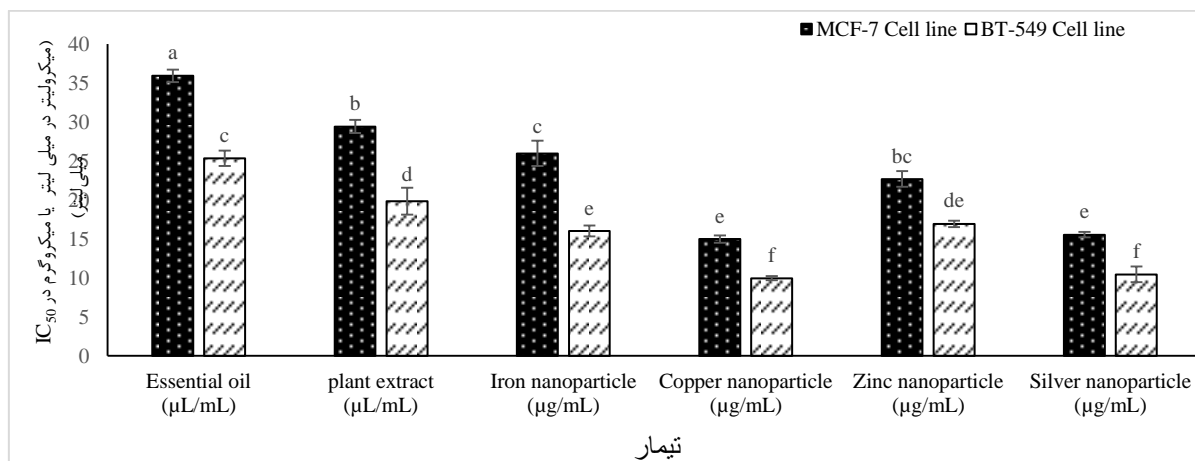
جدول ۳: تجزیه واریانس میزان IC_{50} لاین‌های سلولی MCF-7 و BT-549 تحت تأثیر اسانس روغنی و عصاره آبی گیاه *M. oleifera* و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن. (آزمون دانکن)

میانگین مربعات میزان IC_{50} لاین سلولی		درجه آزادی	منبع تغییرات
BT-549	MCF-7		
۲۲۵۰/۷۹ **	۲۶۰۱/۷۵**	۵	تیمار
۹/۸۱	۶/۸۲	۱۲	خطا
۶/۷۰	۴/۷۴	-	ضریب تغییرات (درصد)

** : معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

عصاره آبی گیاه مورینگا و نانوذرات آهن، مس، روی و نقره نیاز است. به بیان دیگر لاین سلولی BT-549 نسبت به لاین سلولی MCF-7 در برابر تیمارهای مذکور حساس‌تر می‌باشد (شکل ۵). از طرفی دیگر در بررسی تأثیر تیمارهای مختلف بر لاین‌های سلولی MCF-7 و BT-549 مشخص شد که تیمار لاین‌های سلولی MCF-7 با اسانس روغنی گیاه مورینگا به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارهای دیگر بود این امر در مورد لاین سلولی BT-549 نیز صادق بود. همچنین استفاده از نانوذرات مس و نقره موجب کاهش معنی‌دار میزان IC_{50} در هر دو لاین سلولی مذکور شد. این در حالی بود که از نظر درصد IC_{50} هر دو لاین سلولی بین استفاده از نانوذرات مس و نقره اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

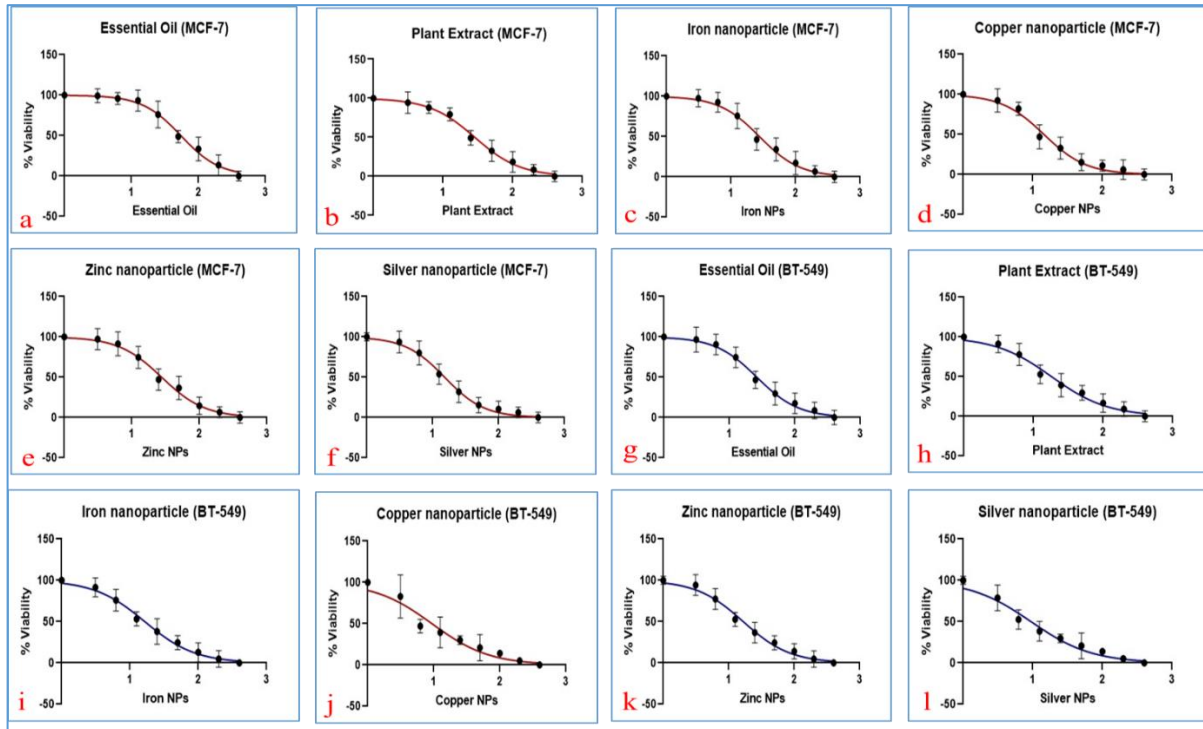
طبق نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۵)، از نظر میزان IC_{50} (حداقل غلظتی که می‌تواند حداقل ۵۰ درصد سلول‌ها را از بین ببرد) بین لاین‌های سلولی MCF-7 و BT-549 تیمار شده با اسانس روغنی و عصاره آبی گیاه *M. oleifera* و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن، اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده شد. همچنین این اختلاف معنی‌دار نیز درون هر لاین سلولی و بین تیمارهای مختلف مشاهده شد. به طوری‌که در تمامی موارد میزان IC_{50} لاین‌های سلولی MCF-7 به‌طور معنی‌داری بیشتر از لاین سلولی BT-549 بود که بیانگر این موضوع می‌باشد که برای از بین بردن حداقل ۵۰ درصد از کل جمعیت لاین سلولی MCF-7 نسبت به لاین سلولی BT-549 به غلظت‌های بالاتری از اسانس روغنی و



شکل ۵: درصد زنده‌مانی لاین‌های سلولی MCF-7 و BT-549 تحت تأثیر اسانس روغنی و عصاره‌ی آبی گیاه مورینگا (*M. oleifera*) و نانوذرات آهن، مس، روی و نقره بیوسنتز شده از آن

مذکور (برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر) جهت محاسبه میزان IC_{50} لاین‌های سلولی MCF-7 و BT-549 استفاده شد (شکل ۶).

هم‌چنین از غلظت‌های مختلف اسانس روغنی و عصاره آبی گیاه مورینگا (برحسب میکرولیتر بر میلی‌لیتر) و نانوذرات آهن، مس، روی و نقره بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه



شکل ۶: نمودار میزان IC_{50} (a, b, c, d, e, f) به ترتیب تأثیر اسانس روغنی گیاه مورینگا، عصاره آبی گیاه مورینگا، نانوذرات آهن، مس، روی و نقره بر لاین سلولی MCF-7 (a, b, c, d, e, f) و به ترتیب تأثیر اسانس روغنی گیاه مورینگا، عصاره آبی گیاه مورینگا، نانوذرات آهن، مس، روی و نقره بر لاین سلولی BT-549 (g, h, i, j, k, l)

غلظت‌های به دست آمده از میزان IC_{50} بر روی لاین سلولی MCF-7 و BT-549 نشان داد که درصد سلول‌های نکرده شده، درصد سلول‌های موجود در مرحله پیش‌آپوپتوزی و پس‌آپوپتوزی سلول‌های سرطانی مذکور به‌طور معنی‌داری ($p < 0.01$) تحت تأثیر نوع تیمار استفاده شده قرار دارد (جدول ۴).

سنجش خواص ضدسرطانی اسانس و عصاره آبی گیاه مورینگا (*M. oleifera*) و نانوذرات فلزی بیوسنتز به کمک روش فلوسیتومتری نتایج حاصل از تجزیه واریانس میزان خواص ضدسرطانی اسانس و عصاره آبی گیاه مورینگا (*M. oleifera*) و نانوذرات آهن، مس، روی و نقره بیوسنتز شده از آن (در

جدول ۴: تأثیر اسانس و عصاره آبی گیاه مورینگا (*M. oleifera*) و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن بر درصد سلول‌های نکرده شده، درصد سلول‌های موجود در مرحله پیش‌آپوپتوزی و پس‌آپوپتوزی لاین سلولی MCF-7 و BT-549. (آزمون دانکن)

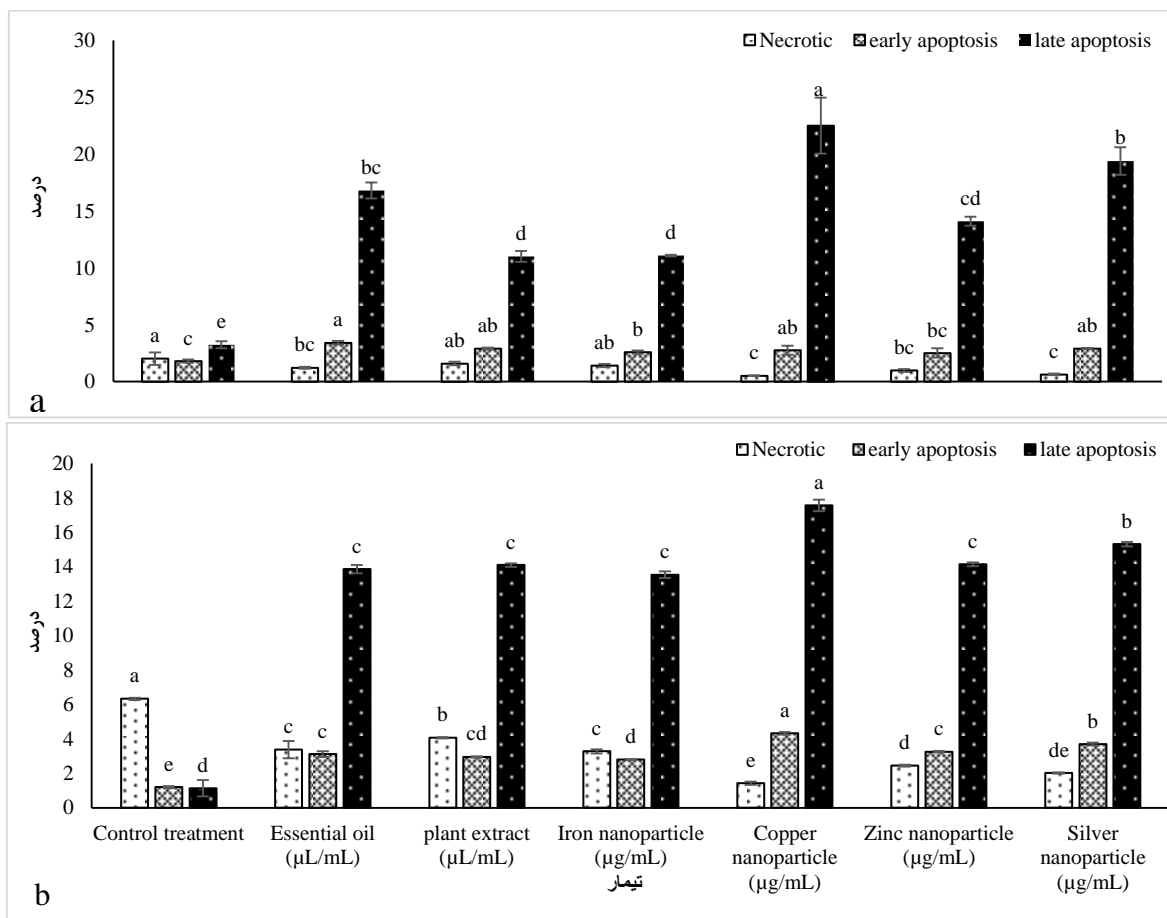
منبع تغییرات	BT-549			MCF-7			درجه آزادی	تیمار
	سلول‌های واقع در مرحله پیش‌آپوپتوزی	سلول‌های واقع در مرحله نکرده شده	سلول‌های نکرده شده	سلول‌های واقع در مرحله پیش‌آپوپتوزی	سلول‌های واقع در مرحله نکرده شده	سلول‌های نکرده شده		
تیمار	۴۲/۱۵**	۱/۴۱**	۳/۹۵**	۶۵/۲۷**	۰/۴۵*	۰/۶۳**	۶	تیمار
خطا	۹/۶۴	۰/۲۸	۰/۹۱	۱۲/۴۶	۰/۲۱	۰/۰۷	۱۴	خطا
ضریب تغییرات (%)	۲۴/۲۵	۱۷/۴۶	۲۹/۰۸	۲۵/۱۰	۲۷/۱۱	۲۱/۶۶	-	ضریب تغییرات (%)

* و **: معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد

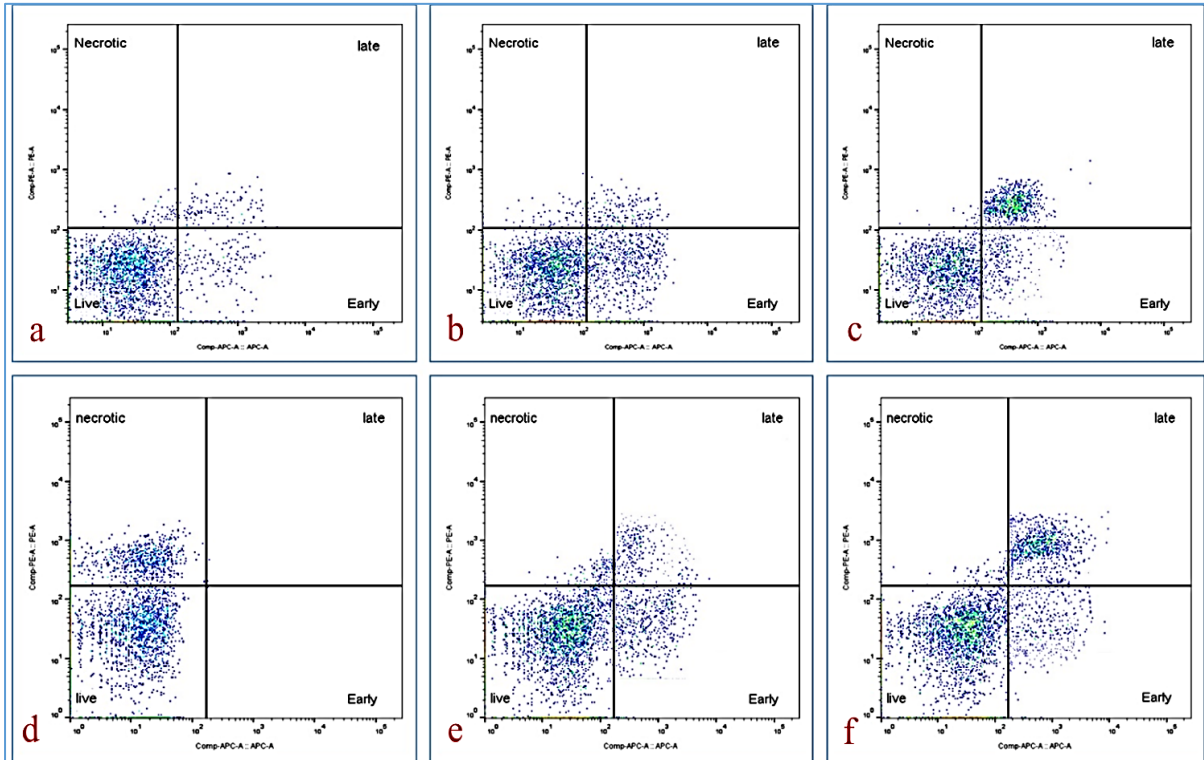
(b). بیشترین درصد پس‌آپوپتوزی سلولی (۲۲/۵ درصد) نیز در تیمار سلول با نانوذرات مس بیوسنتز شده مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۸-۷c).

همچنین از نظر سلول‌های نکروزه شده، درصد سلول‌های موجود در مرحله پیش‌آپوپتوزی و پس‌آپوپتوزی لاین سلولی BT-549 بین تیمارها (اسانس و عصاره‌ی آبی گیاه مورینگا و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن در غلظت‌های محاسبه شده در سنجش IC_{50}) اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده شد (شکل ۷-۷b و شکل ۸-۷d). بیشترین درصد سلول‌های نکروزه شده (۶/۳۳ درصد) مربوط به تیمار شاهد بود. همچنین بیشترین درصد لاین‌های سلولی BT-549 واقع در مرحله پیش و پس‌آپوپتوزیس (به ترتیب ۴/۳۲ و ۱۷/۵۶ درصد) مربوط به تیمار لاین‌های سلولی مذکور با نانوذرات مس بیوسنتز شده بود (شکل ۷-۷b و شکل ۸-۷e و f).

طبق نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۷-۷a)، درصد سلول‌های نکروزه شده، درصد سلول‌های موجود در مرحله پیش‌آپوپتوزی و پس‌آپوپتوزی لاین سلولی MCF-7 به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر غلظت‌های به‌دست آمده از سنجش IC_{50} اسانس و عصاره‌ی آبی گیاه مورینگا (*M. oleifera*) و نانوذرات آهن، مس، روی و نقره بیوسنتز شده از آن قرار گرفت. همان‌طوری که در شکل ۷-۷a مشاهده می‌شود بیشترین درصد سلول‌های MCF-7 نکروزه شده (۲/۰۳ درصد) مربوط به تیمار کنترل می‌باشد (شکل ۸-۷a) که به‌طور معنی‌داری بیشتر از اکثر تیمارها بود. وجود درصد بالای سلول‌های نکروزه شده در تیمار شاهد می‌تواند به دلیل تراکم بالا در اثر رشد زیاد و در نتیجه مرگ بیشتر سلول‌های سرطانی در اثر کاهش منابع تأمین‌کننده انرژی باشد. علاوه‌براین، بیشترین درصد سلول‌های MCF-7 واقع در مرحله پیش‌آپوپتوزیس (۳/۴۲ درصد) مربوط به تیمار سلول‌های مذکور با عصاره آبی حاصل بود (شکل ۸-۷a).



شکل ۷: تأثیر اسانس و عصاره‌ی آبی گیاه مورینگا (*M. oleifera*) و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن بر درصد سلول‌های نکروزه شده، درصد سلول‌های موجود در مرحله پیش‌آپوپتوزی و پس‌آپوپتوزی لاین سلولی MCF-7 (a) و لاین سلولی BT-549 (b)



شکل ۸: نتایج فلوسایتومتری: (a و b) لاین سلولی MCF-7 تیمار شده به ترتیب تیمار شاهد، عصاره آبی گیاه *M. oleifera* و نانوذره سنتز شده از عصاره آبی گیاه *M. oleifera*; (c و d) لاین سلولی BT-549 تیمار شده به ترتیب تیمار شاهد، عصاره آبی گیاه *M. oleifera* و نانوذره سنتز شده از عصاره آبی گیاه *M. oleifera*

بین جذب بیوفلاونوئیدها و خطر ابتلا به سرطان‌های انسانی را نشان داده‌اند (۵۵). بررسی‌های پیشگیری و درمان سرطان، کارایی بیوفلاونوئیدها را در مهار سرطان ارزیابی کرده است. برخی از پیامدهای بیولوژیکی بیوفلاونوئیدها عبارتند از (۱) فعالیت ضدتومورزایی، (۲) فعالیت آنتی‌اکسیدانی و معرفی آنزیم‌های سم‌زدا، (۳) مهار اتصال به ATP به ویژه توسط تیروزین کینازها، (۴) فعالیت استروژنی/ضداستروژنی و (۵) القای آسیب DNA و مهار فعالیت کاتالیزوری DNA توپوایزومراز II (۵۶). چندین زیر خانواده فلاونوئیدها شامل فلاون‌ها، فلاونول‌ها، فلاونون‌ها و ایزوفلاون‌ها هستند. کوئرستین به عنوان یک فلاونوئید از نوع فلاونون می‌باشد که در رژیم غذایی انسان یافت می‌شود که می‌تواند از آسیب رادیکال‌های آزاد به لیپوپروتئین‌های کم چگالی جلوگیری کند (۵۷). کوئرستین از تکثیر سلول‌های سرطانی به روشی وابسته به دوز جلوگیری می‌کند. اگرچه اولین اثر ضدتکثیری کوئرستین تقریباً در دوز پایین دیده می‌شود (۵۸). مولکول‌های زیستی بسیاری در عصاره‌های گیاهی وجود دارند که در تشکیل نانوذرات فلزی مؤثر هستند. اما امروزه

بحث

سرطان پستان به عنوان یک مشکل فزاینده بین زنان در سال‌های اخیر شناخته شده است که یکی از دلایل اصلی مرگ و میر ناشی از بروز تنوع در سبک زندگی است (۵۲). امروزه، تأکید علم پزشکی بر پیشگیری و درمان سرطان با استفاده از مواد غذایی طبیعی است. وجود ترکیبات با ارزش فلاونوئیدی در ترکیبات غذایی برای مقابله با سلول‌های سرطانی از طریق مقابله با تکثیر، آپوپتوز و مسیرهای رگ‌زایی معرفی شده‌اند (۵۳). چندین ویژگی از جمله فعالیت‌های ضدسرطانی، ضدالتهابی، ضددیابتی، ضدویروسی و ضدحساسیت فلاونوئیدها به عنوان ترکیبات پلی‌فنلی طبیعی ثابت شده است. فلاونوئیدها و متابولیت‌های آن بر هر مرحله از سلول‌های سرطانی از طریق مسیرهای انتقال پیام تأثیر می‌گذارند. این ترکیبات پلی‌فنلی سازوکارهای مختلفی از جمله تحریک گیرنده هیدروکربنی آریل، بیان آنزیم‌های متابولیزه کننده دارو در فازهای I و II و ناقل فاز III مانند پروتئین مقاوم به سرطان پستان (BCRP) را تنظیم می‌کنند (۵۴). در سال‌های گذشته مطالعات اپیدمیولوژیک ارتباط معکوس

لنفوبلاستوئید هستند (۶۳). همچنین نشان داده شده است که Niaziminin و beta-sitosterol-3-O-beta-D-glucopyranoside موجود در نمونه برگ‌های گیاه *M. oleifera* نیز با فعالیت ضدتوموری مرتبط هستند (۶۴). در این پژوهش وجود ترکیباتی نظیر کوئرستین، روتین، کمپفرول، خانواده بزرگ فلاونوئید و آنتوسیانین در عصاره آبی گیاه *M. oleifera* تأیید شد (جدول ۱ و شکل ۱). همچنین بیوسنتز نانوذرات فلزی هم‌چون آهن، مس، روی و نقره توسط عصاره آبی گیاه *M. oleifera* توسط آزمون DLS و FTIR تأیید شد (شکل ۳ و ۴).

نانوذرات آهن، مس، روی و نقره با اندازه متوسط به ترتیب ۳۵، ۳۲، ۳۳ و ۳۴ نانومتر از کارایی بالایی در انتقال دارو و نفوذ به سلول‌های میزبان دارند. نانوذرات مناسب از نظر بالینی در استفاده پزشکی و زیست‌شناسی نانوذرات با اندازه ۱۰ الی ۱۰۰ نانومتر هستند (۱۰).

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 ترکیبات مذکور می‌شود (۶۵). کوئرستین به عنوان یک ترکیب دارویی ضدتکثیر در سلول‌های MCF-7 با کاهش فسفریلاسیون P38MAPK به‌عنوان نشانه بارز تکثیر سلولی بازی می‌کند (۶۶).

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 (۶۷). علاوه بر این مشخص شده است که کوئرستین باعث القای آپوپتوز و نکروز در سلول‌های MCF-7 می‌شوند (۶۸). 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 (۶۹). Bharali و همکاران (۷۰)، گزارش کردند که عصاره‌های به‌دست آمده از برگ *M. oleifera* پتانسیل بالایی در مقابله با سرطان‌زاهای شیمیایی از طریق مسیرهای کبدی را دارند (۷۰).

Daghaghele و همکاران (۷۱)، با ارزیابی روش‌های مختلف استخراج ترکیبات فیتوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ مورینگا بیان کردند که عصاره آبی به دست

ارتباط نزدیک بین بیوسنتز نانوذرات فلزی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در ترکیبات گیاهی مشخص شده است. ترکیبات پلی‌فنلی همانند فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، تانن‌ها و غیره که از خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردارند و به واسطه قابلیت انتقال الکترون، خاصیت احیاکنندگی دارند و از این‌رو می‌توانند باعث احیای یون‌های فلزی در محلول آبی نمک فلزی شده، در شرایط مناسب باعث تولید نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی گردند (۵۹). به دلیل وجود ترکیبات پلی‌فنلی با ارزش در گیاهان دارویی از جمله گیاه مورینگا باعث شده است که در این پژوهش از عصاره آبی این گیاه جهت بیوسنتز نانوذرات فلزی آهن، مس، روی و نقره و همچنین بررسی تأثیر عصاره آبی حاصل از این گیاه و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن بر روی دو لاین سلولی MCF-7 و BT-549 استفاده شود.

برگ‌ها و اندام هوایی گیاه *M. oleifera* 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 ضدقارچی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶۰). ترکیباتی نظیر Heptane, 2,4-dimethyl-, Dodecane, Methoxy phenyl-Oxime, Oxalic acid, 6-ethyloct-3-yl heptyl ester Acid, Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-Octadecane. و غیره توسط GC-Mas اسانس گیاه مورینگا (*M. oleifera*) مشخص شدند که دارای خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدسرطانی می‌باشند (۶۱).

گیاه *M. oleifera* سرشار از ترکیبات فلاونوئیدی به‌خصوص کوئرستین است که دارای خواص ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. این گیاه همچنین حاوی ترکیبی نظیر ایزوتیوسیانیید و گلوکوسینولات است. اثر بخشی گیاه مورینگا در درمان سرطان تخمدان و پستان پس از انتشار مطالعات اخیر که اثبات می‌کند ایزوتیوسیانات بنزیل (BITC) و فنیل استوسیانات (PEITC) باعث القا آپوپتوزی در سلول‌های سرطانی در شرایط آزمایشگاهی می‌شود، آشکار شد (۶۲). مطالعات روی اثرات ضدسرطانی این گیاه نشان داد که دو ترکیب 4-benzyl isothiocyanate (4'-O-acetyl-alpha-L-rhamnopyranosyloxy) و Niazimicin مهارکننده‌های استروربول در سلول‌های

کمتر از عصاره آبی حاصل از نمونه رشد یافته در طبیعت بود (شکل ۵ و ۶).

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به هزینه بالای تجهیزات و ترکیبات آزمایشی اشاره نمود که امکان تکرار آزمایش را محدودتر می‌نماید. عدم تکرارپذیری آزمایش می‌تواند به‌عنوان یک نقطه ضعف پژوهش حاضر باشد. هم‌چنین آزمایش تنها در شرایط آزمایشی (*In vitro*) انجام شده است که می‌تواند به‌عنوان یکی از نقاط ضعف پژوهش حاضر مطرح شود. اما از نقاط قوت این پژوهش می‌توان به طیف وسیع تیمارهای آزمایشی، استفاده از ترکیبات با منشأ گیاهی جهت مقابله با لاین‌های سلول سرطانی و استفاده از دو لاین سلولی مختلف اشاره نمود. علاوه‌براین پیشنهاد می‌شود آزمایش موردنظر در شرایط طبیعی (*In vivo*) و بر روی موجودات زنده مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش از گیاه مورینگا جهت بیوسنتز نانوذرات آهن، مس، روی و نقره استفاده شد. خواص ضدسرطانی اسانس، عصاره آبی گیاه مورینگا و نانوذرات نانوذرات آهن، مس، روی و نقره بیوسنتز شده از آن بر روی دو لاین سلولی MCF-7 و BT-549 مورد ارزیابی قرار گرفت. طبق نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نانوذره مس بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه مورینگا بالاترین میزان خاصیت ضدسرطانی بر روی لاین‌های سلولی MCF-7 و BT-549 داشت.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله هیچ‌گونه تعارض منافی با یکدیگر ندارند.

References

- Mahdavifar N, Pakzad R, Ghoncheh M, Pakzad I, Moudi A, Salehiniya H. Spatial analysis of breast cancer incidence in Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2016;17: 59-64.
- Soerjomataram I, Bray F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020–2070. *Nature reviews Clinical oncology*. 2021;18(10):663-72.

آمده از اندام هوایی گیاه مورینگا بر زنده‌مانی و تکثیر لاین‌های سلول سرطانی A549 مؤثر بوده و میزان IC_{50} قابل قبولی داشته است (۷۱). در این پژوهش نیز مشخص شد که عصاره آبی به دست آمده از اندام هوایی گیاه رشد یافته در شرایط طبیعی بر روی رشد و زنده‌مانی سلول‌های سرطانی MCF-7 و BT-549 مؤثر است (شکل ۵).

با توجه به اندازه بزرگ نانوذرات در مقایسه با دارو، جذب آن به سلول‌ها به میزان بسیاری کمتری صورت می‌گیرد درحالی‌که انتقال آن به سلول‌های سرطانی به‌دلیل لیگاندهای سطحی افزایش می‌یابد. این راهبرد موجب می‌شود تا کارآیی دارو بر بافت سرطانی افزایش یافته و در عین حال عوارض جانبی دارو بر سلول‌ها و بافت نرمال کاهش یابد. گیرنده‌های فولیک اسید به‌دلیل استفاده آن در چرخه سنتز DNA و با توجه به سرعت بالایی تقسیم DNA در سلول‌های سرطانی به‌طور قابل توجهی در سطح سلول‌های سرطانی بیشتر بیان می‌شوند. از این‌رو، مطالعات متعددی به‌منظور پوشش سطح نانوذرات مختلف با استفاده از فولیک اسید و با هدف افزایش بازده انتقال به سلول‌های سرطانی در سال‌های گذشته انجام گرفته است (۷۲).

مطابق نتایج به‌دست آمده در این پژوهش Keyhanfar و Mansouri-Tehrani (۷۳)، با ارزیابی اثرات نانوذرات مس بر رده سلولی سلول‌های نرمال و سلول‌های سرطانی پروستات (1-HFF و 3-P)، بیان کردند که نانوذرات مس تأثیر مناسبی بر رده سلول‌های سرطانی دارند. نانوذرات اکسید روی، موجب کاهش رشد و زنده‌مانی سلول‌های سرطان پستان انسان (MCF-7) می‌شود (۷۳). با آزمایشی که Al-Nuairi و همکاران (۷۴) 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 نانوذرات نقره بیوسنتز شده خواص فیزیکی مطلوبی داشته و خواص سیتوتوکسیک انتخابی را روی سلول‌های MCF-7 نشان دادند در حالی که بر سلول‌های فیبروبلاست تأثیری نداشتند (۷۴). در این پژوهش مشخص شد که میزان IC_{50} لاین‌های سلولی MCF-7 و BT-549 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

14. Gur T, Meydan I, Seckin H, Bekmezci M, Sen F. Green synthesis, characterization and bioactivity of biogenic zinc oxide nanoparticles. *Environmental Research*. 2022;204:1-11.
15. Islam F, Shohag S, Uddin MJ, Islam MR, Nafady MH, Akter A, *et al.* Exploring the journey of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) toward biomedical applications. *Materials*. 2022;15(6):21-60.
16. Sadhukhan P, Kundu M, Chatterjee S, Ghosh N, Manna P, Das J, *et al.* Targeted delivery of quercetin via pH-responsive zinc oxide nanoparticles for breast cancer therapy. *Materials science and engineering: C*. 2019;100:129-40.
17. Alphandéry E. Biodistribution and targeting properties of iron oxide nanoparticles for treatments of cancer and iron anemia disease. *Nanotoxicology*. 2019;13(5):573-96.
18. Bhattacharya S, Prajapati BG, Ali N, Mohany M, Aboul-Soud MA, Khan R. Therapeutic potential of *Methotrexate-Loaded* superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with poly (lactic-co-glycolic acid) and polyethylene glycol against breast cancer: Development, characterization, and comprehensive In Vitro Investigation. *ACS omega*. 2023;8(30):27-49.
19. Malhotra N, Ger TR, Uapipatanakul B, Huang JC, Chen KHC, Hsiao CD. Review of copper and copper nanoparticle toxicity in fish. *Nanomaterials*. 2020;10(6):11-26.
20. Amer M, Awwad A. Green synthesis of copper nanoparticles by *Citrus limon* fruits extract, characterization and antibacterial activity. 2020; 7(1): 1-8.
21. Mahmood RI, Kadhim AA, Ibraheem S, Albukhaty S, Mohammed-Salih HS, Abbas RH, *et al.* Biosynthesis of copper oxide nanoparticles mediated *Annona muricata* as cytotoxic and apoptosis inducer factor in breast cancer cell lines. *Scientific Reports*. 2022;12(1):16-65.
22. Crisan MC, Teodora M, Lucian M. Copper nanoparticles: Synthesis and characterization, physiology, toxicity and antimicrobial applications. *Applied Sciences*. 2021;12(1):141-57.
23. Alavi M, Kowalski R, Capasso R, Douglas Melo Coutinho H, Rose Alencar De Menezes I. Various novel strategies for functionalization of gold and silver
3. EnayatRad M, Salehinia H. An investigation of changing patterns in breast cancer incidence trends among Iranian women. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 2015;22(1):27-35.
4. Esfahani F. editor The situation in Iran over the past 50 years, breast cancer risk factors. *Congress of Medical Oncology*; 2003.
5. Allahqoli L, Mazidimoradi A, Momenimovahed Z, Rahmani A, Hakimi S, Tiznobaik A, Alkatout I. The global incidence, mortality, and burden of breast cancer in 2019: correlation with smoking, drinking, and drug use. *Frontiers in Oncology*. 2022;12: 1-9.
6. Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment. *Cancer discovery*. 2019;9(2):176-98.
7. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S, *et al.* Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International immunopharmacology*. 2020;84:1-23.
8. Debela DT, Muzazu SG, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC, *et al.* New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE open medicine*. 2021;9:1-10.
9. Wang L, Lankhorst L, Bernards R. Exploiting senescence for the treatment of cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2022;22(6):340-55.
10. Tao H, Wu T, Aldeghi M, Wu TC, Aspuru-Guzik A, Kumacheva E. Nanoparticle synthesis assisted by machine learning. *Nature reviews materials*. 2021;6(8):701-16.
11. Modena MM, Rühle B, Burg TP, Wuttke S. Nanoparticle characterization: what to measure? *Advanced Materials*. 2019;31(32):1-22.
12. Ajinkya N, Yu X, Kaithal P, Luo H, Somani P, Ramakrishna S. Magnetic iron oxide nanoparticle (IONP) synthesis to applications: present and future. *Materials*. 2020;13(20):4644.
13. Bandeira M, Giovanela M, Roesch-Ely M, Devine DM, da Silva Crespo J. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism of formation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2020;15:22-37.

- sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant physiology*. 1979;64(1):88-93.
34. Hurst W, Martin Jr R, Zoumas B. Application of HPLC to characterization of individual carbohydrates in foods. *Journal of Food Science*. 1979;44(3):892-5.
 35. Shebl A, Hassan A, Salama DM, Abd El-Aziz M, Abd Elwahed MS. Green synthesis of nanofertilizers and their application as a foliar for Cucurbita pepo L. *Journal of Nanomaterials*. 2019;1-11.
 36. Akintelu SA, Oyebamiji AK, Olugbeko SC, Latona DF. Green chemistry approach towards the synthesis of copper nanoparticles and its potential applications as therapeutic agents and environmental control. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*. 2021; 4:1-13.
 37. Singh P, Pandit S, Jers C, Joshi AS, Garnæs J, Mijakovic I. Silver nanoparticles produced from *Cedecea* sp. exhibit antibiofilm activity and remarkable stability. *Scientific reports*. 2021;11(1):12-9.
 38. Bhuyan T, Mishra K, Khanuja M, Prasad R, Varma A. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles from *Azadirachta indica* for antibacterial and photocatalytic applications. *Materials Science in Semiconductor Processing*. 2015;32:55-61.
 39. Dappula SS, Kandarakonda YR, Shaik JB, Mothukuru SL, Lebaka VR, Mannarapu M, *et al.* 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. *Journal of Molecular Structure*. 2023:12-23.
 40. Reddy DN. Essential oils extracted from medicinal plants and their applications. *Natural Bio-active Compounds: Volume 1: Production and Applications*. 2019:237-83.
 41. Hopkins SL, Siewert B, Askes S, Veldhuizen P, Zwier R, Heger M, *et al.* An *in vitro* cell irradiation protocol for testing photopharmaceuticals and the effect of blue, green, and red light on human cancer cell lines. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2016;15(5):644-53.
 42. Setiawati A, Candrasari DS, Setyajati FE, Prasetyo VK, Setyaningsih D, and Hartini, YS. Anticancer drug screening of natural products: In vitro: cytotoxicity assays, nanoparticles to hinder drug-resistant bacteria and cancer cells. *Micro Nano Bio Aspects*. 2022;1(1):38-48.
 24. Dinparvar S, Bagirova M, Allahverdiyev AM, Abamor ES, Safarov T, Aydogdu M, *et al.* A nanotechnology-based new approach in the treatment of breast cancer: Biosynthesized silver nanoparticles using *Cuminum cyminum* L. seed extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2020;2(8):111902.
 25. Jamkhande PG, Ghule NW, Bamer AH, Kalaskar MG. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal of drug delivery science and technology*. 2019;53:101-14.
 26. Srivastava S, Usmani Z, Atanasov AG, Singh VK, Singh NP, Abdel-Azeem AM, *et al.* Biological nanofactories: Using living forms for metal nanoparticle synthesis. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2021;21(2):245-65.
 27. Vishwanath R, Negi B. Conventional and green methods of synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial properties. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*. 2021;4:1-12.
 28. Mughal B, Zaidi SZJ, Zhang X, Hassan SU. Biogenic nanoparticles: Synthesis, characterisation and applications. *Applied Sciences*. 2021;11(6):1-18.
 29. Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant biology*. 2005;7(06):581-91.
 30. Peixoto JRO, Silva GC, Costa RA, Vieira GHF, Fonteles Filho AA, dos Fernandes Vieira RHS. In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic Moringa leaf extracts. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2011;4(3):201-14.
 31. Alizadeh BB, Tabatabaei YF, Noorbakhsh H, Riazi F, Jajarmi A.. Study of the antibacterial activity of methanolic and aqueous extracts of *Myrtus communis* on pathogenic strains causing infection. 2016; 18(2): 1-7.
 32. Moradi S, Razavi S, Vasiee A. Antioxidant and antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* L. on some pathogenic bacteria '*in vitro*'. *Agricultural Advances*. 2014;3(4):124-30.
 33. Wagner GJ. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral

- zeylanica* L. Industrial Crops and Products. 2020;154:112-20.
52. Britt KL, Cuzick J, Phillips K-A. Key steps for effective breast cancer prevention. Nature Reviews Cancer. 2020;20(8):417-36.
53. Hazafa A, Rehman K-U-, Jahan N, Jabeen Z. The role of polyphenol (flavonoids) compounds in the treatment of cancer cells. Nutrition and cancer. 2020;72(3):386-97.
54. Tavsan Z, Kayali HA. Flavonoids showed anticancer effects on the ovarian cancer cells: Involvement of reactive oxygen species, apoptosis, cell cycle and invasion. Biomedicine & pharmacotherapy. 2019;116:10-9.
55. Fernández J, Silván B, Entrialgo-Cadierno R, Villar CJ, Capasso R, Uranga JA, *et al.* Antiproliferative and palliative activity of flavonoids in colorectal cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2021;143:11-22.
56. Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as anticancer agents. Nutrients. 2020;12(2):457.
57. Forni C, Rossi M, Borromeo I, Feriotto G, Platamone G, Tabolacci C, *et al.* Flavonoids: A myth or a reality for cancer therapy? Molecules. 2021;26(12):35-83.
58. Vafadar A, Shabaninejad Z, Movahedpour A, Fallahi F, Taghavipour M, Ghasemi Y, *et al.* Quercetin and cancer: new insights into its therapeutic effects on ovarian cancer cells. Cell & bioscience. 2020;10:1-17.
59. Chodari L, Dilsiz Aytemir M, Vahedi P, Alipour M, Vahed SZ, Khatibi SMH, *et al.* Targeting mitochondrial biogenesis with polyphenol compounds. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2021: 1-20.
60. Mahajan SG, Mehta AA. Immunosuppressive activity of ethanolic extract of seeds of *Moringa oleifera* Lam. in experimental immune inflammation. Journal of ethnopharmacology. 2010;130(1):183-96.
61. Al-Rahbi BAA, Al-Sadi AM, Al-Harrasi MMA, Al-Sabahi JN, Al-Mahmooli IH, Blackburn D, *et al.* Effectiveness of endophytic and rhizospheric bacteria from *Moringa* spp. in controlling *Pythium aphanidermatum* damping-off of cabbage. Plants. 2023;12(3):668-72.
- techniques, and challenges. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2022;12(7):279-89.
43. Sivakumar P, Prabhakar P, Doble M. Synthesis, antioxidant evaluation, and quantitative structure–activity relationship studies of chalcones. Medicinal Chemistry Research. 2011;20:482-92.
44. Kumar A, Ahmad P, Maurya RA, Singh A, Srivastava AK. Novel 2-aryl-naphtho [1, 2-d] oxazole derivatives as potential PTP-1B inhibitors showing antihyperglycemic activities. European journal of medicinal chemistry. 2009;44(1):109-16.
45. Mujeeb F, Bajpai P, Pathak N. Phytochemical evaluation, antimicrobial activity, and determination of bioactive components from leaves of *Aegle marmelos*. BioMed research international. 2014:1-11.
46. Saapilin NS, Yong WTL, Cheong BE, Kamaruzaman KA, Rodrigues KF. Physiological and biochemical responses of *Chinese cabbage* (*Brassica rapa* var. *chinensis*) to different light treatments. Chemical and Biological Technologies in Agriculture. 2022;9(1):1-20.
47. Prathna TC, Chandrasekaran N, Raichur AM, Mukherjee A. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by *Citrus limon* (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2011;82(1):152-9.
48. Ren J, Wang J, Karthikeyan S, Liu H, Cai J. Natural anti-phytopathogenic fungi compound phenol, 2, 4-bis (1, 1-dimethylethyl) from *Pseudomonas fluorescens* TL-1. 2019.
49. Ahsan T, Chen J, Zhao X, Irfan M, Wu Y. Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and dibutyl phthalate) produced by *Streptomyces* strain KX852460 for the biological control of *Rhizoctonia solani* AG-3 strain KX852461 to control target spot disease in tobacco leaf. AMB Express. 2017;7(1):1-9.
50. Yuenyongsawad S, Tewtrakul S. Essential oil components and biological activities of *Coleus parvifolius* leaves. Songklanakarin J Sci Technol. 2005;27(27):497-501.
51. Vanitha V, Vijayakumar S, Nilavukkarasi M, Punitha V, Vidhya E, Praseetha P. Heneicosane—A novel microbicidal bioactive alkane identified from *Plumbago*

- of phytochemical and antioxidant compounds of *Moringa oleifera* leaf extract. Journal of food science and technology (Iran). 2022;18(121):163-72.
72. Dave V, Sharma R, Gupta C, Sur S. Folic acid modified gold nanoparticle for targeted delivery of Sorafenib tosylate towards the treatment of diabetic retinopathy. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2020;194:11-22.
73. Keyhanfar M, Mansouri Tehrani HA. The role of plant antioxidants in the synthesis of metal nanoparticles. Journal of Plant Process and Function. 2022;6(1):67-76.
74. Al-Nuairi AG, Mosa KA, Mohammad MG, El-Keblawy A, Soliman S, Alawadhi H. 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. Biological trace element research. 2020;194:560-9.
62. Satyan K, Swamy N, Dizon DS, Singh R, Granai CO, Brard L. Phenethyl isothiocyanate (PEITC) inhibits growth of ovarian cancer cells by inducing apoptosis: role of caspase and MAPK activation. Gynecologic oncology. 2006;103(1):261-70.
63. Guevara AP, Vargas C, Sakurai H, Fujiwara Y, Hashimoto K, Maoka T, et al. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 1999;440(2):181-8.
64. Kalkunte S, Swamy N, Dizon DS, Brard L. Benzyl isothiocyanate (BITC) induces apoptosis in ovarian cancer cells *in vitro*. Journal of experimental therapeutics & oncology. 2006;5(4):1-16.
65. Lan C-Y, Chen S-Y, Kuo C-W, Lu C-C, Yen G-C. Quercetin facilitates cell death and chemosensitivity through RAGE/PI3K/AKT/mTOR axis in human pancreatic cancer cells. Journal of food and drug analysis. 2019;27(4):887-96.
66. Kim S-H, Yoo E-S, Woo J-S, Han S-H, Lee J-H, Jung S-H, et al. Antitumor and apoptotic effects of quercetin on human melanoma cells involving JNK/P38 MAPK signaling activation. European journal of pharmacology. 2019;860:1-17.
67. Hasan AA, Tatarskiy V, Kalinina E. Synthetic pathways and the therapeutic potential of quercetin and curcumin. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(22):14413.
68. Kedhari Sundaram M, Raina R, Afroze N, Bajbouj K, Hamad M, Haque S, et al. Quercetin modulates signaling pathways and induces apoptosis in cervical cancer cells. Bioscience reports. 2019;39(8):1-15.
69. Akbari A, Akbarzadeh A, Tehrani MR, Cohan RA, Chiani M, Mehrabi MR. Development and characterization of nanoliposomal hydroxyurea against BT-474 breast cancer cells. Advanced Pharmaceutical Bulletin. 2020;10(1):1-39.
70. Bharali R, Tabassum J, Azad MRH. Chemomodulatory effect of *Moringa oleifera*, Lam, on hepatic carcinogen metabolising enzymes, antioxidant parameters and skin papillomagenesis in mice. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2003;4(2):131-40.
71. Daghaghele S, Kiasat AR, Mirzajani R. Evaluation of different extraction methods